

(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2018-523469

(P2018-523469A)

(43) 公表日 平成30年8月23日(2018.8.23)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z 2 G 0 4 5
A 6 1 K 38/49 (2006.01)	A 6 1 K 38/49	4 B 0 2 9
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	4 C 0 8 4
G 0 6 Q 50/22 (2018.01)	G 0 6 Q 50/22	5 L 0 9 9

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-500637 (P2018-500637)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月8日 (2016.7.8)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年3月2日 (2018.3.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/041585
 (87) 国際公開番号 W02017/011329
 (87) 国際公開日 平成29年1月19日 (2017.1.19)
 (31) 優先権主張番号 62/191,096
 (32) 優先日 平成27年7月10日 (2015.7.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/300,342
 (32) 優先日 平成28年2月26日 (2016.2.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/352,680
 (32) 優先日 平成28年6月21日 (2016.6.21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

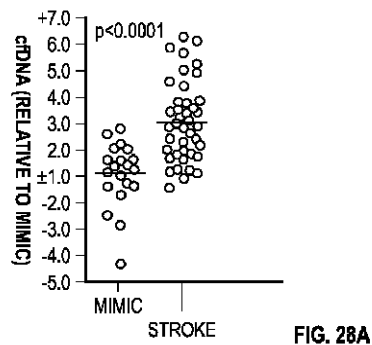
(71) 出願人 502347102
 ウェストバージニア ユニバーシティ
 WEST VIRGINIA UNIVE
 RSITY
 アメリカ合衆国 26506 ウェストバ
 ージニア, モーガンタウン, チェスナット
 リッジ ロード 886, 스위트 2
 O8
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳卒中および脳卒中重篤度のマーカー

(57) 【要約】

本明細書で、虚血性脳卒中を検出し、虚血性脳卒中のバイオマーカーを識別するための方法、キットおよびデバイスが提供される。生体試料中の虚血性脳卒中バイオマーカーの発現パターンを評価することにより、時間に敏感な、ベッドサイドの方法での脳卒中の診断が可能になり得る。本発明は、例えば、a. 対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ； b. 無細胞核酸の前記レベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、前記参照試料は疑似脳卒中対象からのものであるステップ；および c. 前記試料または前記参照試料が無細胞核酸のより高いレベルを有するかを決定するステップを含む、方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a . 対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ ;
 b . 無細胞核酸の前記レベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、前記参照試料は疑似脳卒中対象からのものであるステップ ; および
 c . 前記試料または前記参照試料が無細胞核酸のより高いレベルを有するかを決定するステップ
 を含む方法。

【請求項 2】

虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含み、前記評価するステップが虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別する、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記評価するステップが少なくとも 80 % の感度および少なくとも 75 % の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

a . 対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ ;
 b . 無細胞核酸の前記レベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、前記参照試料は非虚血性脳卒中対象からのものであるステップ ; および
 c . コンピュータシステムを使用して前記対象で虚血性脳卒中を評価するステップであって、少なくとも 80 % の感度および少なくとも 75 % の特異性で虚血性脳卒中を非虚血性脳卒中から区別するステップ
 を含む方法。

20

【請求項 5】

a . 後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するステップであって、前記無細胞核酸が虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中にあるステップ、

b . 無細胞核酸の前記レベルを参照試料中の前記後成的マーカーを有する無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、前記参照試料は健康対照対象または疑似脳卒中対象からのものであるステップ
 を含む方法。

【請求項 6】

a . 虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ ;

b . 前記無細胞核酸のサブグループのレベルを測定するステップであって、前記無細胞核酸の前記サブグループが後成的マーカーを有するステップ ;

c . 無細胞核酸の前記レベルと前記無細胞核酸のサブグループの前記レベルの間の比を決定するステップ ;

d . 前記比を、参照試料中の無細胞核酸のレベルと前記参照試料中の前記無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比である参照比と比較するステップであって、前記参照試料中の前記無細胞核酸の前記サブグループが前記後成的マーカーを有し、前記参照試料が健康対照対象または疑似脳卒中対象からのものであるステップ
 を含む方法。

30

40

【請求項 7】

(c) コンピュータシステムを使用して前記対象で虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含み、前記評価するステップが虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別する、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記評価するステップが少なくとも 80 % の感度および少なくとも 75 % の特異性で虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記無細胞核酸のうちの少なくとも 1 つが後成的マーカーを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれ

50

れか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記後成的マーカーが1つまたは複数のタイプの細胞に特異的である、請求項5～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記後成的マーカーが神経血管単位からの細胞に特異的である、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記後成的マーカーが、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、シトルリン化またはその任意の組合せを含む、請求項5～11のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 13】

前記感度が少なくとも85%である、請求項3、4または8に記載の方法。

【請求項 14】

前記特異性が少なくとも80%である、請求項3、4、8または13に記載の方法。

【請求項 15】

(a)の前記測定するステップが、前記試料中の前記無細胞核酸のうちの少なくとも1つに結合するプローブを使用して実施される、請求項1～14のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

(b)の前記測定するステップが、前記無細胞核酸の前記サブグループのうちの少なくとも1つの無細胞核酸に結合するプローブを検出する後成的マーカーを使用して実施される、請求項6に記載の方法。

20

【請求項 17】

(a)の前記測定するステップが、前記試料中の遺伝子またはその断片のレベルを決定することによって実施される、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記遺伝子が、テロメラーゼ逆転写酵素、ベータグロビン、分化抗原群240D、アルブミンファミリーのメンバー、リボヌクレアーゼP、RNA構成要素H1、Aluエレメント、内因性レトロウイルスグループ3、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼをコードする、請求項17に記載の方法。

30

【請求項 19】

前記無細胞核酸が無細胞DNAまたは無細胞RNAを含む、請求項1～18のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記RNAまたはDNAが神経血管単位中の細胞に特異的である、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記無細胞核酸のうちの少なくとも1つが好中球細胞外トラップに由来する、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 22】

前記試料が血液またはその分画を含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

脳卒中重症度、前記対象の自然免疫系の活性化または脳卒中により誘導された損傷が、前記試料中の無細胞核酸の前記レベルと正に相関している、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 24】

前記対象に処置を投与するステップをさらに含む、請求項1～23のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 25】

前記試料中の無細胞核酸の前記レベルが無細胞核酸の前記参照レベルより高いならば前記投与するステップが実施され、前記試料中の無細胞核酸の前記レベルが無細胞核酸の前記参照レベルと等しいかまたはそれより低いならば前記投与するステップが実施されない、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記対象で虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含み、虚血性脳卒中症状発症の前記時間が、前記試料中の無細胞核酸の前記レベルを虚血性脳卒中症状発症の前記時間と関連させることによって決定される、請求項 24 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 27】

前記試料中の無細胞核酸の前記レベルが無細胞核酸の前記参照レベルと比較して少なくとも 1 倍より高いとき、前記対象で虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料中の無細胞核酸の前記レベルが無細胞核酸の前記参照レベルと比較して少なくとも 3 倍より高いとき、前記対象で前記虚血性脳卒中が検出される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記比が前記参照比と比較してより高いとき、虚血性脳卒中が前記対象で検出される、請求項 6 に記載の方法。

20

【請求項 30】

前記対象で血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含む、上記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

血液細胞の前記プロファイルが、前記試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはそれらの組合せを含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記対象をモニタリングするために異なる時点で (a) および (b) を繰り返すステップをさらに含む、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 33】

前記対象をモニタリングするために異なる時点で (a)、(b)、(c) および (d) を繰り返すステップをさらに含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 34】

前記試料が無細胞核酸のより高いレベルを有するかを決定するステップが、前記対象が虚血性脳卒中対象であることを示す、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 35】

対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットであって、

40

a. 前記対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブであって、前記試料中の前記無細胞核酸のうちの少なくとも 1 つに結合するプローブ；および

b. 前記無細胞核酸のうちの少なくとも 1 つへの前記プローブの前記結合を検査するための検出試薬を含むキット。

【請求項 36】

対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットであって、

a. 前記対象からの試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブであって、前記後成的マーカーを有する前記無細胞核酸に結合するプローブ；および

50

b. 前記無細胞核酸との前記プローブの前記結合を検査するための検出試薬を含むキット。

【請求項 37】

状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a. プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中の 2 つまたはそれよりも多くのバイオマーカーを含むバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記プローブはバイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合するステップ；

b. 前記試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップであって、前記参照は、健康対照対象および疑似脳卒中対象におけるバイオマーカーの前記群の発現を含むステップ；ならびに

c. コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、少なくとも 92% の感度および少なくとも 92% の特異性で健康対照からの虚血性脳卒中および疑似脳卒中からの虚血性脳卒中を区別するステップを含む方法。

【請求項 38】

状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a. プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中の 2 つまたはそれよりも多くのバイオマーカーを含むバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記プローブはバイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合するステップ；

b. 前記試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップであって、前記参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの前記群の発現であるステップ；ならびに

c. コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、評価することがバイオマーカーの前記群中の 2 つのバイオマーカーの発現に基づき少なくとも 92% の感度および少なくとも 92% の特異性を有するステップを含む方法。

【請求項 39】

前記プローブが標識されている、請求項 37 または 38 に記載の方法。

【請求項 40】

状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a. 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記標識プローブはバイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が以下のうちの 2 つまたはそれよりも多くを含むステップ；

i. 炭疽毒素受容体、

ii. セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、

iii. ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、および

iv. 分化抗原群ファミリーメンバー；

b. 前記試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップであって、前記参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの前記群の発現であるステップ；ならびに

c. コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップを含む方法。

【請求項 41】

バイオマーカーの前記群が炭疽毒素受容体を含み、前記炭疽毒素受容体が炭疽毒素受容体 2 である、請求項 37 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

バイオマーカーの前記群がセリン/トレオニン-プロテインキナーゼを含み、前記セリン/トレオニン-プロテインキナーゼがセリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3である、請求項37~41のいずれか一項に記載の方法。

【請求項43】

バイオマーカーの前記群がピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼを含み、前記ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼがピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4である、請求項37~42のいずれか一項に記載の方法。

【請求項44】

バイオマーカーの前記群が分化抗原群ファミリーメンバーを含み、前記分化抗原群ファミリーメンバーが分化抗原群163である、請求項37~43のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項45】

バイオマーカーの前記群中の少なくとも1つのバイオマーカーの発現が前記参照と比較して少なくとも1倍増加するとき、前記対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含む、請求項37~44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項46】

バイオマーカーの前記群が、

- i . ミエリンおよびリンパ球タンパク質、
- ii . R a s - E R K 経路の阻害剤、
- iii . D N A 結合ファミリーの阻害剤のメンバー、
- iv . リソソームシステインプロテイナーゼ、
- v . 運動タンパク質、および
- vi . 色素上皮層由来因子の受容体

の1つまたは複数を含み、請求項40~44のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項47】

R a s - E R K 経路の前記阻害剤が G R B 2 関連アダプタータンパク質である、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

D N A 結合ファミリーの阻害剤の前記メンバーが D N A 結合阻害剤3である、請求項46~47のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項49】

前記リソソームシステインプロテイナーゼがカテプシンであり、前記カテプシンはカテプシンZである、請求項46~48のいずれか一項に記載の方法。

【請求項50】

前記運動タンパク質がキネシン様タンパク質であり、前記キネシン様タンパク質がキネシン様タンパク質1Bである、請求項46~49のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

色素上皮層由来因子の前記受容体がプレキシンドメイン含有タンパク質であり、前記プレキシンドメイン含有タンパク質がプレキシンドメイン含有タンパク質2である、請求項46~50に記載の方法。

40

【請求項52】

炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの少なくとも1つの発現が前記参照と比較して少なくとも1倍増加するとき、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質、G R B 2 関連アダプタータンパク質およびD N A 結合阻害剤3のうちの少なくとも1つの発現が前記参照と比較して少なくとも1倍減少するとき、前記対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含む、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

- a . 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中

50

のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記標識プローブはバイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 1 6 3 の 2 つまたはそれよりも多くを含むステップ；

b . バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップであって、前記参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの前記群の発現であるステップ；ならびに

c . コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、それにより、前記参照における前記 2 つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの発現より多い量での前記試料における前記 2 つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの前記発現は虚血性脳卒中を示すステップを含む方法。

【請求項 5 4】

バイオマーカーの前記群が、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、G R B 2 関連アダプタータンパク質、D N A 結合阻害剤 3、カテプシン Z、キネシン様タンパク質 1 B およびプレキシンドメイン含有タンパク質 2 の 1 つまたは複数をさらに含む、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 1 6 3 を含むバイオマーカーの第 1 のサブグループ、ならびに、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、G R B 2 関連アダプタータンパク質および D N A 結合阻害剤 3 の 1 つまたは複数を含むバイオマーカーの第 2 のサブグループを含み、前記参照と比較して、バイオマーカーの前記第 1 のサブグループの発現が少なくとも 1 倍増加し、バイオマーカーの前記第 2 のサブグループの発現が少なくとも 1 倍減少するとき、前記対象における虚血性脳卒中が検出される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

バイオマーカーの前記第 1 のサブグループがカテプシン Z、キネシン様タンパク質 1 B およびプレキシンドメイン含有タンパク質 2 の 1 つまたは複数をさらに含む、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 1 6 3、カテプシン Z、キネシン様タンパク質 1 B およびプレキシンドメイン含有タンパク質 2 を含むバイオマーカーの第 1 のサブグループ、ならびに、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、G R B 2 関連アダプタータンパク質および D N A 結合阻害剤 3 を含むバイオマーカーの第 2 のサブグループを含み、前記参照と比較して、バイオマーカーの前記第 1 のサブグループの発現が少なくとも 1 倍増加し、バイオマーカーの前記第 2 のサブグループの発現が少なくとも 1 倍減少するとき、前記対象における虚血性脳卒中が検出される、請求項 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記対象における虚血性脳卒中が少なくとも 9 0 % の感度および少なくとも 9 0 % の特異性で検出される、請求項 4 5、5 2、5 5 ~ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 1 6 3 を含み、前記対象における虚血性脳卒中が少なくとも 9 8 % の感度および少なくとも 9 8 % の特異性で検出される、請求項 5 3 ~ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

前記対象における虚血性脳卒中症状発症から24時間以内に前記プローブを前記試料と接触させる、請求項37～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項61】

前記プローブがポリヌクレオチドまたはポリペプチドまたはその一部を含む、請求項37～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

前記プローブが、

a. バイオマーカの前記群のmRNAとハイブリダイズするか；

b. バイオマーカの前記群のmRNAに由来するDNAとハイブリダイズするか；または

c. バイオマーカの前記群のタンパク質に結合する、
請求項61に記載の方法。

10

【請求項63】

前記非虚血性脳卒中対象が一過性虚血発作、非虚血性脳卒中、出血性脳卒中または疑似脳卒中を有する、請求項4、38、40または53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

バイオマーカの前記群の前記発現が、将来の虚血性脳卒中の予測的指標であるか、またはバイオマーカの前記群の前記発現が虚血性脳卒中重症度の指標である、請求項37～63のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

前記対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含み、虚血性脳卒中症状発症の前記時間が、前記試料中のバイオマーカの前記群の前記発現を虚血性脳卒中症状発症の前記時間と関連させることによって決定される、請求項37～64のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項66】

虚血性脳卒中が虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に検出される、請求項45、52、55～59のいずれか一項に記載の方法。

【請求項67】

虚血性脳卒中が検出されるならば前記対象における虚血性脳卒中を処置するための処置を投与するステップをさらに含む、請求項37～66のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項68】

前記処置が組織プラスミノゲン活性化因子を含む、請求項25または67に記載の方法。

【請求項69】

前記試料が血液または血液の分画である、請求項37～68のいずれか一項に記載の方法。

【請求項70】

前記対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含む、請求項37～69のいずれか一項に記載の方法。

【請求項71】

血液細胞の前記プロファイルが、前記試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含む、請求項70に記載の方法。

40

【請求項72】

前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップが、前記対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップを含む、請求項37～71のいずれか一項に記載の方法。

【請求項73】

前記状態が虚血性脳卒中である、請求項37～72のいずれか一項に記載の方法。

【請求項74】

50

前記状態が疑似脳卒中である、請求項 37 ~ 72 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

バイオマーカーの前記群の 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現が前記参照と比較して増加するとき、前記対象において虚血性脳卒中の可能性がある、請求項 37 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

バイオマーカーの前記群の 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現が前記参照と比較して減少するとき、前記対象において虚血性脳卒中の可能性がある、請求項 37 ~ 74 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 77】

前記対象をモニタリングするために異なる時点で (a)、(b) および (c) を繰り返すステップをさらに含む、請求項 1 ~ 4、37、38、40 または 53 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a . プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 163 の 2 つまたはそれよりも多くを含むステップ;

b . バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップ; ならびに

c . コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、評価することが少なくとも 90% の感度および少なくとも 90% の特異性を有するステップを含む方法。

【請求項 79】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a . イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応およびその組合せからなる群から選択されるアッセイを使用して、試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 163 の 2 つまたはそれよりも多くを含むステップ;

b . バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップ; ならびに

c . コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップを含む方法。

【請求項 80】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a . プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4 および分化抗原群 163 の 2 つまたはそれよりも多くを含むステップ;

b . バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップ; ならびに

c . コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステッ

10

20

30

40

50

ブであって、バイオマーカーの前記群中の少なくとも1つのバイオマーカーの発現が少なくとも1倍増加するならば、前記対象における虚血性脳卒中が検出されるステップを含む方法。

【請求項81】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法であって、

a. イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応およびその組合せからなる群から選択されるアッセイを使用して、前記対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記アッセイが標識プローブのパネルを前記試料と接触させることによって実施され、前記標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163の2つまたはそれよりも多くを含むステップ；

10

b. バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップ；ならびに

c. コンピュータシステムを使用して前記対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、バイオマーカーの前記群中の少なくとも1つのバイオマーカーの発現が少なくとも1倍増加するならば、前記対象における虚血性脳卒中が検出され、前記評価するステップが少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性を有するステップを含む方法。

【請求項82】

20

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象の処置への応答を予測する方法であって、

a. 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって前記対象からの前記試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163の2つまたはそれよりも多くを含むステップ；

b. バイオマーカーの前記群の前記発現を参照と比較するステップ；

c. 前記対象に前記処置を投与するステップ；ならびに

d. 前記処置への前記対象の前記応答を予測するステップ

30

を含む方法。

【請求項83】

薬物を評価する方法であって、

a. 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの前記試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、前記標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの前記群が、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163の2つまたはそれよりも多くを含むステップ；

b. 前記対象に前記薬物を投与するステップ；

40

c. 前記プローブを第2の試料と接触させるステップであって、前記第2の試料は前記対象に前記薬物が投与される後に前記対象から得られるステップ；

d. 第1の試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現および前記第2の試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現を比較するステップ；ならびに

e. 前記第1の試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現と前記第2の試料中のバイオマーカーの前記群の前記発現の間の差を分析することによって前記薬物を評価するステップ

を含む方法。

【請求項84】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキッ

50

トであって、

a . 2 つまたはそれよりも多くのバイオマーカーを含むバイオマーカーの群の発現を測定するための、バイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；および

b . 前記プローブとバイオマーカーの前記群との結合を検査するための検出試薬を含み、バイオマーカーの前記群中の2つのバイオマーカーの発現に基づき少なくとも92%の感度および少なくとも92%の特異性で虚血性脳卒中を評価するキット。

【請求項85】

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットであって、

10

a . 以下の2つまたはそれよりも多くを含むバイオマーカーの群の発現を測定するためのプローブであって、

i . 炭疽毒素受容体、

i i . セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、

i i i . ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、および

i v . 分化抗原群、

バイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；ならびに

b . 前記プローブとバイオマーカーの前記群との結合を検査するための検出試薬を含むキット。

20

【請求項86】

バイオマーカーの前記群が、

i . ミエリンおよびリンパ球タンパク質、

i i . R a s - E R K 経路の阻害剤、

i i i . D N A 結合ファミリーの阻害剤のメンバー、

i v . リソソームシステインプロテイナーゼ、

v . 運動タンパク質、および

v i . 色素上皮層由来因子の受容体

をさらに含む、請求項85に記載のキット。

【請求項87】

30

虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットであって、

a . 炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163の2つまたはそれよりも多くを含むバイオマーカーの群の発現を測定するためのプローブであって、バイオマーカーの前記群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；ならびに

b . 前記プローブとバイオマーカーの前記群との結合を検査するための検出試薬を含むキット。

【請求項88】

バイオマーカーの前記群が、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質、DNA結合阻害剤3、カテプシンZ、キネシン様タンパク質1Bおよびプレキシンドメイン含有タンパク質2をさらに含む、請求項87に記載のキット。

40

【請求項89】

対象における虚血性脳卒中を検出する方法であって、

a . 前記対象からの第1の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカーの第1の群のプロファイルを測定するステップであって、バイオマーカーの前記第1の群が生体分子の第1のクラスを含み、生体分子の前記第1のクラスはポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、アダプターまたは脂質のうちの少なくとも1つを含むステップ；

b . 前記対象からの第2の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカーの第2の群のプロファイルを測定するステップであって、バイオマーカーの前記第2の群は生体分子の第2の

50

クラスを含み、生体分子の前記第 2 のクラスは生体分子の前記第 1 のクラスと異なり、生体分子の前記第 2 のクラスはポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、アダプタマーまたは脂質のうちの少なくとも 1 つを含むステップ；

c . 虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 1 の群の前記プロファイルおよび虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 2 の群の前記プロファイルをコンピュータシステムにより分析するステップ；ならびに

d . 前記対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含む方法。

【請求項 9 0】

生体分子の前記第 1 のクラスがポリヌクレオチドを含む、請求項 8 9 に記載の方法。

10

【請求項 9 1】

生体分子の前記第 2 のクラスがポリペプチドを含む、請求項 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 2】

生体分子の前記第 1 のクラスが 1 つまたは複数のサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含み、および / または生体分子の前記第 2 のクラスが前記 1 つまたは複数のサイトカインを含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 3】

分析するステップが虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 1 の群の前記プロファイルを参照プロファイルと比較するステップを含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 4】

分析するステップが虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 2 の群の前記プロファイルを参照プロファイルと比較するステップを含む、請求項 8 9 に記載の方法。

20

【請求項 9 5】

検出するステップが、虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 1 の群の前記プロファイルにおける、および / または虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 2 の群の前記プロファイルにおける発現パターンを識別するステップを含む、請求項 8 9、9 3 または 9 4 に記載の方法。

【請求項 9 6】

対象における虚血性脳卒中を検出する方法であって、

a . 前記対象からの第 1 の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルを測定するステップ；

30

b . 前記対象から第 2 の試料中の血液細胞のプロファイルを測定するステップ；

c . 虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記プロファイルおよび血液細胞の前記プロファイルをコンピュータシステムにより分析するステップ；ならびに

d . 前記対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含む方法。

【請求項 9 7】

虚血性脳卒中の前記バイオマーカーがポリヌクレオチドである、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

虚血性脳卒中の前記バイオマーカーがポリペプチドである、請求項 9 6 に記載の方法。

40

【請求項 9 9】

前記分析するステップが虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記プロファイルを参照プロファイルと比較することを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

血液細胞の前記プロファイルを測定するステップが、前記第 2 の試料中の C K - M B、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数または好中球パーセントのうちの少なくとも 1 つを測定することを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

50

血液細胞の前記プロファイルを測定するステップが前記第 2 の試料中の白血球差を測定することを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記分析するステップが前記白血球差を白血球差参照プロファイルと比較することを含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

検出するステップが、虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記プロファイルにおける、および/または血液細胞の前記プロファイルにおける発現パターンを識別することを含む、請求項 9 6、9 9 または 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記発現パターンが前記対象における虚血性脳卒中を示す、請求項 9 5 または 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記発現パターンがバイオマーカー発現の比である、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

検出するステップが前記対象における疑似脳卒中の存在または不在を評価することを含む、請求項 8 9 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

前記対象における前記虚血性脳卒中の転帰を予測するステップをさらに含む、請求項 8 9 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

前記対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含み、虚血性脳卒中症状発症の前記時間が、バイオマーカーの前記プロファイルを虚血性脳卒中症状発症の前記時間と関連させることによって決定される、請求項 8 9 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記虚血性脳卒中が前記虚血性脳卒中発症から 4 . 5 時間以内に検出される、請求項 8 9 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記対象に組織プラスミノゲン活性化因子を投与するステップをさらに含む、請求項 1 0 9 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

虚血性脳卒中の 1 つまたは複数のバイオマーカーを識別する方法であって、

- a . 第 1 の虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ ;
 - b . 第 2 の虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイルを測定するステップ ;
 - c . ポリヌクレオチドの前記プロファイルおよびポリペプチドの前記プロファイルを分析するステップ ; ならびに
 - d . 虚血性脳卒中の前記 1 つまたは複数のバイオマーカーを識別するステップ
- を含む方法。

【請求項 1 1 2】

前記分析するステップが、ポリヌクレオチドの前記プロファイルをポリヌクレオチド参照プロファイルと比較し、それによって前記第 1 の虚血性脳卒中試料中のバイオマーカーの第 1 の群を識別することを含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較したとき、前記第 1 の虚血性脳卒中試料においてポリヌクレオチドで少なくとも 1 . 5 倍の発現レベルの差が検出されるとき、前記ポリヌクレオチドがバイオマーカーの前記第 1 の群のうちの 1 つのバイオマーカーとして識別される、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

10

20

30

40

50

前記分析するステップが、ポリペプチドの前記プロファイルとポリペプチド参照プロファイルと比較し、それによって前記第2の虚血性脳卒中試料中のバイオマーカーの第2の群を識別することを含む、請求項111に記載の方法。

【請求項115】

前記ポリペプチド参照プロファイルと比較したとき、前記第2の虚血性脳卒中試料においてポリペプチドで少なくとも1.5倍の発現レベルの差が検出されるとき、前記ポリペプチドはバイオマーカーの前記第2の群のうちの1つのバイオマーカーとして識別される、請求項114に記載の方法。

【請求項116】

前記1つまたは複数のバイオマーカーを識別するステップがバイオマーカーの前記第1の群およびバイオマーカーの前記第2の群を分析することを含む、請求項112～115のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項117】

バイオマーカーの前記第1の群およびバイオマーカーの前記第2の群を分析するステップが、ポリヌクレオチドがバイオマーカーの前記第2の群のうちのポリペプチドをコードするとき、バイオマーカーの前記第1の群のうちの前記ポリヌクレオチドを虚血性脳卒中の前記1つまたは複数のバイオマーカーの1つとして識別することを含む、請求項116に記載の方法。

【請求項118】

バイオマーカーの前記第1の群およびバイオマーカーの前記第2の群を分析するステップが、ポリペプチドがバイオマーカーの前記第1の群のうちのポリヌクレオチドによってコードされるとき、バイオマーカーの前記第2の群のうちの前記ポリペプチドを虚血性脳卒中の前記1つまたは複数のバイオマーカーの1つとして識別することを含む、請求項116に記載の方法。

20

【請求項119】

前記ポリヌクレオチドが、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド19(CCL19)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21(CCL21)、ガレクチン3、進行したグリケーション最終産物の受容体(RAGE)、上皮好中球活性化タンパク質78(ENA78)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、分化抗原群30(CD30)、ケモカイン受容体7(CCR7)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン2(CSPG2)、IQモチーフ含有GTPアーゼ活性化タンパク質1(IQGAP1)、オロソムコイド1(ORM1)、アルギナーゼ1(ARG1)、リンパ球抗原96(LY96)、マトリックスメタロプロテイナーゼ9(MMP9)、炭酸脱水酵素4(CA4)、s100カルシウム結合性タンパク質A12(s100A12)、toll様受容体2(TLR2)、toll様受容体4(TLR4)、骨髄分化一次応答遺伝子88(MYD88)、Janusキナーゼ2(JAK2)、分化抗原群3(CD3)、分化抗原群4(CD4)、脾臓チロシンキナーゼ(SYK)、Aキナーゼアンカータンパク質7(AKAP7)、CCAAT/エンハンサー結合性タンパク質(CEBPB)、インターロイキン10(IL10)、インターロイキン8(IL8)、インターロイキン22受容体(IL22R)またはその活性断片の1つまたは複数を含む、請求項90、97または111に記載の方法。

30

40

【請求項120】

前記ポリペプチドが、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IG、IGG3、テニユリン1のアイソフォーム2、IGG4、ディスインテグリンのアイソフォーム2またはその活性断片のうちの少なくとも1つを含む、請求項91、98、111に記載の方法。

【請求項121】

前記ポリペプチドが、図10A、10Bまたは10Cに開示される少なくとも1つのポ

50

リペプチドを含む、請求項 9 1、9 8、1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記ポリペプチドが 1 つまたは複数のサイトカインを含み、前記 1 つまたは複数のサイトカインは、BAFF、MMP 9、APP、アグレカン、ガレクチン 3、Fas、RAGE、エフリン A 2、CD 3 0、TNF R 1、CD 2 7、CD 4 0、TNF、IL 6、IL 8、IL 1 0、IL 1、IFN γ 、RANTES、IL 1、IL 4、IL 1 7、IL 2、GM-CSF、ENA 7 8、IL 5、IL 1 2 P 7 0、TARC、Gro α 、IL 3 3、BLCBCA、IL 3 1、MCP 2 またはその任意の活性断片を含む、請求項 9 1、9 8 または 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記参照プロファイルが非虚血性脳卒中対象から得られる、請求項 9 3、9 4、9 9、1 0 2、1 1 2、1 1 3 または 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記ポリヌクレオチドが RNA または DNA である、請求項 9 0、9 7 または 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記第 1 の試料または前記第 2 の試料が血液または血液の分画を含む、請求項 8 9 または 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記第 1 の虚血性脳卒中試料または前記第 2 の虚血性脳卒中試料が血液または血液の分画を含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

対象における虚血性脳卒中を検出するためのキットであって、

a. 虚血性脳卒中のバイオマーカーの第 1 の群のうち少なくとも 1 つのバイオマーカーを検出するためのプローブであって、バイオマーカーの前記第 1 の群は生体分子の第 1 のクラスを含む、プローブの第 1 のパネル；および

b. 虚血性脳卒中のバイオマーカーの第 2 の群のうち少なくとも 1 つのバイオマーカーを検出するためのプローブであって、バイオマーカーの前記第 2 の群は生体分子の第 2 のクラスを含む、プローブの第 2 のパネル

を含むキット。

【請求項 1 2 8】

プローブの前記第 1 のパネルが虚血性脳卒中のバイオマーカーの前記第 1 の群のうち少なくとも 1 つのバイオマーカーにハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドである、請求項 1 2 7 に記載のキット。

【請求項 1 2 9】

生体分子の前記第 1 のクラスがポリヌクレオチドであり、前記ポリヌクレオチドが、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 1 9 (CCL 1 9)、ケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド 2 1 (CCL 2 1)、ガレクチン 3、進行したグリケーション最終産物の受容体 (RAGE)、上皮好中球活性化タンパク質 7 8 (ENA 7 8)、顆粒球マクローファージコロニー刺激因子 (GM-CSF)、分化抗原群 3 0 (CD 3 0)、ケモカイン受容体 7 (CCR 7)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2 (CSPG 2)、IQモチーフ含有 GTPアーゼ活性化タンパク質 1 (IQGAP 1)、オロソムコイド 1 (ORM 1)、アルギナーゼ 1 (ARG 1)、リンパ球抗原 9 6 (LY 9 6)、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (MMP 9)、炭酸脱水酵素 4 (CA 4)、s 1 0 0 カルシウム結合性タンパク質 A 1 2 (s 1 0 0 A 1 2)、toll様受容体 2 (TLR 2)、toll様受容体 4 (TLR 4)、骨髄分化一次応答遺伝子 8 8 (MYD 8 8)、Janusキナーゼ 2 (JAK 2)、分化抗原群 3 (CD 3)、分化抗原群 4 (CD 4)、脾臓チロシンキナーゼ (SYK)、キナーゼアンカータンパク質 7 (AKAP 7)、CCAAT/エンハンサー結合性タンパク質 (CEBPB)、インターロイキン 1 0 (IL 1 0)、インターロイキン 8 (IL 8)、インターロイキン 2 2 受容体 (IL 2 2 R) またはその活性断片の 1

10

20

30

40

50

つまたは複数をコードするポリヌクレオチドを含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 3 0】

生体分子の前記第 2 のクラスがポリペプチドであり、前記ポリペプチドが、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IG、IGG3、テニユーリン1のアイソフォーム2、IGG4、ディスインテグリンのアイソフォーム2またはその活性断片のうちの少なくとも1つを含む、請求項 1 2 8 に記載のキット。

【請求項 1 3 1】

前記ポリペプチドが、図 1 0 A、1 0 B または 1 0 C に開示される少なくとも1つのポリペプチドを含む、請求項 1 3 0 に記載のキット。

10

【請求項 1 3 2】

生体分子の前記第 1 のクラスが1つまたは複数のサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含み、および/または生体分子の前記第 2 のクラスが前記 1 つまたは複数のサイトカインを含む、請求項 1 2 7 に記載のキット。

【請求項 1 3 3】

前記 1 つまたは複数のサイトカインが、BAFF、MMP9、APP、アグレカン、ガレクチン3、Fas、RAGE、エフリンA2、CD30、TNR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1、IFNy、RANTES、IL1、IL4、IL17、IL2、GMCSF、ENA78、IL5、IL12P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBCA、IL31、MCP2 またはその任意の活性断片を含む、請求項 1 3 2 に記載のキット。

20

【請求項 1 3 4】

対象における虚血性脳卒中を検出するためのデバイスであって、

a. 実行可能命令を記憶するメモリ；および

b. 請求項 1 ~ 3 4、3 7 ~ 8 3 または 8 9 ~ 1 2 6 のいずれか一項に記載の方法を実施するために前記実行可能命令を実行するプロセッサを含むデバイス。

【請求項 1 3 5】

前記デバイスがフィラメントベースの診断デバイスである、請求項 1 3 4 に記載のデバイス。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

相互参照

本出願は、2015年7月10日に出願された米国仮特許出願第62/191,096号、および2016年2月26日に出願された米国仮特許出願第62/300,342号、および2016年6月21日に出願された米国仮特許出願第62/352,680号の利益を主張しており、これら米国仮特許出願は、それらの全体が参考として本明細書中に援用される。

40

【0002】

政府支援

本発明は、国立看護研究所(NINR)認可番号HHSN263201100872Pおよびロバート・ウッド・ジョンソン財団看護学部学者賞番号70319の支援でなされた。

【背景技術】

【0003】

背景

脳卒中は、脳組織への血流の中断としてしばしば規定される。具体的には、脳卒中は、脳に供給する血管の閉塞または破裂による血流の中断があるときにしばしば起こる。血栓

50

溶解剤の投与は脳卒中の有効な処置であるが、組織プラスミノゲン活性化因子（t P A）などの血栓溶解剤は有限の期間内に投与されなければならない。したがって、脳卒中の早期および迅速な診断は、処置のために決定的である。多くの場合では、虚血性脳卒中の正確な診断のために、専門家の神経学的評価がしばしば必要とされる。先進の神経画像処理が利用可能である施設では、C TまたはM R Iが診断および/または確定ツールとしてしばしば使用される。しかし、ほとんどのヘルスケア施設は、先進の画像化技術へのアクセスも脳卒中の確定診断のために必要な専門知識も有しない。理想的には、時間に敏感な方法で脳卒中を診断するためのさらなるツールを提供するのが望ましいであろう。末梢血中のバイオマーカーの発現パターンを評価することにより、時間に敏感な、ベッドサイドでの脳卒中の診断が可能になり得る。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

簡単な要旨

本明細書で、対象における虚血性脳卒中を評価するための方法、キットおよびデバイスが提供される。

【0005】

一局面では、本明細書では多くの方法が開示されている。一態様では、本方法は、対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップを含むことができる。一態様では、本方法は、無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップをさらに含むことができる。一態様では、参照試料は疑似脳卒中対象からのものであってよい。一態様では、本方法は、試料または参照試料が無細胞核酸のより高いレベルを有するかを決定するステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、評価するステップは、虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の感度および少なくとも75%の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、試料が参照と比較して無細胞核酸のより高いレベルを有すると決定するステップは、対象が虚血性脳卒中対象であることを示すことができる。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、後成的（epigenetic）マーカーを含むことができる。一態様では、後成的マーカーは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、神経血管単位からの細胞に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、シトルリン化またはその任意の組合せを含むことができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも85%の感度で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つに結合するプローブを使用して実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施することができる。一態様では、ポリメラーゼ連鎖反応は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の遺伝子またはその断片のレベルを決定することによって実施することができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素、ベータグロビン、分化抗原群240D、アルブミンファミリーのメンバー、リボヌクレアーゼP RNA構成要素H1、Alu Jエレメント、内因性レトロウイルスグループ3、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼをコードすることができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料に外因性ポリヌクレオチドを加えることを含むことができる。一態様では、外因性ポリヌクレオチドは、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子の断片を含むことができる。一態様では、無細胞核酸のレベル

20

30

40

50

を参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップは、無細胞核酸のサブグループのうち少なくとも1つの無細胞核酸に結合するプローブを検出する後成的マーカーを使用して実施することができる。一態様では、プローブは、標識を含むことができる。一態様では、標識は、蛍光色素または放射性同位体を含むことができる。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一態様では、ポリヌクレオチドは、試料中の無細胞核酸のうち少なくとも1つとハイブリダイズすることができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞DNAを含むことができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞RNAを含むことができる。一態様では、無細胞RNAは、mRNAを含むことができる。一態様では、mRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、無細胞RNAは、マイクロRNAを含むことができる。一態様では、マイクロRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、mRNAは、神経血管単位中の細胞に特異的であってよい。一態様では、無細胞核酸のうち少なくとも1つは、好中球細胞外トラップに由来することができる。一態様では、試料は、体液を含むことができる。一態様では、体液は、尿を含むことができる。一態様では、体液は、血液またはその分画を含むことができる。一態様では、体液は、血液の分画を含むことができる。一態様では、血液の分画は、血漿であってよい。一態様では、血漿は、血液を遠心分離することによって単離することができる。一態様では、血液の分画は、血清であってよい。一態様では、対象は、虚血性脳卒中症状を示し得る。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から12時間以内に対象から得ることができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に対象から得ることができる。一態様では、評価するステップは、対象の脳卒中重症度を評価することを含むことができる。一態様では、評価するステップは、自然免疫系の活性化を評価することを含むことができる。一態様では、自然免疫系の活性化を評価するステップは、対象における好中球数を決定することを含むことができる。一態様では、好中球数は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて決定することができる。一態様では、評価するステップは、対象における脳卒中により誘導された損傷を評価することを含むことができる。一態様では、脳卒中により誘導された損傷は、心筋梗塞を含むことができる。一態様では、脳卒中により誘導された損傷は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて評価することができる。一態様では、脳卒中により誘導された損傷は、米国国立衛生研究所の脳卒中スケールによって示される通りであってよい。一態様では、本方法は、好中球細胞外トラップに由来する無細胞核酸のレベルを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、本明細書に記載される方法は、評価に基づいて対象を脳卒中処置設備にトリアージするステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、対象に処置(薬)を投与するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルより高いならば投与を実施することができ、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと等しいかまたはそれより低いならば投与を実施しなくてもよい。一態様では、処置は薬物を含むことができる。一態様では、薬物は、組織プラスミノゲン活性化因子であってよい。一態様では、処置は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に投与することができる。一態様では、処置は、対象における無細胞核酸のレベルを低減することができる。一態様では、対象は、哺乳動物であってよい。一態様では、哺乳動物はヒトであってよい。一態様では、無細胞核酸の参照レベルは、データベースまたはサーバーに保存することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含む。一態様では、虚血性脳卒中症状発症の時間は、試料中の無細胞核酸のレベルを虚血性脳卒中症状発症の時間と関連させることによって決定することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも1倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも3倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、無細胞核酸の比が参照比と比較して高い

10

20

30

40

50

とき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、本方法は、対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含むことができる。一態様では、血液細胞のプロファイルは、試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含むことができる。一態様では、方法は、携帯型デバイスを使用して実施することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、異なる時点は、1週、2週、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、8カ月または1年を含むことができる。一態様では、本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップは、対象への処置の投与の後に実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、処置への対象の応答を決定するものであってよい。一態様では、応答は、処置への好ましい反応であってよい。一態様では、応答は、処置への有害反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。

10

【0006】

ある局面では、本明細書では多くの方法が開示されている。一態様では、方法は、対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップを含むことができる。一態様では、本方法は、無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップを含むことができる。一態様では、参照試料は、非虚血性脳卒中対象からのものであってよい。一態様では、本方法は、コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の感度および少なくとも75%の特異性で虚血性脳卒中を非虚血性脳卒中から区別することができる。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、後成的マーカーを含むことができる。一態様では、後成的マーカーは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、神経血管単位からの細胞に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、シトルリン化またはその任意の組合せを含むことができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも85%の感度で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つに結合するプローブを使用して実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施することができる。一態様では、ポリメラーゼ連鎖反応は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の遺伝子またはその断片のレベルを決定することによって実施することができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素、ベータグロビン、分化抗原群240D、アルブミンファミリーのメンバー、リボヌクレアーゼP、RNA構成要素H1、Alu、Jエレメント、内因性レトロウイルスグループ3、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼをコードすることができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料に外因性ポリヌクレオチドを加えることを含むことができる。一態様では、外因性ポリヌクレオチドは、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子の断片を含むことができる。一態様では、無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップは、無細胞核酸のサブグループのうちの少なくとも1つの無細胞核酸に結合するプローブを検出する後成的マーカーを使用して実施することができる。一態様では、プローブは、標識を含むことができる。

20

30

40

50

一態様では、標識は、蛍光色素または放射性同位体を含むことができる。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一態様では、ポリヌクレオチドは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つとハイブリダイズすることができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞DNAを含むことができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞RNAを含むことができる。一態様では、無細胞RNAは、mRNAを含むことができる。一態様では、mRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、無細胞RNAは、マイクロRNAを含むことができる。一態様では、マイクロRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、mRNAは、神経血管単位中の細胞に特異的であってよい。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、好中球細胞外トラップに由来することができる。一態様では、試料は、体液を含むことができる。一態様では、体液は、尿を含むことができる。一態様では、体液は、血液またはその分画を含むことができる。一態様では、体液は、血液の分画を含むことができる。一態様では、血液の分画は、血漿であってよい。一態様では、血漿は、血液を遠心分離することによって単離することができる。一態様では、血液の分画は、血清であってよい。一態様では、対象は、虚血性脳卒中症状を示すことができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から12時間以内に対象から得ることができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に対象から得ることができる。一態様では、評価するステップは、対象の脳卒中重症度を評価するステップを含むことができる。一態様では、評価するステップは、自然免疫系の活性化を評価するステップを含むことができる。一態様では、自然免疫系の活性化を評価するステップは、対象における好中球数を決定することを含まることができる。一態様では、好中球数は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて決定することができる。一態様では、評価するステップは、対象における脳卒中に誘導された損傷を評価するステップを含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、心筋梗塞を含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて評価することができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、米国国立衛生研究所の脳卒中スケールによって示される通りであってよい。一態様では、本方法は、好中球細胞外トラップに由来する無細胞核酸のレベルを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、評価に基づいて対象を脳卒中処置設備にトリアージするステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、対象に処置を投与するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルより高いならば投与を実施することができ、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと等しいかまたはそれより低いならば投与を実施してしなくてもよい。一態様では、処置は薬物を含むことができる。一態様では、薬物は、組織プラスミノゲン活性化因子であってよい。一態様では、処置は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に投与することができる。一態様では、処置は、対象における無細胞核酸のレベルを低減することができる。一態様では、対象は、哺乳動物であってよい。一態様では、哺乳動物はヒトであってよい。一態様では、無細胞核酸の参照レベルは、データベースまたはサーバーに保存することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含むことができる。一態様では、虚血性脳卒中症状発症の時間は、試料中の無細胞核酸のレベルを虚血性脳卒中症状発症の時間と関連させることによって決定することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも1倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも3倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、無細胞核酸の比が参照比と比較して高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、本方法は、対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含むことができる。一態様では、血液細胞のプロファイルは、試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳

10

20

30

40

50

型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含むことができる。一態様では、方法は、携帯型デバイスを使用して実施することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、異なる時点は、1週、2週、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、8カ月または1年を含むことができる。一態様では、本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップは、対象への処置の投与の後に実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、処置への対象の応答を決定するものであってよい。一態様では、応答は、処置への好ましい反応であってよい。一態様では、応答は、処置への有害反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。

【0007】

一つの局面では、本明細書では多くの方法が開示される。一態様では、方法は、後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するステップを含むことができる。一態様では、無細胞核酸は、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中にある。一態様では、本方法は、無細胞核酸のレベルを参照試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸の参照レベルと比較するステップをさらに含むことができる。一態様では、参照試料は、健康対照対象または疑似脳卒中対象からのものであってよい。一態様では、本方法は、コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含むことができ、評価するステップは、虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の感度および少なくとも75%の特異性で虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、無細胞核酸のうち少なくとも1つは、後成的マーカーを含むことができる。一態様では、後成的マーカーは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、神経血管単位からの細胞に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、シトルリン化またはその任意の組合せを含むことができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも85%の感度で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の無細胞核酸のうち少なくとも1つに結合するプローブを使用して実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施することができる。一態様では、ポリメラーゼ連鎖反応は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の遺伝子またはその断片のレベルを決定することによって実施することができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素、ベータグロビン、分化抗原群240D、アルブミンファミリーのメンバー、リボヌクレアーゼP RNA構成要素H1、Alu Jエレメント、内因性レトロウイルスグループ3、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼをコードすることができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料に外因性ポリヌクレオチドを加えることを含むことができる。一態様では、外因性ポリヌクレオチドは、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子の断片を含むことができる。一態様では、無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップは、無細胞核酸のサブグループのうち少なくとも1つの無細胞核酸に結合するプローブを検出する後成的マーカーを使用して実施することができる。一態様では、プローブは、標識を含むことができる。一態様では、標識は、

10

20

30

40

50

蛍光色素または放射性同位体を含むことができる。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一態様では、ポリヌクレオチドは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つとハイブリダイズすることができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞DNAを含むことができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞RNAを含むことができる。一態様では、無細胞RNAは、mRNAを含むことができる。一態様では、mRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、無細胞RNAは、マイクロRNAを含むことができる。一態様では、マイクロRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、mRNAは、神経血管単位中の細胞に特異的であってよい。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、好中球細胞外トラップに由来することができる。一態様では、試料は、体液を含むことができる。一態様では、体液は、尿を含むことができる。一態様では、体液は、血液またはその分画を含むことができる。一態様では、体液は、血液の分画を含むことができる。一態様では、血液の分画は、血漿であってよい。一態様では、血漿は、血液を遠心分離することによって単離することができる。一態様では、血液の分画は、血清であってよい。一態様では、対象は、虚血性脳卒中症状を示すことができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から12時間以内に対象から得ることができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に対象から得ることができる。一態様では、評価するステップは、対象の脳卒中重症度を評価することを含むことができる。一態様では、評価するステップは、自然免疫系の活性化を評価することを含むことができる。一態様では、自然免疫系の活性化を評価するステップは、対象における好中球数を決定することを含むことができる。一態様では、好中球数は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて決定することができる。一態様では、評価するステップは、対象において脳卒中に誘導された損傷を評価することを含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、心筋梗塞を含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて評価することができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、米国国立衛生研究所の脳卒中スケールによって示される通りであってよい。一態様では、本方法は、好中球細胞外トラップに由来する無細胞核酸のレベルを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、評価に基づいて対象を脳卒中処置設備にトリアージするステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、対象に処置を投与するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルより高いならば投与を実施することができ、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと等しいかまたはそれより低いならば投与を実施してしなくてもよい。一態様では、処置は薬物を含むことができる。一態様では、薬物は、組織プラスミノゲン活性化因子であってよい。一態様では、処置は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に投与することができる。一態様では、処置は、対象における無細胞核酸のレベルを低減することができる。一態様では、対象は、哺乳動物であってよい。一態様では、哺乳動物はヒトであってよい。一態様では、無細胞核酸の参照レベルは、データベースまたはサーバーに保存することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含むことができる。一態様では、虚血性脳卒中症状発症の時間は、試料中の無細胞核酸のレベルを虚血性脳卒中症状発症の時間と関連させることによって決定することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップをさらに含む。一態様では、本方法は、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも1倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも3倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、無細胞核酸の比が参照比と比較して高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、本方法は、対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含むことができる。一態様では、血液細胞のプロファイルは、試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリット

10

20

30

40

50

パーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含むことができる。一態様では、方法は、携帯型デバイスを使用して実施することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、異なる時点は、1週、2週、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、8カ月または1年を含むことができる。一態様では、本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップは、対象への処置の投与の後に実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、処置への対象の応答を決定するものであってよい。一態様では、応答は、処置への好ましい反応であってよい。一態様では、応答は、処置への有害反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。

10

【0008】

一態様では、本明細書で方法が開示される。一態様では、本方法は、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップを含むことができる。本方法は、無細胞核酸のサブグループのレベルを測定するステップをさらに含むことができる。一態様では、無細胞核酸のサブグループは、後成的マーカーを有することができる。一態様では、本方法は、無細胞核酸のレベルと無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比を決定するステップをさらに含むことができる。本方法は、無細胞核酸のレベルと無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比を参照比と比較するステップであって、参照比は、参照試料中の無細胞核酸のレベルと参照試料中の無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比であり、参照試料中の無細胞核酸のサブグループは後成的マーカーを有するステップをさらに含むことができる。一態様では、参照試料は、健康対照対象または疑似脳卒中対象からのものであってよい。一態様では、本方法は、コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含むことができ、評価するステップは、虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の感度および少なくとも75%の特異性で虚血性脳卒中を健康対照または疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、後成的マーカーを含むことができる。一態様では、後成的マーカーは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、神経血管単位からの細胞に特異的であってよい。一態様では、後成的マーカーは、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、シトルリン化またはその任意の組合せを含むことができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも85%の感度で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、評価するステップは、少なくとも80%の特異性で虚血性脳卒中を疑似脳卒中から区別することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つに結合するプローブを使用して実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、ポリメラーゼ連鎖反応によって実施することができる。一態様では、ポリメラーゼ連鎖反応は、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料中の遺伝子またはその断片のレベルを決定することによって実施することができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素、ベータグロビン、分化抗原群240D、アルブミンファミリーのメンバー、リボヌクレアーゼP RNA構成要素H1、Alu Jエレメント、内因性レトロウイルスグループ3、グリセルアルデヒド3-リン酸デヒドロゲナーゼ、N-アセチルグルコサミンキナーゼまたはアルコールデヒドロゲナーゼをコードすることができる。一態様では、遺伝子は、テロメラーゼ逆転写酵素であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップは、試料に外因性ポリヌクレオチドを加えることを含むことができる。一態

20

30

40

50

様では、外因性ポリヌクレオチドは、緑色蛍光タンパク質をコードする遺伝子の断片を含むことができる。一態様では、無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップは、無細胞核酸のサブグループのうちの少なくとも1つの無細胞核酸に結合するプローブを検出する後成的マーカーを使用して実施することができる。一態様では、プローブは、標識を含むことができる。一態様では、標識は、蛍光色素または放射性同位体を含むことができる。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一態様では、ポリヌクレオチドは、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つとハイブリダイズすることができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞DNAを含むことができる。一態様では、無細胞核酸は、無細胞RNAを含むことができる。一態様では、無細胞RNAは、mRNAを含むことができる。一態様では、mRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、無細胞RNAは、マイクロRNAを含むことができる。一態様では、マイクロRNAは、1つまたは複数の細胞型に特異的であってよい。一態様では、mRNAは、神経血管単位中の細胞に特異的であってよい。一態様では、無細胞核酸のうちの少なくとも1つは、好中球細胞外トラップに由来することができる。一態様では、試料は、体液を含むことができる。一態様では、体液は、尿を含むことができる。一態様では、体液は、血液またはその分画を含むことができる。一態様では、体液は、血液の分画を含むことができる。一態様では、血液の分画は、血漿であってよい。一態様では、血漿は、血液を遠心分離することによって単離することができる。一態様では、血液の分画は、血清であってよい。一態様では、対象は、虚血性脳卒中症状を示すことができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から12時間以内に対象から得ることができる。一態様では、試料は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に対象から得ることができる。一態様では、評価するステップは、対象の脳卒中重症度を評価するステップを含むことができる。一態様では、評価するステップは、自然免疫系の活性化を評価するステップを含むことができる。一態様では、自然免疫系の活性化を評価するステップは、対象における好中球数を決定することを含むことができる。一態様では、好中球数は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて決定することができる。一態様では、評価するステップは、対象における脳卒中に誘導された損傷を評価するステップを含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、心筋梗塞を含むことができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて評価することができる。一態様では、脳卒中に誘導された損傷は、米国国立衛生研究所の脳卒中スケールによって示される通りであってよい。一態様では、本方法は、好中球細胞外トラップに由来する無細胞核酸のレベルを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、評価に基づいて対象を脳卒中処置設備にトリアーゼするステップをさらに含むことができる。一態様では、方法は、対象に処置を投与するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルより高いならば投与を実施することができ、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと等しいかまたはそれより低いならば投与を実施してしなくてもよい。一態様では、処置は薬物を含むことができる。一態様では、薬物は、組織プラスミノゲン活性化因子であってよい。一態様では、処置は、虚血性脳卒中症状発症から4.5時間以内に投与することができる。一態様では、処置は、対象における無細胞核酸のレベルを低減することができる。一態様では、対象は、哺乳動物であってよい。一態様では、哺乳動物はヒトであってよい。一態様では、無細胞核酸の参照レベルは、データベースまたはサーバーに保存することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含むことができる。一態様では、虚血性脳卒中症状発症の時間は、試料中の無細胞核酸のレベルを虚血性脳卒中症状発症の時間と相関させることによって決定することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少なくとも1倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一態様では、対象における無細胞核酸のレベルが無細胞核酸の参照レベルと比較して少な

10

20

30

40

50

くとも3倍より高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、比が参照比と比較して高いとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一態様では、本方法は、対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含むことができる。一態様では、血液細胞のプロファイルは、試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含むことができる。一態様では、方法は、携帯型デバイスを使用して実施することができる。一態様では、本方法は、対象における虚血性脳卒中をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、本方法は、対象をモニタリングするために、異なる時点で本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップをさらに含むことができる。一態様では、異なる時点は、1週、2週、1カ月、2カ月、3カ月、6カ月、8カ月または1年を含むことができる。一態様では、本明細書に記載される任意の1つまたは複数の方法を繰り返すステップは、対象への処置の投与の後に実施することができる。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、処置への対象の応答を決定するものであってよい。一態様では、応答は、処置への好ましい反応であってよい。一態様では、応答は、処置への有害反応であってよい。一態様では、試料中の無細胞核酸のレベルは、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。

10

20

30

40

50

【0009】

本明細書で、デバイスが開示される。一態様では、デバイスは、実行可能命令を記憶するメモリを含むことができる。一態様では、デバイスは、本明細書が開示される方法のうちの任意の1つまたは複数の方法を実施するために、実行可能命令を実行するプロセッサをさらに含むことができる。一態様では、デバイスは、フィラメントベースの診断デバイスであってよい。

【0010】

本明細書で、キットが開示される。一態様では、キットは、対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブであって、試料中の無細胞核酸のうちの少なくとも1つに結合するプローブを含むことができる。一態様では、キットは、無細胞核酸のうちの少なくとも1つへのプローブの結合を検査するための検出試薬をさらに含むことができる。一態様では、プローブは標識されてもよい。一態様では、プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドであってよい。

【0011】

本明細書で、キットが開示される。一態様では、キットは、対象からの試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブであって、後成的マーカーを有する無細胞核酸に結合するプローブを含むことができる。一態様では、キットは、無細胞核酸とのプローブの結合を検査するための検出試薬をさらに含むことができる。一態様では、プローブは、標識されてもよい。一態様では、プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。一態様では、プローブは、ポリヌクレオチドであってよい。

【0012】

一態様では、本明細書で、状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示される。本方法は、(a) プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中の2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーを含むバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合するステップ；(b) 試料中のバイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップであって、参照は、健康対照対象および疑似脳卒中対象におけるバイオマーカーの群の発現を含むことができるステップ；ならびに(c) コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、少なくとも92%の

感度および少なくとも92%の特異性で健康対照からの虚血性脳卒中および疑似脳卒中からの虚血性脳卒中を区別することができるステップを含むことができる。一部の 경우에는、プローブは標識されてもよい。一部の 경우에는、標識プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質を含むことができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、Ras - ERK経路の阻害剤を含むことができる。一部の 경우에는、Ras - ERK経路の阻害剤は、GRB2関連アダプタータンパク質であってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバーを含むことができる。一部の 경우에는、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバーは、DNA結合阻害剤3であってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、リソソームシステインプロテイナーゼを含むことができる。一部の 경우에는、リソソームシステインプロテイナーゼは、カテプシンであってよい。一部の 경우에는、カテプシンは、カテプシンZであってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、運動タンパク質を含むことができる。一部の 경우에는、運動タンパク質は、キネシン様タンパク質であってよい。一部の 경우에는、キネシン様タンパク質は、キネシン様タンパク質1Bであってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、色素上皮層由来因子の受容体を含むことができる。一部の 경우에는、色素上皮層由来因子の受容体は、プレキシンドメイン含有タンパク質であってよい。一部の 경우에는、プレキシンドメイン含有タンパク質は、プレキシンドメイン含有タンパク質2であってよい。一部の 경우에는、本方法は、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうち少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 実施形態では、増加は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の 경우에는、本方法は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質ならびにDNA結合阻害剤3のうち少なくとも1つの発現が減少したときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、減少は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の 경우에는、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうち少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するとき、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質およびDNA結合阻害剤3のうち少なくとも1つの発現が減少するとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群の発現は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応またはその組合せを使用して測定することができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群の発現は、ポリメラーゼ連鎖反応によって測定することができる。一部の 경우에는、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一部の 경우에는、参照は、データベースまたはサーバーに保存することができる。一部の 경우에는、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現は、RNA発現、タンパク質発現またはその組合せを含むことができる。

【0013】

別の態様では、本明細書で、状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示される。本方法は：(a) プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中の2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーを含むバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合するステップ；(b) 試料中のバイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップであって、参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの群の発現であってよいステップ；ならびに(c) コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、バイオマーカーの群のうち2つのバイオマーカーの発現に基づき少なくとも92%の感度および少なくとも92%の特異性を有

10

20

30

40

50

することができるステップを含むことができる。一部の 경우에는、プローブは標識されてもよい。一部の 경우에는、標識プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質を含むことができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、Ras - ERK 経路の阻害剤を含むことができる。一部の 경우에는、Ras - ERK 経路の阻害剤は、GRB2 関連アダプタータンパク質であってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、DNA 結合ファミリーの阻害剤のメンバーを含む。一部の 경우에는、DNA 結合ファミリーの阻害剤のメンバーは、DNA 結合阻害剤3であってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、リソソームシステインプロテイナーゼを含むことができる。一部の 경우에는、リソソームシステインプロテイナーゼは、カテプシンであってよい。一部の 경우에는、カテプシンは、カテプシンZであってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、運動タンパク質を含むことができる。一部の 경우에는、運動タンパク質は、キネシン様タンパク質であってよい。一部の 경우에는、キネシン様タンパク質は、キネシン様タンパク質1Bであってよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、色素上皮層由来因子の受容体を含むことができる。一部の 경우에는、色素上皮層由来因子の受容体は、プレキシンドメイン含有タンパク質であってよい。一部の 경우에는、プレキシンドメイン含有タンパク質は、プレキシンドメイン含有タンパク質2であってよい。一部の 경우에는、本方法は、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ3、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 実施形態では、増加は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の 경우에는、本方法は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2 関連アダプタータンパク質ならびにDNA 結合阻害剤3のうちの少なくとも1つの発現が減少したときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、減少は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の 경우에는、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ3、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するとき、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2 関連アダプタータンパク質およびDNA 結合阻害剤3のうちの少なくとも1つの発現が減少するとき、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群の発現は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応またはその組合せを使用して測定することができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群の発現は、ポリメラーゼ連鎖反応によって測定することができる。一部の 경우에는、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一部の 경우에는、参照は、データベースまたはサーバーに保存することができる。一部の 경우에는、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現は、RNA 発現、タンパク質発現またはその組合せを含むことができる。

【0014】

別の態様では、本明細書で、状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示される。本方法は、(a) 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの群は、(i) 炭疽毒素受容体、(ii) セリン/トレオニン - プロテインキナーゼ、(iii) ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼおよび(iv) 分化抗原群ファミリーメンバーのうちの2つまたはそれよりも多くを含むことができるステップ；(b) 試料中のバイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップであって、参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの群の発現であってよいステップ；ならびに(c) コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップを含むことができる。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体を含むことがで

10

20

30

40

50

きる。一部の場合には、炭疽毒素受容体は、炭疽毒素受容体2であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼを含むことができる。一部の場合には、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼは、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼを含むことができる。一部の場合には、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼは、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、分化抗原群ファミリーメンバーを含むことができる。一部の場合には、分化抗原群ファミリーメンバーは、分化抗原群163であってよい。一部の場合には、本方法は、バイオマーカーの群のうち少なくとも1つのバイオマーカーの発現が参照と比較して増加するときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の実施形態では、増加は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は：(i) ミエリンおよびリンパ球タンパク質、(ii) Ras-ERK経路の阻害剤、(iii) DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバー、(iv) リソソームシステインプロテイナーゼ、(v) 運動タンパク質、および(vi) 色素上皮層由来因子の受容体、のうち1つまたは複数を含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの群は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質を含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの群は、Ras-ERK経路の阻害剤を含むことができる。一部の場合には、Ras-ERK経路の阻害剤は、GRB2関連アダプタータンパク質であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバーを含むことができる。一部の場合には、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバーは、DNA結合阻害剤3であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、リソソームシステインプロテイナーゼを含むことができる。一部の場合には、リソソームシステインプロテイナーゼは、カテプシンであってよい。一部の場合には、カテプシンは、カテプシンZであってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、運動タンパク質を含むことができる。一部の場合には、運動タンパク質は、キネシン様タンパク質であってよい。一部の場合には、キネシン様タンパク質は、キネシン様タンパク質1Bであってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、色素上皮層由来因子の受容体を含むことができる。一部の場合には、色素上皮層由来因子の受容体は、プレキシンドメイン含有タンパク質であってよい。一部の場合には、プレキシンドメイン含有タンパク質は、プレキシンドメイン含有タンパク質2であってよい。一部の場合には、本方法は、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうち少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の実施形態では、増加は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の場合には、本方法は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質ならびにDNA結合阻害剤3のうち少なくとも1つの発現が減少したときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、減少は、参照と比較して少なくとも1倍であってよい。一部の場合には、本方法は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうち少なくとも1つの発現が参照と比較して増加するときに、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質およびDNA結合阻害剤3のうち少なくとも1つの発現が減少するときに、対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応またはその組合せを使用して測定することができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、ポリメラーゼ連鎖反応によって測定することができる。一部の場合には、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一部の場合には、参照は、データベースまたはサーバーに保存することができる

10

20

30

40

50

。一部の場合には、対象からの試料中ののバイオマーカーの群の発現は、RNA発現、タンパク質発現またはその組合せを含むことができる。

【0015】

別の態様では、本明細書で、疾患または状態を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示される。本方法は、(a)標識プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうち2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b)バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップであって、参照は、非虚血性脳卒中対象におけるバイオマーカーの群の発現であってよいステップ；ならびに(c)コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、それにより、参照における2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの発現より多い量での試料における2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの発現は虚血性脳卒中を示すことができるステップを含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの群は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質、DNA結合阻害剤3、カテプシンZ、キネシン様タンパク質1Bおよびプレキシンドメイン含有タンパク質2のうち1つまたは複数をさらに含むことができる。一部の場合には、標識プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163を含むバイオマーカーの第1のサブグループ、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質およびDNA結合阻害剤3のうち1つまたは複数を含むバイオマーカーの第2のサブグループを含むことができる。一部の場合には、参照と比較して、バイオマーカーの第1のサブグループの発現が少なくとも1倍増加し、バイオマーカーの第2のサブグループの発現が少なくとも1倍減少するとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一部の場合には、バイオマーカーの第1のサブグループは、カテプシンZ、キネシン様タンパク質1Bおよびプレキシンドメイン含有タンパク質2のうち1つまたは複数をさらに含む。一部の場合には、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4、分化抗原群163、カテプシンZ、キネシン様タンパク質1Bおよびプレキシンドメイン含有タンパク質2を含むバイオマーカーの第1のサブグループを含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの第2のサブグループは、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質およびDNA結合阻害剤3を含むことができる。一部の態様では、参照と比較して、バイオマーカーの第1のサブグループの発現が少なくとも1倍増加し、バイオマーカーの第2のサブグループの発現が少なくとも1倍減少するとき、対象における虚血性脳卒中を検出することができる。一部の場合には、対象の虚血性脳卒中は少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性で検出することができる。一部の場合には、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163を含むことができ、対象の虚血性脳卒中は少なくとも98%の感度および少なくとも98%の特異性で検出することができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応またはその組合せを使用して測定することができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、ポリメラーゼ連鎖反応によって測定することができる。一部の場合には、ポリメラーゼ連鎖反応は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応であってよい。一部の場合には、プローブは、対象における虚血性脳卒中症状発症から24時間以内に試料と接触させることができる。一部の場合には、プローブは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、バイオマーカーの群のmRNAとハイブリダイズすることができる。一部の

10

20

30

40

50

場合には、ポリヌクレオチドは、バイオマーカーの群の mRNA に由来する DNA とハイブリダイズすることができる。一部の場合には、プローブは、ポリペプチドを含むことができる。一部の場合には、ポリペプチドは、バイオマーカーの群のタンパク質に結合することができる。一部の場合には、ポリペプチドは、抗体またはその断片であってよい。一部の場合には、非虚血性脳卒中対象は、一過性虚血発作、非虚血性脳卒中または疑似脳卒中を有することができる。一部の場合には、非虚血性脳卒中は、出血性脳卒中であってよい。一部の場合には、参照は、データベースまたはサーバーに保存することができる。一部の場合には、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現は、RNA 発現、タンパク質発現またはその組合せを含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、将来の虚血性脳卒中の予測的指標であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、虚血性脳卒中の重症度の指標であってよい。一部の場合には、方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、虚血性脳卒中症状発症の時間は、試料中のバイオマーカーの群の発現を虚血性脳卒中症状発症の時間と関連させることによって決定することができる。一部の場合には、虚血性脳卒中は、虚血脳卒中症状発症から 24 時間以内に検出することができる。一部の場合には、虚血性脳卒中は、虚血脳卒中症状発症から 4.5 時間以内に検出することができる。一部の場合には、方法は、虚血性脳卒中が検出されたならば対象における虚血性脳卒中を処置するための薬物を投与するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、薬物は、組織プラスミノゲン活性化因子であってよい。一部の場合には、薬物は、対象におけるバイオマーカーの群のうちの 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現または機能を低減または阻害する。一部の場合には、薬物は、対象におけるバイオマーカーの群のうちの 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現または機能を増加させる。一部の場合には、薬物は、虚血脳卒中症状発症から 4.5 時間以内に投与することができる。一部の場合には、対象はヒトであってよい。一部の場合には、試料は、血液または血液の分画であってよい。一部の場合には、血液の分画は、血漿または血清であってよい。一部の場合には、方法は、対象における血液細胞のプロファイルを測定するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、血液細胞のプロファイルは、試料中の白血球分化、筋肉型クレアチンキナーゼおよび脳型クレアチンキナーゼのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数、好中球パーセントまたはその組合せを含むことができる。一部の場合には、測定するステップおよび評価するステップは、携帯型デバイスを使用して実施することができる。一部の場合には、対象における虚血性脳卒中を評価するステップは、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価するステップを含むことができる。一部の場合には、疾患または状態は、虚血性脳卒中であってよい。一部の場合には、疾患または状態は、疑似脳卒中であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群のうちの 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現が参照と比較して増加するならば、対象に虚血性脳卒中の可能性があり得る。一部の場合には、バイオマーカーの群のうちの 1 つまたは複数のバイオマーカーの発現が参照と比較して減少するならば、対象に虚血性脳卒中の可能性があり得る。一部の場合には、虚血性脳卒中の可能性は、第 2 の評価によって示すことができる。一部の場合には、虚血性脳卒中の検出は、第 2 の評価によって示すことができる。一部の場合には、第 2 の評価は、神経画像処理技術を使用して実施することができる。一部の場合には、神経画像処理技術は、コンピュータ断層撮影スキャン、磁気共鳴画像法またはその組合せであってよい。一部の場合には、方法は、試料中のバイオマーカーの群の発現を繰り返し測定するステップ、バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ、および虚血性脳卒中をモニタリングするために異なる時点で虚血性脳卒中を評価するステップをさらに含むことができる。一部の場合には、異なる時点は、1 週、2 週、1 カ月、2 カ月、3 カ月、6 カ月、8 カ月または 1 年以内であってよい。一部の場合には、試料中のバイオマーカーの群の発現を繰り返し測定するステップ、バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ、および虚血性脳卒中を評価するステップは、対象への処置の投与の後に実施することができる。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、処置への対象の応答を決定するものであってよい。一部の

10

20

30

40

50

場合には、応答は、有害反応であってよい。一部の場合には、応答は、処置への有益な反応であってよい。一部の場合には、バイオマーカーの群の発現は、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。

【0016】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示される。本方法は、(a)プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b)バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ；ならびに(c)コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性を有するステップを含むことができる。

10

【0017】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示され、本方法は、(a)イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応およびその組合せからなる群から選択されるアッセイを使用して、試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b)バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ；ならびに(c)コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップを含む。

20

【0018】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示され、本方法は、(a)プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b)バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ；ならびに(c)コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、バイオマーカーの群のうちの少なくとも1つのバイオマーカーの発現が少なくとも1倍増加するならば、対象における虚血性脳卒中が検出されるステップを含む。

30

【0019】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価する方法が開示され、本方法は、(a)イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応およびその組合せからなる群から選択されるアッセイを使用して、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、アッセイは、標識プローブのパネルを試料と接触させることによって実施することができ、標識プローブはバイオマーカーの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b)バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ；ならびに(c)コンピュータシステムを使用して対象における虚血性脳卒中を評価するステップであって、バイオマーカーの群のうちの少なくとも1つのバイオマーカーの発現が少なくとも1倍増加するならば、対象における虚血性脳卒中が検出され、評価するステップが少なくとも90%の感度および少なくとも90%の特異性を有するステップを含む。

40

50

【0020】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象の処置への応答を予測する方法が開示され、本方法は、(a) 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカの群の発現を測定するステップであって、標識プローブはバイオマーカの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b) バイオマーカの群の発現を参照と比較するステップ；(c) 対象に処置を投与するステップ；ならびに(d) 処置への対象の応答を予測するステップを含む。

10

【0021】

別の態様では、本明細書で、薬物を評価する方法が開示され、本方法は、(a) 標識プローブのパネルを試料と接触させることによって対象からの試料中のバイオマーカの群の発現を測定するステップであって、標識プローブはバイオマーカの群またはそれに由来する分子に結合し、バイオマーカの群は、炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むステップ；(b) 対象に薬物を投与するステップ；(c) プローブを第2の試料と接触させるステップであって、第2の試料は対象に薬物が投与された後に対象から得られるステップ；(d) 第1の試料中のバイオマーカの群の発現および第2の試料中のバイオマーカの群の発現を比較するステップ；ならびに(e) 第1の試料中のバイオマーカの群の発現と第2の試料中のバイオマーカの群の発現の間の差を分析することによって薬物を評価するステップを含む。

20

【0022】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットが開示され、本キットは、(a) 2つまたはそれよりも多くのバイオマーカを含むバイオマーカの群の発現を測定するためのプローブであって、バイオマーカの群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；(b) プローブとバイオマーカの群との結合を検査するための検出試薬を含み、バイオマーカの群のうちの2つのバイオマーカの発現に基づき少なくとも92%の感度および少なくとも92%の特異性で虚血性脳卒中を評価する。

30

【0023】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットが開示され、本キットは、(i) 炭疽毒素受容体、(ii) セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、(iii) ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、および(iv) 分化抗原群、のうちの2つまたはそれよりも多くを含むバイオマーカの群の発現を測定するためのプローブであって、バイオマーカの群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；ならびに(b) プローブとバイオマーカの群との結合を検査するための検出試薬を含む。一部の場合には、バイオマーカの群は、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、Ras-Erk経路の阻害剤、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバー、リソソームシステインプロテイナーゼ、運動タンパク質、および色素上皮層由来因子の受容体をさらに含む。

40

【0024】

別の態様では、本明細書で、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象における虚血性脳卒中を評価するためのキットが開示され、本キットは、(a) 炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4および分化抗原群163のうちの2つまたはそれよりも多くを含むバイオマーカの群の発現を測定するためのプローブであって、バイオマーカの群またはそれに由来する分子に結合するプローブのパネル；(b) プローブとバイオマーカの群との結合を検査するための検出試薬を含む。一部の場合には、バイオマーカの群は、ミエ

50

リンおよびリンパ球タンパク質、GRB2関連アダプタータンパク質、DNA結合阻害剤3、カテプシンZ、キネシン様タンパク質1Bおよびプレキシンドメイン含有タンパク質2をさらに含むことができる。一部の場合には、プローブのパネルは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、バイオマーカの群のmRNAとハイブリダイズすることができる。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、バイオマーカの群のmRNAに由来するDNAとハイブリダイズすることができる。一部の場合には、プローブのパネルは、ポリペプチドを含むことができる。一部の場合には、ポリペプチドは、バイオマーカの群のタンパク質に結合することができる。一部の場合には、ポリペプチドは、抗体またはその断片であってよい。一部の場合には、プローブのパネルのうち少なくとも1つのプローブは、標識されてよい。一部の場合には、プローブのパネルのうち少なくとも1つのプローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてよい。一部の場合には、検出試薬は、プローブのパネルに結合することができる。一部の場合には、検出試薬は、蛍光性または放射性的な標識を含むことができる。一部の場合には、キットは、バイオマーカの群と参照の間の発現の差を分析するためのコンピュータ可読媒体をさらに含むことができる。

10

20

30

40

50

【0025】

一態様では、本明細書で、対象における虚血性脳卒中を検出する方法が提供され、本方法は、a)対象からの第1の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群のプロファイル測定するステップであって、バイオマーカの第1の群は生体分子の第1のクラスを含み、生体分子の第1のクラスはポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、アダプターまたは脂質のうち少なくとも1つを含むステップ；b)対象からの第2の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイル測定するステップであって、バイオマーカの第2の群は生体分子の第2のクラスを含み、生体分子の第2のクラスは生体分子の第1のクラスと異なることができ、生体分子の第2のクラスはポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物、アダプターまたは脂質のうち少なくとも1つを含むステップ；c)虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群のプロファイルおよび虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルをコンピュータシステムにより分析するステップ；ならびにd)対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含む。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは、ポリヌクレオチドを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第2のクラスは、ポリペプチドを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは、アダプターを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第2のクラスは、アダプターを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第1のクラスはポリヌクレオチドを含むことができ、生体分子の第2のクラスはポリペプチドを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは1つまたは複数のサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、および/または生体分子の第2のクラスは1つまたは複数のサイトカインを含むことができる。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルは、質量分析、多重アッセイ、マイクロアレイ、酵素結合免疫吸着検定法またはその任意の組合せによって測定することができる。一部の場合には、分析するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群のプロファイルを参照プロファイルと比較するステップを含むことができる。一部の場合には、分析するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルを参照プロファイルと比較するステップを含むことができる。一部の場合には、検出するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群のプロファイルにおける、および/または虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルにおける発現パターンを識別するステップを含むことができる。一部の場合には、検出するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群のプロファイルにおける、および/または虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルにおける発現パターンを識別するステップを含むことができる。

【0026】

別の態様では、本明細書で、対象における虚血性脳卒中を検出する方法が開示され、本

方法は、a) 対象からの第1の試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイル測定するステップ; b) 対象からの第2の試料中の血液細胞のプロファイル測定するステップ; c) 虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルおよび血液細胞のプロファイルをコンピュータシステムにより分析するステップ; ならびに d) 対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含む。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、ポリヌクレオチドであってよい。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、ポリペプチドであってよい。一部の場合には、分析するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルを参照プロファイルと比較することを含むことができる。一部の場合には、血液細胞のプロファイルを測定するステップは、CK-MB、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数または好中球パーセントのうち少なくとも1つを測定することを含むことができる。一部の場合には、血液細胞のプロファイルを測定するステップは、第2の試料中の白血球差 (white blood cell differential) を測定することを含むことができる。一部の場合には、分析するステップは、白血球差を白血球差参照プロファイルと比較することを含むことができる。一部の場合には、検出するステップは、虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルにおける、および/または血液細胞のプロファイルにおける発現パターンを識別することを含むことができる。一部の場合には、発現パターンは、対象における虚血性脳卒中の指標となることができる。一部の場合には、発現パターンはバイオマーカー発現の比であってよい。一部の場合には、発現パターンは、疾患および非疾患試料での1つまたは複数のバイオマーカーの相対発現レベルであってよい。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルは、質量分析、多重アッセイ、マイクロアレイ、酵素結合免疫吸着検定法またはその任意の組合せによって測定することができる。一部の場合には、対象はヒトであってよい。一部の場合には、検出するステップは、対象における疑似脳卒中の存在または不在を評価することを含むことができる。一部の場合には、本明細書に開示される方法は、対象における虚血性脳卒中の転帰を予測することができる。一部の場合には、本明細書で開示される方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定することができる。一部の場合には、虚血性脳卒中症状発症の時間は、バイオマーカーのプロファイルを虚血性脳卒中症状発症の時間と関連させることによって決定することができる。一部の場合には、虚血性脳卒中は、虚血性脳卒中発症から24時間以内に検出することができる。一部の場合には、虚血性脳卒中は、虚血性脳卒中発症から4.5時間以内に検出することができる。一部の場合には、本明細書で提供される方法は、対象に組織プラスミノゲン活性化因子を投与するステップをさらに含むことができる。

【0027】

一態様では、本明細書で、虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーを識別する方法がさらに開示され、本方法は、a) 第1の虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ; b) 第2の虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイルを測定するステップ; c) ポリヌクレオチドのプロファイルおよびポリペプチドのプロファイルを分析するステップ; ならびに d) 虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーを識別するステップを含む。一部の場合には、分析するステップは、ポリヌクレオチドのプロファイルをポリヌクレオチド参照プロファイルと比較し、それによって第1の虚血性脳卒中試料中のバイオマーカーの第1の群を識別することを含むことができる。一部の場合には、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較したとき、第1の虚血性脳卒中試料において、ポリヌクレオチドで少なくとも1.5倍の発現レベルの差が検出されるとき、ポリヌクレオチドはバイオマーカーの第1の群のうち1つのバイオマーカーとして識別することができる。一部の場合には、分析するステップは、ポリペプチドのプロファイルをポリペプチド参照プロファイルと比較し、それによって第2の虚血性脳卒中試料中のバイオマーカーの第2の群を識別することを含むことができる。一部の場合には、ポリペプチド参照プロファイルと比較したとき、第2の虚血性脳卒中試料において、ポリペプチドで少なくとも1.5倍の発現レベルの差が検出されるとき、ポリペプチドはバイオマーカーの第2の群のうち1つのバイオマーカーとして識別することができる。一部

10

20

30

40

50

の場合には、1つまたは複数のバイオマーカーを識別するステップは、バイオマーカーの第1の群およびバイオマーカーの第2の群を分析することを含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの第1の群のおよびバイオマーカーの第2の群を分析するステップは、ポリヌクレオチドがバイオマーカーの第2の群のポリペプチドをコードするとき、バイオマーカーの第1の群のポリヌクレオチドを虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーのうちの一つとして識別することを含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの第1の群およびバイオマーカーの第2の群を分析するステップは、ポリペプチドがバイオマーカーの第1の群のポリヌクレオチドによってコードされる時、バイオマーカーの第2の群のポリペプチドを虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーのうちの一つとして識別することを含むことができる。一部の場合には、ポリペプチドのプロファイルは、質量分析、多重アッセイ、マイクロアレイ、酵素結合免疫吸着検定法またはその任意の組合せによって測定することができる。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド19(CCL19)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21(CCL21)、ガレクチン3、進行したグリケーション最終産物の受容体(RAGE)、上皮好中球活性化タンパク質78(ENA78)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、分化抗原群30(CD30)、ケモカイン受容体7(CCR7)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン2(CSPG2)、IQモチーフ含有GTPアーゼ活性化タンパク質1(IQGAP1)、オロソムコイド1(ORM1)、アルギナーゼ1(ARG1)、リンパ球抗原96(LY96)、マトリックスメタロプロテイナーゼ9(MMP9)、炭酸脱水酵素4(CA4)、s100カルシウム結合性タンパク質A12(s100A12)、tol1様受容体2(TLR2)、tol1様受容体4(TLR4)、骨髄分化一次応答遺伝子88(MYD88)、Janusキナーゼ2(JAK2)、分化抗原群3(CD3)、分化抗原群4(CD4)、脾臓チロシンキナーゼ(SYK)、Aキナーゼアンカータンパク質7(AKAP7)、CCAAT/エンハンサー結合性タンパク質(CEBPB)、インターロイキン10(IL10)、インターロイキン8(IL8)、インターロイキン22受容体(IL22R)またはその活性断片のうちの一つまたは複数を含むことができる。一部の場合には、ポリペプチドは、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IGまたはその活性断片のうちの一つを含むことができる。一部の場合には、ポリペプチドは、1つまたは複数のサイトカインを含むことができる。一部の場合には、1つまたは複数のサイトカインは、BAFF、MMP9、APP、アグレカン、ガレクチン3、Fas、RAGE、エフリンA2、CD30、TNR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1、IFNy、RANTES、IL1、IL4、IL17、IL2、GMCSF、ENA78、IL5、IL12P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBCA、IL31、MCP2、IGG3、IGG4、テニユールン1のアイソフォーム2およびディスインテグリンのアイソフォーム2またはその任意の活性断片を含むことができる。一部の場合には、参照プロファイルは、非虚血性脳卒中対象から得ることができる。一部の場合には、非虚血性脳卒中対象は、一過性虚血発作、非虚血性脳卒中または疑似脳卒中を有することができる。一部の場合には、非虚血性脳卒中は、出血性脳卒中であってよい。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、RNAまたはDNAであってよい。一部の場合には、RNAはmRNAであってよい。一部の場合には、DNAは無細胞DNAであってよい。一部の場合には、DNAはゲノムDNAであってよい。一部の場合には、第1の試料および/または第2の試料は、血液または血液の分画であってよい。一部の場合には、第1の虚血性脳卒中試料および/または第2の虚血性脳卒中試料は、血液または血液の分画であってよい。一部の場合には、血液は末梢血であってよい。一部の場合には、血液の分画は、血漿または血清であってよい。一部の場合には、血液の分画は、血液細胞を含むことができる。

【0028】

10

20

30

40

50

別の態様では、本明細書で、対象における虚血性脳卒中を検出するためのキットも提供され、本キットは、a) 虚血性脳卒中のバイオマーカーの第1の群のうち少なくとも1つのバイオマーカーを検出するためのプローブであって、バイオマーカーの第1の群は生体分子の第1のクラスを含む、プローブの第1のパネル；およびb) 虚血性脳卒中のバイオマーカーの第2の群のうち少なくとも1つのバイオマーカーを検出するためのプローブであって、バイオマーカーの第2の群は生体分子の第2のクラスを含む、プローブの第2のパネルを含む。一部の場合には、プローブの第1のパネルは、虚血性脳卒中のバイオマーカーの第1の群のうち少なくとも1つのバイオマーカーにハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドであってよい。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは、ポリヌクレオチドであってよい。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは、アプタマーであってよい。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド19(CCL19)、ケモカイン(C-Cモチーフ)リガンド21(CCL21)、ガレクチン3、進行したグリケーション最終産物の受容体(RAGE)、上皮好中球活性化タンパク質78(ENA78)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、分化抗原群30(CD30)、ケモカイン受容体7(CCR7)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン2(CSPG2)、IQモチーフ含有GTPアーゼ活性化タンパク質1(IQGAP1)、オロソムコイド1(ORM1)、アルギナーゼ1(ARG1)、リンパ球抗原96(LY96)、マトリックスメタロプロテイナーゼ9(MMP9)、炭酸脱水酵素4(CA4)、s100カルシウム結合性タンパク質A12(s100A12)、toll様受容体2(TLR2)、toll様受容体4(TLR4)、骨髄分化一次応答遺伝子88(MYD88)、Janusキナーゼ2(JAK2)、分化抗原群3(CD3)、分化抗原群4(CD4)、脾臓チロシンキナーゼ(SYK)、Aキナーゼアンカータンパク質7(AKAP7)、CCAAT/エンハンサー結合性タンパク質(CEBPB)、インターロイキン10(IL10)、インターロイキン8(IL8)、インターロイキン22受容体(IL22R)またはその活性断片のうちの一つまたは複数をコードするポリヌクレオチドを含むことができる。一部の場合には、生体分子の第2のクラスは、ポリヌクレオチドであってよい。一部の場合には、ポリペプチドは、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IGまたはその活性断片のうちの一つまたは複数をコードすることができる。一部の場合には、生体分子の第1のクラスは一つまたは複数のサイトカインをコードするポリヌクレオチドを含むことができ、および/または生体分子の第2のクラスは一つまたは複数のサイトカインを含むことができる。一部の場合には、一つまたは複数のサイトカインは、BAFF、MMP9、APP、アグレカン、ガレクチン3、Fas、RAGE、エフリンA2、CD30、TNR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1、IFNy、RANTES、IL1、IL4、IL17、IL2、GMCSF、ENA78、IL5、IL12P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBCA、IL31、MCP2、IGG3、IGG4、テニユールン1のアイソフォーム2およびディスインテグリンのアイソフォーム2またはその任意の活性断片を含むことができる。一部の場合には、バイオマーカーの第1の群は、mRNAであってよい。一部の場合には、プローブは、虚血性脳卒中のバイオマーカーの第2の群のうち少なくとも1つのバイオマーカーに結合することができる抗体であってよい。一部の場合には、プローブは、蛍光色素または放射性同位体で標識されてもよい。

参照による組込み

【0029】

この明細書で指摘される全ての刊行物、特許および特許出願は、各個々の刊行物、特許または特許出願が参照により完全に組み込まれることが具体的および個々に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に完全に組み込まれる。

【0030】

10

20

30

40

50

本明細書に記載の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に示されている。本明細書に記載の特徴および特徴の利点のより良い理解は、本明細書に記載の特徴の原理が利用される例示的な実施例を示す以下の詳細な説明および添付の図面を参照することによって得られる。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1 A B】図1 A ~ 1 Dは、虚血性脳卒中群、一過性虚血発作(T I A)群および疑似脳卒中群における遺伝子のm R N A発現を示す。図1 Aは、A R G 1のm R N A発現を示す。図1 Bは、C C R 7のm R N A発現を示す。図1 Cは、L Y 9 6のm R N A発現を示す。図1 Dは、C S P G 2のm R N A発現を示す。

10

【図1 C D】図1 A ~ 1 Dは、虚血性脳卒中群、一過性虚血発作(T I A)群および疑似脳卒中群における遺伝子のm R N A発現を示す。図1 Aは、A R G 1のm R N A発現を示す。図1 Bは、C C R 7のm R N A発現を示す。図1 Cは、L Y 9 6のm R N A発現を示す。図1 Dは、C S P G 2のm R N A発現を示す。

【0032】

【図2 A B】図2 A ~ 2 Dは、虚血性脳卒中群およびT I A群における遺伝子のm R N A発現を示す。図2 Aは、I Q G A P 1のm R N A発現を示す。図2 Bは、L Y 9 6のm R N A発現を示す。図2 Cは、M M P 9のm R N A発現を示す。図2 Dはs 1 0 0 a 1 2のm R N A発現を示す。

【図2 C D】図2 A ~ 2 Dは、虚血性脳卒中群およびT I A群における遺伝子のm R N A発現を示す。図2 Aは、I Q G A P 1のm R N A発現を示す。図2 Bは、L Y 9 6のm R N A発現を示す。図2 Cは、M M P 9のm R N A発現を示す。図2 Dはs 1 0 0 a 1 2のm R N A発現を示す。

20

【0033】

【図3】図3は、虚血性脳卒中、疑似脳卒中群およびT I A群にわたるA R G 1、C C R 7、L Y 9 6、C S P G 2、M M P 9およびs 1 0 0 a 1 2の間の相互影響を示す。

【0034】

【図4】図4 A ~ 4 Bは、虚血性脳卒中群、T I A群および疑似脳卒中群における遺伝子のm R N A発現の比を示す。図4 Aは、C C R 7のm R N A発現とL Y 9 6のm R N A発現の間の比を示す。図4 Bは、M M P 9のm R N A発現とs 1 0 0 a 1 2のm R N A発現の間の比を示す。

30

【0035】

【図5】図5 A ~ 5 Bは、虚血性脳卒中群およびT I A群における遺伝子のm R N A発現の比を示す。図5 Aは、M M P 9のm R N A発現とs 1 0 0 a 1 2のm R N A発現の間の比を示す。図5 Bは、A R G 1のm R N A発現とs 1 0 0 a 1 2のm R N A発現の間の比を示す。

【0036】

【図6 A B】図6 A ~ 6 Dは、虚血性脳卒中群および代謝疾患対照群における遺伝子のゲノム発現を示す。図6 Aは、A R G 1のゲノム発現を示す。図6 Bは、M M P 9のゲノム発現を示す。図6 Cは、s 1 0 0 a 1 2のゲノム発現を示す。図6 Dは、C C R 7のゲノム発現を示す。

40

【図6 C D】図6 A ~ 6 Dは、虚血性脳卒中群および代謝疾患対照群における遺伝子のゲノム発現を示す。図6 Aは、A R G 1のゲノム発現を示す。図6 Bは、M M P 9のゲノム発現を示す。図6 Cは、s 1 0 0 a 1 2のゲノム発現を示す。図6 Dは、C C R 7のゲノム発現を示す。

【0037】

【図7】図7は、虚血性脳卒中群および代謝疾患対照群におけるA R G 1、M M P 9およびs 1 0 0 a 1 2の間の相互影響を示す。

【0038】

【図8】図8 A ~ 8 Bは、虚血性脳卒中群、T I A群および疑似脳卒中群におけるタンパ

50

ク質発現を示す。図 8 A は、A R G 1 のタンパク質発現を示す。図 8 B は、L Y 9 6 のタンパク質発現を示す。

【 0 0 3 9 】

【 図 9 】 図 9 A ~ 9 B は、虚血性脳卒中群、T I A 群および疑似脳卒中群におけるタンパク質発現の比を示す。図 9 A は、L Y 9 6 と A R G 1 の間の比を示す。図 9 B は、L Y 9 6 と C C R 7 の間の比を示す。

【 0 0 4 0 】

【 図 1 0 A 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

10

【 図 1 0 B 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

20

【 図 1 0 C 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

【 図 1 0 D 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

30

【 図 1 0 E 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

40

【 図 1 0 F 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図 1 0 A は、虚血性脳卒中群と T I A 群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図 1 0 B および 1 0 C は、男性および女性の脳卒中と T I A の間の発現差を示す。図 1 0 D ~ 1 0 H は、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子 4 は、転写標的のおよそ 2 6 % を占める。さらに、マーカーの 3 0 % がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

【 図 1 0 G 】 図 1 0 A ~ 図 1 0 H は、虚血性脳卒中群および T I A 群における血液試料の

50

全プロテオームスクランの結果を示す。図10Aは、虚血性脳卒中群とTIA群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図10Bおよび10Cは、男性および女性の脳卒中とTIAの間の発現差を示す。図10D~10Hは、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子4は、転写標的のおよそ26%を占める。さらに、マーカーの30%がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

【図10H】図10A~図10Hは、虚血性脳卒中群およびTIA群における血液試料の全プロテオームスクランの結果を示す。図10Aは、虚血性脳卒中群とTIA群の間で発現レベルが異なるタンパク質を示す。図10Bおよび10Cは、男性および女性の脳卒中とTIAの間の発現差を示す。図10D~10Hは、男性と女性の間で異なることが判明したタンパク質に最も関連する転写マーカーを示す；肝細胞核因子4は、転写標的のおよそ26%を占める。さらに、マーカーの30%がこれらの経路に關与するので、補体および凝固カスケードが最も高度に発現される。

10

【0041】

【図11AB】図11A~図11Eは、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群におけるサイトカインのタンパク質発現を示す。図11Aは、MMP9のタンパク質発現を示す。図11Bは、ガレクチン3のタンパク質発現を示す。図11Cは、ENA78のタンパク質発現を示す。図11Dは、RAGEのタンパク質発現を示す。図11Eは、GMCSFのタンパク質発現を示す。

【図11CD】図11A~図11Eは、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群におけるサイトカインのタンパク質発現を示す。図11Aは、MMP9のタンパク質発現を示す。図11Bは、ガレクチン3のタンパク質発現を示す。図11Cは、ENA78のタンパク質発現を示す。図11Dは、RAGEのタンパク質発現を示す。図11Eは、GMCSFのタンパク質発現を示す。

20

【図11E】図11A~図11Eは、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群におけるサイトカインのタンパク質発現を示す。図11Aは、MMP9のタンパク質発現を示す。図11Bは、ガレクチン3のタンパク質発現を示す。図11Cは、ENA78のタンパク質発現を示す。図11Dは、RAGEのタンパク質発現を示す。図11Eは、GMCSFのタンパク質発現を示す。

【0042】

【図12】図12A~12Bは、虚血性脳卒中群およびTIA群におけるサイトカインのタンパク質発現を示す。図12Aは、ガレクチン3のタンパク質発現を示す。図12Bは、RAGEのタンパク質発現を示す。

30

【0043】

【図13】図13は、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群におけるMMP9、RAGEおよびENA7の相互影響を示す。

【0044】

【図14AB】図14A~図14Dは、虚血性脳卒中群、TIA群、出血性脳卒中群、外傷性脳損傷(TBI)群および疑似脳卒中群における血液プロファイルを示す。図14Aは、白血球数を示す。図14Bは、プロトロンビン時間を示す。図14Cは、ヘマトクリットのパーセントを示す。図14Dは、トロポニン-1濃度を示す。

40

【図14CD】図14A~図14Dは、虚血性脳卒中群、TIA群、出血性脳卒中群、外傷性脳損傷(TBI)群および疑似脳卒中群における血液プロファイルを示す。図14Aは、白血球数を示す。図14Bは、プロトロンビン時間を示す。図14Cは、ヘマトクリットのパーセントを示す。図14Dは、トロポニン-1濃度を示す。

【0045】

【図15】図15A~15Bは、虚血性脳卒中群、TIA群、出血性脳卒中群および疑似脳卒中群における血液プロファイルを示す。図15Aは好中球百分率を示す。図15Bは、白血球数を示す。

【0046】

50

【図16】図16A～16Bは、虚血性脳卒中群、TIA群、出血性脳卒中群、TBI群および疑似脳卒中群におけるリンパ球数および好中球リンパ球の比を示す。図16Aはリンパ球数を示し、図16Bは好中球リンパ球の比を示す。

【0047】

【図17AB】図17A～17Hは、虚血性脳卒中症状発症からの時間と選択された時点のバイオマーカーの間の相関を示す。図17Aは、MYD88の発現を示す。図17Bは、JAK2発現を示す。図17Cは、CD3発現を示す。図17Dは、SYK発現を示す。図17Eは、CEBPB発現を示す。図17Fは、IL10発現を示す。図17Gは、CA4発現を示す。図17HはCCR7発現を示す。

【図17CD】図17A～17Hは、虚血性脳卒中症状発症からの時間と選択された時点のバイオマーカーの間の相関を示す。図17Aは、MYD88の発現を示す。図17Bは、JAK2発現を示す。図17Cは、CD3発現を示す。図17Dは、SYK発現を示す。図17Eは、CEBPB発現を示す。図17Fは、IL10発現を示す。図17Gは、CA4発現を示す。図17HはCCR7発現を示す。

【図17EF】図17A～17Hは、虚血性脳卒中症状発症からの時間と選択された時点のバイオマーカーの間の相関を示す。図17Aは、MYD88の発現を示す。図17Bは、JAK2発現を示す。図17Cは、CD3発現を示す。図17Dは、SYK発現を示す。図17Eは、CEBPB発現を示す。図17Fは、IL10発現を示す。図17Gは、CA4発現を示す。図17HはCCR7発現を示す。

【図17GH】図17A～17Hは、虚血性脳卒中症状発症からの時間と選択された時点のバイオマーカーの間の相関を示す。図17Aは、MYD88の発現を示す。図17Bは、JAK2発現を示す。図17Cは、CD3発現を示す。図17Dは、SYK発現を示す。図17Eは、CEBPB発現を示す。図17Fは、IL10発現を示す。図17Gは、CA4発現を示す。図17HはCCR7発現を示す。

【0048】

【図18】図18は、虚血性脳卒中症状発症の時間と選択バイオマーカー（Fasリガンド発現）の間の相関を示す。

【0049】

【図19】図19A～図19Bは、虚血性脳卒中症状発症の時間と選択されたプロテオミクスバイオマーカーの間の相関を示す。図19Aは、IGG3発現を示す。図19Bは、IGG4発現を示す。

【0050】

【図20】図20A～20Bは、虚血性脳卒中症状発症の時間と選択された免疫バイオマーカーの間の相関を示す。図20Aは、CK-MBレベルを示す。図20Bは、血小板数を示す。

【0051】

【図21】図21は、対象の虚血性脳卒中を評価するための例示的な方法を示す。

【0052】

【図22】図22は、強力な識別能力を有する遺伝子の識別のためのGA-kNNの使用を示す。

【0053】

【図23A】図23A～図23Bは、AISの識別のためにGA-kNNによって識別された上位50個の末梢血転写物を示す。図23Aは、発見コホートAIS患者と神経学的無症候性対照の間を識別するそれらの能力に基づいてGA-kNNによるランク付けで上位50個の末梢血転写物を、各転写物が近最適解の一部として選択された回数順に示す。図23Bは、発見コホートAIS患者と神経学的無症候性対照の間の上位50の転写物の示差的末梢血発現を示す。

【図23B】図23A～図23Bは、AISの識別のためにGA-kNNによって識別された上位50個の末梢血転写物を示す。図23Aは、発見コホートAIS患者と神経学的無症候性対照の間を識別するそれらの能力に基づいてGA-kNNによるランク付けで上

10

20

30

40

50

位50個の末梢血転写物を、各転写物が近最適解の一部として選択された回数順に示す。図23Bは、発見コホートA I S患者と神経学的無症候性対照の間の上位50の転写物の示差的末梢血発現を示す。

【0054】

【図24A】図24A～図24Dは、GA-kNNによって識別された末梢血液転写物が、発見コホートにおいてA I Sを診断する強力な能力を示したことを示す。図24Aは、GA-kNNによって識別された、ランク付けで上位10個の転写物(ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、MAL、GRAP、ID3、CTS Z、KIF1BおよびPLXDC2)の組合せが、発見コホートの対象の98.4%を、97.4%の感度および100%の特異性で正確に分類するのに十分であったことを示している。図24B、24Cおよび24Dは、発見コホート神経学的無症候性対照およびそれらのA I S対応物で観察された、ランク付けで上位10個の転写物の協調発現レベルを示す。A I S患者は、対照と比較して、上位10個のマーカ-にわたって異なるパターン発現を示した。

10

【図24BC】図24A～図24Dは、GA-kNNによって識別された末梢血液転写物が、発見コホートにおいてA I Sを診断する強力な能力を示したことを示す。図24Aは、GA-kNNによって識別された、ランク付けで上位10個の転写物(ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、MAL、GRAP、ID3、CTS Z、KIF1BおよびPLXDC2)の組合せが、発見コホートの対象の98.4%を、97.4%の感度および100%の特異性で正確に分類するのに十分であったことを示している。図24B、24Cおよび24Dは、発見コホート神経学的無症候性対照およびそれらのA I S対応物で観察された、ランク付けで上位10個の転写物の協調発現レベルを示す。A I S患者は、対照と比較して、上位10個のマーカ-にわたって異なるパターン発現を示した。

20

【図24D】図24A～図24Dは、GA-kNNによって識別された末梢血液転写物が、発見コホートにおいてA I Sを診断する強力な能力を示したことを示す。図24Aは、GA-kNNによって識別された、ランク付けで上位10個の転写物(ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、MAL、GRAP、ID3、CTS Z、KIF1BおよびPLXDC2)の組合せが、発見コホートの対象の98.4%を、97.4%の感度および100%の特異性で正確に分類するのに十分であったことを示している。図24B、24Cおよび24Dは、発見コホート神経学的無症候性対照およびそれらのA I S対応物で観察された、ランク付けで上位10個の転写物の協調発現レベルを示す。A I S患者は、対照と比較して、上位10個のマーカ-にわたって異なるパターン発現を示した。

30

【0055】

【図25A】図25A～25Dは、発見コホートにおいて識別された上位10個の転写マーカ-が、検証コホートにおいてA I S患者と対照の間を区別する強い能力を示したことを示す。図25Aは、検証コホートA I S患者と神経学的無症候性対照の間の上位10個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図25Bによって、A I S患者を検証コホートにおける神経学的無症候性対照と比較するとき、組み合わせて使用された上位10個の転写物が、92.3%の感度および100%の特異性で、対象の95.6%を正確に識別できたことが示される。図25Cは、検証コホートA I S患者と疑似脳卒中の間の上位10個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図25Dによって、検証コホートにおけるA I S患者を疑似脳卒中と比較するとき、組み合わせて使用された上位10個の転写物が、97.4%の特異性および93.3%の感度で、96.3%の対象を正確に識別することができたことが示される。

40

【図25B】図25A～25Dは、発見コホートにおいて識別された上位10個の転写マーカ-が、検証コホートにおいてA I S患者と対照の間を区別する強い能力を示したことを示す。図25Aは、検証コホートA I S患者と神経学的無症候性対照の間の上位10個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図25Bによって、A I S患者を検証コホートにおける神経学的無症候性対照と比較するとき、組み合わせて使用された上位10個の転写物が、92.3%の感度および100%の特異性で、対象の95.6%を正確に識別できたことが示される。図25Cは、検証コホートA I S患者と疑似脳卒中の間の上位10個

50

の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図 2 5 D によって、検証コホートにおける A I S 患者を疑似脳卒中と比較するとき、組み合わせて使用された上位 1 0 個の転写物が、9 7 . 4 % の特異性および 9 3 . 3 % の感度で、9 6 . 3 % の対象を正確に識別することができたことが示される。

【図 2 5 C】図 2 5 A ~ 2 5 D は、発見コホートにおいて識別された上位 1 0 個の転写マーカーが、検証コホートにおいて A I S 患者と対照の間を区別する強い能力を示したことを示す。図 2 5 A は、検証コホート A I S 患者と神経学的無症候性対照の間の上位 1 0 個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図 2 5 B によって、A I S 患者を検証コホートにおける神経学的無症候性対照と比較するとき、組み合わせて使用された上位 1 0 個の転写物が、9 2 . 3 % の感度および 1 0 0 % の特異性で、対象の 9 5 . 6 % を正確に識別できたことが示される。図 2 5 C は、検証コホート A I S 患者と疑似脳卒中の間の上位 1 0 個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図 2 5 D によって、検証コホートにおける A I S 患者を疑似脳卒中と比較するとき、組み合わせて使用された上位 1 0 個の転写物が、9 7 . 4 % の特異性および 9 3 . 3 % の感度で、9 6 . 3 % の対象を正確に識別することができたことが示される。

10

【図 2 5 D】図 2 5 A ~ 2 5 D は、発見コホートにおいて識別された上位 1 0 個の転写マーカーが、検証コホートにおいて A I S 患者と対照の間を区別する強い能力を示したことを示す。図 2 5 A は、検証コホート A I S 患者と神経学的無症候性対照の間の上位 1 0 個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図 2 5 B によって、A I S 患者を検証コホートにおける神経学的無症候性対照と比較するとき、組み合わせて使用された上位 1 0 個の転写物が、9 2 . 3 % の感度および 1 0 0 % の特異性で、対象の 9 5 . 6 % を正確に識別できたことが示される。図 2 5 C は、検証コホート A I S 患者と疑似脳卒中の間の上位 1 0 個の転写物の末梢血の示差的発現を示す。図 2 5 D によって、検証コホートにおける A I S 患者を疑似脳卒中と比較するとき、組み合わせて使用された上位 1 0 個の転写物が、9 7 . 4 % の特異性および 9 3 . 3 % の感度で、9 6 . 3 % の対象を正確に識別することができたことが示される。

20

【0 0 5 6】

【図 2 6 A】図 2 6 A ~ 図 2 6 D は、q P C R を使用して血漿 c f D N A を検出するために使用されるパラダイムを示す。図 2 6 A は、G F P 6 0 5 スパイクイン対照の生成に使用したプライマーを示す。図 2 6 B は、精製された G F P 6 0 5 の精製後の電気泳動を示す。図 2 6 C は、T E R T および G F P 6 0 5 スパイクイン対照の検出のために設計されたプライマーを示す。図 2 6 D は、全ヒト D N A 、精製 G F P 6 0 5 スパイクイン、または両方の組合せを鋳型として使用して、T E R T および G F P 6 0 5 の 1 0 8 b p 内部断片を標的とするように設計されたプライマーを使用して生成された P C R 産物を示す。

30

【図 2 6 B C D】図 2 6 A ~ 図 2 6 D は、q P C R を使用して血漿 c f D N A を検出するために使用されるパラダイムを示す。図 2 6 A は、G F P 6 0 5 スパイクイン対照の生成に使用したプライマーを示す。図 2 6 B は、精製された G F P 6 0 5 の精製後の電気泳動を示す。図 2 6 C は、T E R T および G F P 6 0 5 スパイクイン対照の検出のために設計されたプライマーを示す。図 2 6 D は、全ヒト D N A 、精製 G F P 6 0 5 スパイクイン、または両方の組合せを鋳型として使用して、T E R T および G F P 6 0 5 の 1 0 8 b p 内部断片を標的とするように設計されたプライマーを使用して生成された P C R 産物を示す。

40

【0 0 5 7】

【図 2 7】図 2 7 は、患者の臨床的および人口統計的特徴を示す。

【0 0 5 8】

【図 2 8】図 2 8 A および 2 8 B は、A I S 患者および疑似脳卒中における循環 c f D N A レベルを示す。図 2 8 A は、A I S 患者と疑似脳卒中の間の循環 c f D N A レベルの比較を示す。図 2 8 B は、A I S 患者と疑似脳卒中の間を識別するときの A I S の識別子としての循環 c f D N A レベルの感度および特異性を示す。

【0 0 5 9】

50

【図29】図29Aおよび図29Bは、AIS患者における循環cfDNAレベルと傷害重症度の間の関係を示す。図29Aは、循環cfDNAレベルとNIHSSの間の関係を示す。図29Bは、循環cfDNAレベルと梗塞容積の間の関係を示す。

【0060】

【図30】図30は、AIS患者における循環cfDNAレベルと好中球数の間の関係を示す。

【発明を実施するための形態】

【0061】

概要

本明細書で、患者で虚血性脳卒中を評価するための方法が提供される。本方法は、患者から得られる体液（例えば、血液）で無細胞核酸（例えば、無細胞DNA）のレベルを測定するステップを含むことができる。体液中の無細胞核酸のレベルは、参照値、例えば健康な個体または疑似脳卒中からの体液での無細胞核酸のレベルと比較することができる。体液中の無細胞核酸のレベルが参照値より高い（例えば、3倍高い）ならば、患者で虚血性脳卒中を検出することができる。一部の 경우에는、本明細書に開示される方法は、少なくとも86%の感度および少なくとも75%の特異性で虚血性脳卒中を疑似虚血から区別することができる。一部の 경우에는、無細胞核酸のレベルは、脳卒中による自然免疫系の活性化の状態（例えば、末梢血の好中球数によって表される）の指標であるか、または脳卒中によって引き起こされる損傷の重症度の指標である。一部の 경우에는、無細胞核酸のレベルが増加するにしたがって脳卒中の重症度が増加する。一部の 경우에는、無細胞核酸のレベルが増加するにしたがって脳卒中の重症度が減少する。虚血性脳卒中を評価するための方法は、1つまたは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するステップを含むことができる。後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルは、参照レベルと比較することができる。一部の 경우에는、試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸対全無細胞核酸の比が計算される。一部の 実施形態では、虚血性脳卒中は、この比に基づいて評価することができる。

【0062】

本明細書で、患者で虚血性脳卒中を評価するための方法を実施するためのデバイスも提供される。そのようなデバイスは、実行可能命令を記憶するメモリ、および実行可能命令を実行して本明細書に記載される方法を実施するプロセッサを含むことができる。一部の 場合には、デバイスは携帯型デバイスである。例えば、デバイスは、脳卒中認定センターへの患者の輸送およびトリアージを助けるために虚血性脳卒中および脳卒中の重症度を認定または除外するために、血栓溶解療法、または、脳卒中でない場合は適当なフォローアップ看護の早期投与を促進するために使用される臨床現場即時デバイスであってよい。

【0063】

虚血性脳卒中を評価するための方法は、この開示全体で記載される方法の任意の組合せを含むことができる。例えば、虚血性脳卒中を評価するための方法は、以下の1つまたは複数を含むことができる：a)患者で遺伝子プロファイルを測定するステップ、b)患者でRNAプロファイルを測定するステップ、c)患者でタンパク質プロファイルを測定するステップ、d)本明細書に開示されるバイオマーカーの群の発現（例えば、mRNAレベル、タンパク質レベルまたは両方）を測定するステップ、e)患者の体液中の無細胞核酸レベルを測定するステップ、e)神経病理学的画像化、および患者で血液細胞の血液プロファイルを測定することを含む脳卒中の他の評価。

【0064】

本明細書で、対象（例えば、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象）で虚血性脳卒中を評価するための方法、デバイスおよびキットが提供される。対象における虚血性脳卒中を評価する方法は、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップ、バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ、および（例えば、コンピュータシステムを使用して）対象における虚血性脳卒中を評価するステップを含むことができる。本明細書で提供される方法は、例えば炭疽毒素受容体2、セリン/トレオニン-プロテ

10

20

30

40

50

インキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4、分化抗原群 163、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2 関連アダプタータンパク質、DNA 結合阻害剤 3、カテプシン Z、キネシン様タンパク質 1B およびプレキシンドメイン含有タンパク質 2 を含む、2 つまたはそれよりも多くの（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の）バイオマーカーの発現を測定するステップを含むことができる。

【0065】

本明細書で提供される方法、デバイスおよびキットは、虚血性脳卒中の評価において、少なくとも約 96% の特異性および少なくとも約 96% の感度を達成することができる。一部の場合には、本方法、デバイスおよびキットは、2 つのバイオマーカーの発現に基づく虚血性脳卒中の評価において、少なくとも約 96% の特異性および少なくとも約 96% の感度を達成することができる。一部の場合には、本方法、デバイスおよびキットは、4 つのバイオマーカーの発現に基づく虚血性脳卒中の評価において、約 100% の特異性および約 100% の感度を達成することができる。

10

【0066】

本明細書で提供されるキットは、対象からの試料中の 2 つまたはそれよりも多くの（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個の）バイオマーカーの発現を測定するためのプローブのパネルを含むことができる。プローブは、例えば炭疽毒素受容体 2、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ 3、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム 4、分化抗原群 163、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、GRB2 関連アダプタータンパク質、DNA 結合阻害剤 3、カテプシン Z、キネシン様タンパク質 1B およびプレキシンドメイン含有タンパク質 2 のうちの 2 つまたはそれよりも多く（例えば、4、5、6、7、8、9 または 10 個）の発現を測定するために使用することができる。

20

【0067】

図 21 は、対象における虚血性脳卒中を評価するための例示的方法を示す。末梢血（図 21、2102）は、対象から引き抜くことができる（図 21、2101）。血液中のバイオマーカーの群の発現は、アッセイによって測定することができる（図 21、2103）。一部の場合には、アッセイは、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）などのタンパク質をベースとしたアッセイであってよい。一部の場合には、アッセイは、核酸増幅を含むアッセイなどの、核酸をベースとしたアッセイであってよい。例示的な核酸ベースのアッセイには、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、例えば、定量的逆転写 PCR（q-RT-PCR）が含まれる。一部の場合には、虚血性脳卒中を評価するために、バイオマーカーの群のタンパク質および RNA の両方の発現を測定することができる。さらなる場合には、血液細胞プロファイルアッセイなどの他のアッセイを、虚血性脳卒中を評価するためのバイオマーカーの発現と組み合わせて使用することができる。バイオマーカーの群の発現レベルは、コンピュータシステムによって分析することができる（図 21、2104）。一部の場合には、コンピュータシステムは、バイオマーカーの発現を参照と比較することができる。参照は、コンピュータシステムに保存することができる。あるいは、参照は、他のコンピュータ、データベースおよび/またはサーバーに保存することができ、ネットワーク（例えば、インターネット）を通してアクセス可能である（図 21、2107）。対象が虚血性脳卒中を有するかどうかの結果は、出力デバイス、例えばモニターに送ることができる（図 21、2105）。アッセイ、コンピュータシステムおよび出力デバイス（図 21、2103、2104 および 2105）は、単一のデバイス（図 21、2106）に一体化することができる。一部の場合には、そのようなデバイスは、臨床現場即時デバイス、例えば、携帯型の臨床現場即時デバイスであってよい。一部の場合には、コンピュータシステムは、スマートフォンであってよい。

30

40

【0068】

本明細書で、虚血性脳卒中の 1 つまたは複数のバイオマーカーを識別する方法が提供される。本方法は、虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイル、および同じま

50

たは異なる虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイルを測定するステップ、ならびに、ポリヌクレオチドのプロファイルおよび/またはポリペプチドのプロファイルを参照プロファイルと比較することによってプロファイル进行分析するステップを含むことができる。分析するステップは、非虚血性脳卒中状態と比較して虚血性脳卒中状態の下で異なる発現レベルを有するバイオマーカーを識別することができる。さらに、分析するステップは、非虚血性脳卒中状態と比較して虚血性脳卒中状態の下で異なる発現パターンを有する複数のバイオマーカーを決定することもできる。1つまたは複数のポリヌクレオチドおよびこの1つまたは複数のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドは、非虚血性脳卒中状態の下でのそれらの発現レベルと比較して虚血性脳卒中状態の下で、ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの両方の発現レベルが増加または減少するならば、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別することができる。

10

【0069】

本明細書で、生体試料中のバイオマーカーのプロファイル（例えば、発現レベル）を評価することによって虚血性脳卒中を検出するための方法、デバイスおよびキットが提供される。本方法は虚血性脳卒中のタイムリーな検出を可能にすることができ、そのことは効果的な処置のために重大なことがある。そのような方法は、対象における虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリヌクレオチドバイオマーカーの群の発現パターン、および虚血性脳卒中の1つまたは複数のアダプターバイオマーカーの群の発現パターンを測定するステップ、発現パターン进行分析するステップ、ならびに対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含むことができる。そのような方法は、対象における虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリヌクレオチドバイオマーカーの群の発現パターン、および虚血性脳卒中の1つまたは複数のアダプターバイオマーカーの群の発現パターンを測定するステップ、発現パターン进行分析するステップ、ならびに対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含むことができる。そのような方法は、対象における虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリヌクレオチドバイオマーカーの群の発現パターン、および虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリペプチドバイオマーカーの群の発現パターンを測定するステップ、発現パターン进行分析するステップ、ならびに対象における虚血性脳卒中を検出するステップを含むことができる。バイオマーカーの発現パターンは、虚血性脳卒中を非虚血性脳卒中、外傷性脳損傷および/または疑似脳卒中から識別するために使用することができ、そのことは対象のために適する処置を選択するために重要なことがある。バイオマーカーの発現パターンは、虚血性脳卒中発症の時間を決定するために使用することもできる。バイオマーカーの発現パターンは、虚血性脳卒中の転帰を予測するために使用することもできる。バイオマーカーの発現パターンは、虚血性脳卒中の重症度を予測するために使用することもできる。一部の場合には、本方法は、約4.5時間以内に虚血性脳卒中を検出するために使用することができる。約4.5時間以内の虚血性脳卒中の診断は、脳卒中処置（例えば、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA））の効果を増強することができる。一部の態様では、バイオマーカーの発現パターンは、処置の効果を測定するために使用することができる。一部の態様では、バイオマーカーの発現パターンは、処置の前、その間またはその後測定することができる。虚血性脳卒中のバイオマーカーの発現パターンは、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、ビーズをベースとした多重アッセイ、マイクロアレイ、質量分析、または時間に敏感なおよび/またはベッドサイドの方法で実施することができる任意の他のアッセイによって測定することができる。

20

30

40

【0070】

本明細書で、対象における虚血性脳卒中を検出するためのキットも提供される。本キットは、虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリヌクレオチドバイオマーカーを検出するためのプローブの第1のパネルおよび虚血性脳卒中の1つまたは複数のポリペプチドバイオマーカーを検出するためのプローブの第2のパネルを含むことができる。ポリヌクレオチドバイオマーカーを検出するためのプローブは、ポリヌクレオチドバイオマーカーにハイブリダイズすることが可能なオリゴヌクレオチドであってよい。ポリペプチドバイオマーカーを検出するためのプローブは、ポリペプチドバイオマーカーに結合することが可能な抗

50

体であってよい。一部の場合には、虚血性脳卒中の診断で使用される検出可能なシグナルを提供するために、プローブは（例えば、蛍光色素で）標識されてもよい。

【0071】

本明細書で、対象における虚血性脳卒中を検出するためのデバイスがさらに開示される。デバイスは、コンピュータシステムであってよい。デバイスは、実行可能命令を記憶するメモリ、および実行可能命令を実行して虚血性脳卒中を検出するための任意の方法を実施するプロセッサを含むことができる。一部の場合には、デバイスは、本明細書に開示されるキットのプローブを使用して、対象における虚血性脳卒中のバイオマーカーを検出することができる。一部の態様では、デバイスは、虚血性脳卒中を検出することができる。デバイスは、病院および/または病院前の状況（例えば、救急車または患者の家）で使用するための携帯型デバイスであることを企図することができる。一部の場合には、デバイスは、フィラメントをベースとしたデバイスであってよい。

10

【0072】

方法

対象（例えば、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象）において虚血性脳卒中を評価する方法が本明細書において提供される。

【0073】

本明細書に開示される方法は、虚血性脳卒中を疑似脳卒中と識別し得る。一部の場合には、そのような方法の1つは、a) 対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ；b) 無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、参照試料は疑似脳卒中対象からのものであるステップ；およびc) 試料または参照試料が無細胞核酸のより高いレベルを有するかを決定するステップのうちの1つまたは複数を含む。

20

【0074】

本明細書に開示される方法は、高い特異性および感度で脳卒中（例えば、虚血性脳卒中）を評価し得る。一部の場合には、そのような方法の1つは、a) 対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ；b) 無細胞核酸のレベルを参照試料中の無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、参照試料は非虚血性脳卒中対象からのものであるステップ；およびc) コンピュータシステムを使用して対象の虚血性脳卒中を評価するステップであって、少なくとも約80%の感度および少なくとも約75%の特異性で、虚血性脳卒中を非虚血性脳卒中から区別し得るステップのうちの1つまたは複数のステップを含む。

30

【0075】

本明細書中に開示される方法は、1つまたは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルに基づいて虚血性脳卒中を評価し得る。一部の場合には、このような方法の1つは、a) 後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するステップであって、無細胞核酸が虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中にあるステップ、b) 無細胞核酸のレベルを参照試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸の参照レベルと比較するステップであって、対照試料は健康対照対象または疑似脳卒中対象からのものであるステップのうちの1つまたは複数のステップを含む。本方法はまた、後成的マーカーを有する無細胞核酸の、試料中の総無細胞核酸レベルに対する比に基づいて、虚血性脳卒中を評価し得る。一部の態様では、後成的マーカーを有する無細胞核酸の、試料中の総無細胞核酸に対する比は、約0.01~約10000の範囲であり得る。一部の態様では、後成的マーカーを有する遊離核酸の、試料中の総無細胞核酸に対する比は、少なくとも約0.0005、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500または少なくとも約1000であり得る。一部の態様では、試料中の総無細胞核酸の、後成的マーカーを有する無細胞核酸に対する比は、少なくとも約0.0005、0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500または少なくとも約1000であり得る。そのような方法の1つは：a

40

50

) 虚血性脳卒中を有することが疑われる対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップ、 b) 無細胞核酸のサブグループのレベルを測定するステップであって、無細胞核酸のサブグループが後成的マーカーを有するステップ ; c) 無細胞核酸のレベルと無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比を決定するステップ ; d) 比を、参照試料中の無細胞核酸のレベルと参照試料中の無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比である参照と比較するステップであって、参照試料中の無細胞核酸のサブグループが後成的マーカーを有し、参照試料が健常対照対象または疑似脳卒中対象からのものであるステップのうちの1つまたは複数を含み得る。一部の 경우에는、後成的マーカーを有する無細胞核酸の、試料中の総無細胞核酸に対する比が、参照試料中の無細胞核酸のレベルと参照試料中の無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比よりも高いとき、対象において虚血性脳卒中が検出され、ここで参照試料中の無細胞核酸のサブグループが後成的マーカーを有する。場合によって、後成的マーカーを有する無細胞核酸の、試料中の全無細胞核酸に対する比が、参照試料中の無細胞核酸のレベルと参照試料中の無細胞核酸のサブグループのレベルの間の比よりも高いとき、対象において虚血性脳卒中が検出されず、ここで参照試料中の無細胞核酸のサブグループが後成的マーカーを有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態では、無細胞核酸のレベルは、対象における梗塞容積を決定し得る。一部の実施形態では、無細胞核酸のレベルが増加するにつれ、梗塞容積が増加する。一部の実施形態では、無細胞核酸のレベルが減少するにつれ、梗塞容積が増加する。一部の実施形態では、無細胞核酸のより高いレベルは、より大きな梗塞容積と相関する。一部の実施形態では、無細胞核酸のより低いレベルは、より小さい梗塞容積と相関する。

【 0 0 7 7 】

本明細書の方法の任意のステップは、コンピュータシステムを使用して実施することができる。コンピュータシステムは、実行可能命令を記憶するメモリと、本明細書の方法の任意のステップを実施するために実行可能命令を実行するプロセッサとを備え得る。一部の 경우에는、本明細書の評価ステップの1つまたは複数は、コンピュータシステムを使用して実施してもよい。

【 0 0 7 8 】

本方法は、対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するステップを含み得る。任意の従来の DNA または RNA 検出方法を、無細胞核酸の測定に使用してもよい。無細胞核酸を測定するステップは、無細胞核酸の量、濃度、または両方の検出を含み得る。一部の 경우에는、低コピー数核酸を検出するための任意の手段を使用して核酸を検出してもよい。低コピー数核酸を検出および定量する方法としては、分析的生化学法、例えば、電気泳動、キャピラリー電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (H P L C)、薄層クロマトグラフィー (T L C)、超拡散クロマトグラフィー、質量分析、分光法、電気泳動 (例えばゲル電気泳動) などが挙げられる。無細胞核酸のレベルの測定は、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R)、例えば、本開示に記載の任意の P C R 技術を使用して実施してもよい。一部の 경우에는、無細胞核酸のレベルは、定量的 P C R (例えば、定量的リアルタイム P C R) によって測定し得る。

【 0 0 7 9 】

無細胞核酸のレベルを測定するステップは、そのレベルが試料中の無細胞核酸のレベルを示す1つまたは複数のマーカー (1つまたは複数の遺伝子またはその断片) のレベルを測定することによって実施してもよい。一部の 경우에는、そのようなマーカーは、健常な対象または疑似脳卒中対象と比較してより高いレベルで虚血性脳卒中対象に存在し得る。無細胞核酸のレベルは、ヒト白血球抗原 (H L A) 遺伝子座、ミトコンドリア DNA、ミトコンドリア RNA (例えばミトコンドリア m RNA)、Y 染色体遺伝子血液型抗原遺伝子様 R H D (分化抗原群 2 4 0 D (C D 2 4 0 D))、リボヌクレアーゼ P RNA 成分 H 1、A l u J エレメント、内因性レトロウイルスグループ 3、グリセルアルデヒド 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、N - アセチルグルコサミンキナーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼ、ベータ - グロビン、アルブミンファミリーのメンバー、テロメラーゼ逆転写酵素 (

T E R T)、またはその任意の組合せのレベルを検出することによって測定され得る。これらのマーカーのレベルの検出は、遺伝子(またはその断片)のレベルの検出、または転写物、例えばマーカーの mRNA (またはその断片)の検出を含む。一部の場合には、そのようなマーカーは T E R T であってもよい。

【0080】

無細胞核酸のレベルの測定は、プローブを使用して実施してもよい。同様に、1つまたは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸レベルの測定は、プローブを使用して実施してもよい。プローブは、無細胞核酸の少なくとも1つ、または1つもしくは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸の少なくとも1つに(例えば、直接または間接的に)結合し得る。一部の場合には、プローブは標識されてもよい。そのようなプローブおよび標識は、本明細書において開示される。一部の場合には、プローブはポリヌクレオチドであり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、試料中の無細胞核酸の少なくとも1つとハイブリダイズし得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、二本鎖であってもよく、または一本鎖であってもよい。

10

【0081】

試料中の無細胞核酸のレベルを測定する場合、ポリヌクレオチドを対照(例えば、外因性ポリヌクレオチド)として試料に添加してもよい。外因性ポリヌクレオチドのレベルは、核酸操作ステップ(例えば、単離、精製または濃縮)中の損失または偏りを示し得る。例えば、試料から核酸を単離または精製するとき、単離または精製ステップの前後のポリヌクレオチドのレベルを比較することによって、単離または精製の効率を決定し得る。一部の場合には、このようなポリヌクレオチドは、試料中の核酸の1つ(例えば、内因性ポリヌクレオチド)である。一部の場合には、そのようなポリヌクレオチドは、試料中に存在しない(例えば、外因性ポリヌクレオチド)。外因性ポリヌクレオチドは、合成されたものであってもよく、または試験される対象とは別の種からのものであってもよい。一部の場合には、外因性ポリヌクレオチドは、蛍光タンパク質(例えば、緑色蛍光タンパク質(GFP))またはその断片である。例えば、外因性ポリヌクレオチドは、ポンテリナ・ブルマタ(*Pontellina plumata*)ゲノムのGFPコード部分に由来するDNA断片(例えば、605bp断片)の断片であってもよい。

20

【0082】

一部の実施形態では、対象の試料中の無細胞核酸のレベルを測定した後、試料中の無細胞核酸のレベルを参照と比較してもよい。参照は、本開示に記載された任意の参照対象、例えば健康対象または疑似脳卒中対象からの参照試料中の無細胞核酸のレベルであってもよい。

30

【0083】

虚血性脳卒中は、無細胞核酸と参照との比較に基づいて評価してもよい。一部の場合には、無細胞核酸のレベルが参照と比較して増加しているとき、対象における虚血性脳卒中が検出される。例えば、無細胞核酸のレベルが、参照と比較して、少なくとも約1%、5%、7%、10%、20%、40%、60%、80%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または20倍増加しているとき、対象における虚血性脳卒中が検出される。あるいは、無細胞核酸のレベルが参照と比較して減少しているとき、対象における虚血性脳卒中が検出され得る。例えば、無細胞核酸のレベルが参照と比較して、少なくとも約1%、5%、7%、10%、20%、40%、60%、80%、1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、または20倍減少しているとき、対象における虚血性脳卒中が検出される。

40

【0084】

本明細書の方法は、1つまたは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、1つまたは複数の後成的マーカーを有する無細胞核酸は、対象からの試料中の無細胞核酸のサブグループである。一部の場合には、無細胞核酸のサブグループは、後成的マーカーを有する遺伝子またはその断片を含み得る。一部の場合には、無細胞核酸のサブグループは、後成的マーカーを有する複数の遺伝子またはその断片であり得る。無細胞核酸のサブグループは、2つ以上の後成的マーカーを

50

有し得る。

【0085】

後成的マーカーは、ポリヌクレオチドのアセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化 (sumoylation)、リボシル化、シトルリン化のうちの1つまたは複数を含み得る。一部の場合には、後成的な修飾は、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、またはヒストンのシトルリン化を含むヒストンの修飾を含み得る。

【0086】

無細胞核酸のサブグループは、1つまたは限られた種類の細胞または組織に特異的なRNA転写物であり得る。例えば、無細胞核酸のサブグループは、1つまたは限られた種類の細胞または組織においてのみ、またはそこで主に転写されるRNAであり得る。そのようなRNAは、mRNAであってもよく、またはマイクロRNAであってもよい。一部の場合には、無細胞DNAのサブグループは、対象の神経血管単位からの細胞に特異的なmRNA転写物であってもよい。

10

【0087】

対象が脳卒中症状 (例えば、虚血性脳卒中症状) を示した後、対象から試料を得てもよい。例えば、試料は、脳卒中症状 (例えば、虚血性脳卒中症状) の発症から少なくとも約0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、10、12、15、20、24、50、72、96、または120時間後に、対象から得てもよい。

20

【0088】

対象において脳卒中 (例えば、虚血性脳卒中) を評価するステップは、以下のうちの1つまたは複数を含み得る: a) 対象が脳卒中 (例えば、虚血性脳卒中) を有するかを決定するステップ; b) 対象が、脳卒中 (例えば、虚血性脳卒中) を有するリスクを評価するステップ; c) 対象の脳卒中重症度を評価するステップ; d) 対象の脳卒中の重症度を予測するステップ; e) 先天性免疫系の活性化を評価するステップ (例えば、対象の好中球数を評価するステップ); ならびに f) 脳卒中誘導損傷 (例えば、心筋梗塞) を評価するステップ。無細胞核酸のレベルに基づいて1つまたは複数の評価を実施してもよい。例えば、好中球数は、試料中の無細胞核酸のレベルに基づいて決定してもよい。

30

【0089】

無細胞核酸のレベルを、参照レベルと比較してもよい。参照レベルは、参照試料中の無細胞核酸のレベルであってもよい。参照試料は、健康対象から採取された試料であってもよい。参照試料は、非脳卒中対象から採取された試料であってもよい。例えば、参照試料は、疑似脳卒中を有する対象から採取された試料であってもよい。一部の場合には、参照をデータベースまたはサーバーに記憶してもよい。

【0090】

本明細書中に開示される方法は、対象における虚血性脳卒中症状発症の時間を決定するステップを含み得る。一部の場合には、試料中の無細胞核酸のレベルを、虚血性脳卒中症状の発症の時間と関連させることによって、虚血性脳卒中症状発症の時間を決定してもよい。本発明に先立って、脳卒中症状発症の時間の決定は、特に患者が重篤度に含まれている場合、または事象が目撃されていない場合、しばしば困難かつ不正確である。これらの問題は、患者の発作の開始時期 (臨床医および患者 / 代理の相互影響) ならびに患者に関わる臨床医師が保有する経験および / または適切な訓練の限界を評価するために現在使用されている技術の限界の一部は起因する。これらの状況は脳卒中および脳損傷犠牲者に有害である。なぜなら、脳卒中発症の時間の正確で偏向のない予測は、治療時点の患者の健康および転帰にとって非常に重要であるからである。tPAは依然として、症状発症の3時間以内に脳卒中を治療するために1996年にFDAによって承認され、急性虚血性脳卒中の処置に適応された唯一のFDA認可の薬物である。現在、AHA / ASAは、症状の発症から4.5時間以内に、この時間ウィンドウの延長を裏付ける科学諮問を公表している。本発明は、脳卒中症状の発症を決定する方法に関する。

40

50

【0091】

対象（例えば、虚血性脳卒中を有することが疑われる対象）で虚血性脳卒中を評価する方法が本明細書において提供される。本方法は、対象からの試料中のバイオマーカの群の発現を測定するステップを含み得る。次に、発現を参照と比較してもよい。対象における虚血性脳卒中は、この発現に基づいて（例えば、コンピュータシステムを使用して）評価してもよい。発現は、RNA発現、タンパク質発現、またはその組合せであってもよい。

【0092】

提供される方法は、脳卒中の診断の精度を高める。本明細書に開示される提供される方法および発明は、特異性および特異性の増大をもたらす。

10

【0093】

本明細書では、虚血性脳卒中のバイオマーカを識別するための方法が提供される。本方法は、第1の虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイル測定するステップ、および第2の虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイル測定するステップを含み得る。バイオマーカの第1の群は、第1の虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイルをポリヌクレオチド参照プロファイルと比較することによって識別され得る。例えば、バイオマーカの第1の群は、その発現レベルが、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較して、第1の虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされる遺伝子を含み得る。バイオマーカの第2の群は、第2の虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイルを、ポリペプチド参照プロファイルと比較することによって識別され得る。一部の場合には、バイオマーカの第2の群は、その発現レベルが、ポリペプチド参照プロファイルと比較して、第2の虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされるポリペプチドを含み得る。本方法は、バイオマーカの第1の群およびバイオマーカの第2の群を分析するステップ、および虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカを識別するステップをさらに含み得る。例えば、1つまたは複数のバイオマーカは、そのmRNA発現レベルおよびタンパク質発現レベルが、非虚血性脳卒中対象における遺伝子およびタンパク質発現レベルと比較して、アップレギュレートまたはダウンレギュレートされている遺伝子を含んでもよい。

20

【0094】

試料は、生物体から得てもよく、または対象の構成要素（例えば、細胞）から得てもよい。試料は、任意の生物学的組織であってもまたは液体であってもよい。本明細書中の試料としては、脳細胞または組織、脳脊髄液、神経組織、痰、血液、血清、血漿、血液細胞（例えば、白血球）、組織試料、生検試料、尿、腹腔液および胸膜液、唾液、精液、乳房浸出液、涙液、粘液、リンパ、サイトゾル、腹水、羊水、膀胱洗浄液、気管支肺胞洗浄液またはそれ由来の細胞、とりわけ他の体液試料、ならびにその組合せが挙げられる。試料は体液であってもよい。体液は無細胞核酸を含んでもよい。そのような体液は、本明細書に記載の任意の流体試料であってもよい。例えば、体液は血液またはその画分であってもよい。一部の場合には、体液は血漿である。一部の場合には、体液は血清である。

30

【0095】

無細胞核酸は、細胞に結合していない任意の細胞外核酸であってもよい。無細胞核酸は、血液中を循環する核酸であってもよい。あるいは、無細胞核酸は、他の体液、例えば尿中の核酸であってもよい。一部の場合には、無細胞核酸は、DNA、例えばゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、またはその断片である。一部の場合には、無細胞核酸は、RNA、例えば、mRNA、siRNA、miRNA、cRNA、tRNA、rRNA、小型核小体RNA（snRNA）、Piwi相互作用RNA（piRNA）、長ncRNAまたはその断片である。無細胞核酸は、二本鎖、一本鎖、またはそれらのハイブリッドであってもよい。無細胞核酸は、分泌または細胞死プロセス、例えば細胞壊死およびアポトーシスによって体液中に放出され得る。

40

【0096】

本明細書に開示される方法は、1つまたは複数の種類の細胞または組織に特異的な無細

50

胞核酸を測定するステップを含み得る。一部の 경우에는、ある種類の細胞または組織に特異的な無細胞核酸は、専らもしくは大部分がその種類の細胞もしくは組織から産生されるか、またはそれに由来する。一部の 경우에는、ある種類の細胞または組織に特異的な無細胞核酸も、他の種類の細胞または組織から産生されるか、またはそれに由来する。例えば、無細胞核酸は、神経血管単位の細胞に特異的であり得る。例えば、無細胞核酸は、好中球細胞外トラップに由来し得る。

【0097】

一部の 경우에는、神経血管単位は、内皮細胞、基板、星状細胞足プロセス、周皮細胞、ミクログリアまたはニューロンのうちの1つまたは複数を含む動的構造を含む。一部の 경우에는、好中球細胞外トラップは、細胞外繊維の網目状構造を含んでもよい。一部の 경우에는、細胞外繊維はDNAを含んでもよい。一部の 경우에는、細胞外繊維は、好中球由来のDNAを含んでもよい。

10

【0098】

後成的マーカーは、1つまたは複数の種類の細胞または組織に特異的であり得る。一部の 경우에는、後成的マーカーは、1つまたは限られた種類の細胞または組織からの遺伝子によってのみ、またはそれによって主に有され得る。一部の 경우에는、後成的マーカーは、対象の神経血管単位からの細胞に特異的である。

【0099】

上記の無細胞核酸または後成的マーカーは、脳、肺、肝臓、心臓、脾臓、膵臓、小腸、大腸、骨格筋、平滑筋、皮膚、骨、脂肪組織、毛髪、甲状腺、気管、胆嚢、腎臓、尿管、膀胱、大動脈、静脈、食道、横隔膜、胃、直腸、副腎、気管支、耳、眼、網膜、生殖器、視床下部、喉頭、鼻、舌、脊髄、または尿管、子宮、卵巣、精巣、および/またはその任意の組合せを含む、1つまたは複数の組織に特異的であり得る。

20

【0100】

上記で考察された無細胞核酸または後成的マーカーは、トリコサイト、ケラチノサイト、ゴナドトロピン産生細胞、コルチコトロピン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、プロラクチン分泌細胞、クロム親和性細胞、傍濾胞細胞、グロムス細胞メラニン形成細胞、神経細胞、メルケル細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞、角膜実質細胞、網膜ミュラー細胞、網膜色素上皮細胞、ニューロン、グリア細胞（例えば希突起膠細胞星状細胞）、上衣細胞、松果体細胞、肺細胞（例えば、I型肺細胞およびII型肺細胞）、クララ細胞、杯細胞、G細胞、D細胞、腸クロム親和性細胞様細胞、胃主細胞、壁細胞、小窩細胞、K細胞、D細胞、I細胞、杯細胞、パネート細胞、腸細胞、マイクログフォールド細胞、肝細胞、肝星細胞（例えば、中胚葉由来のクッパー細胞）、胆嚢細胞、腺房中心細胞、膵臓星細胞、膵臓細胞、膵臓細胞、膵臓細胞、膵臓F細胞、膵臓細胞、甲状腺（例えば、濾胞上皮細胞）、副甲状腺（例えば、副甲状腺主細胞）、好酸性細胞、尿路上皮細胞、骨芽細胞、骨細胞、軟骨芽細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋芽細胞、筋細胞、ミオサテライト細胞、腱細胞、心筋細胞、脂肪芽細胞、脂肪細胞、カハールの間質細胞、血管芽細胞、内皮細胞、メサングウム細胞（例えば、髄腔内メサングウム細胞および系球体外メサングウム細胞）、傍系球体細胞、緻密斑細胞、間質細胞（stromal cell）、間質細胞（interstitial cell）、テロサイト単純上皮細胞（telocytes simple epithelial cell）、有足細胞、腎臓近位尿管刷子縁細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、顆粒膜細胞、ペグ細胞、生殖細胞、精子卵子、リンパ球、骨髄細胞、内皮前駆細胞、内皮幹細胞、血管芽細胞、間葉系幹細胞、周辺壁細胞、および/またはその任意の組合せを含む、1つまたは複数の種類の細胞に特異的であり得る。

30

40

【0101】

試料は、新鮮なものであってももしくは、凍結されていてもよく、および/または、例えば、ヘパリン、クエン酸塩、またはEDTAを用いて処理されてもよい。試料は、組織学的目的のために採取された凍結切片などの組織の切片も含んでもよい。一部の 경우에는、試料は、虚血性脳卒中試料であってもよい。虚血性脳卒中試料は、虚血性脳卒中を有する

50

か、または虚血性脳卒中を有するリスクを有する対象由来の試料であってもよい。一部の場合には、虚血性脳卒中試料は、虚血性脳卒中を有する対象由来の試料であってもよい。例えば、虚血性脳卒中試料は、虚血性脳卒中の約0.5時間～約120時間の範囲内の対象からの試料中のあってもよい。特定の例では、虚血性卒中試料は、虚血性脳卒中の約0.5時間、1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、4.5時間、5時間、5.5時間、6時間、6.5時間、7時間、7.5時間、8時間、10時間、12時間、15時間、20時間、24時間、50時間、72時間、96時間、120時間、150時間、または200時間以内の対象由来の試料であってもよい。

【0102】

一部の場合には、試料は生体液であってもよい。試料が生物学的液体であるとき、流体試料の容積は1mL（ミリリットル）より大きくてもよい。一部の場合には、流体試料の容積は、約1.0mL～約15mLの範囲内であってもよい。例えば、試料の容積は、約1.0mL、1.1mL、1.2mL、1.4mL、1.6mL、1.8mL、1.9mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL、7mL、8mL、9mL、または10mLであってもよい。あるいは、場合によっては、流体試料の容積は、1mL以下であってもよい。例えば、試料の容積は、0.00001mL、0.0001mL、0.001mL、0.01mL、0.1mL、0.2mL、0.4mL、0.6mL、0.8mL、1mL未満であってもよい。

【0103】

本明細書に開示される試料は血液であってもよい。例えば、試料は末梢血であってもよい。一部の場合には、試料は血液の一部であってもよい。一例では、試料は血清であってもよい。別の例では、試料は血清であってもよい。別の例では、試料は、血液中を循環する1つまたは複数の細胞を含んでもよい。このような細胞としては、赤血球（例えば、赤血球）、白血球（例えば、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、および単球（例えば、末梢血単核細胞）を含む、白血球）、血小板（例えば、血小板）、循環腫瘍細胞、または末梢血中を循環する任意の種類細胞およびその組合せが挙げられる。

【0104】

試料は、対象由来であってもよい。一部の場合には、対象はヒト、例えば、ヒト患者であってもよい。一部の場合には、対象は、家畜（例えば、イヌまたはネコ）または霊長類などの哺乳動物を含む非ヒト動物であってもよい。試料は、1つまたは複数のポリペプチドもしくはタンパク質のバイオマーカー、または本明細書に開示されるポリヌクレオチドバイオマーカー（例えば、mRNA）を含んでもよい。対象は、状態（例えば、疾患）を有することが疑われる場合がある。例えば、対象は、脳卒中（例えば、虚血性脳卒中）を有することが疑われる場合がある。

【0105】

脳卒中は、脳の一部への血液供給が中断されるか、または重度に減少して、脳組織が酸素および栄養素を奪われたときに生じる医学的状态を指し得る。数分以内で、脳細胞は死に始める場合がある。脳卒中は、虚血性脳卒中、出血性脳卒中および一過性虚血発作（TIA）を含み得る。虚血性脳卒中は、脳の領域への血流の減少または消失が生じ、組織の損傷または破壊をもたらすときに起こり得る。出血性脳卒中は、脳に位置する血管が破裂して、血液が脳組織に直接漏れ、蓄積するときに生じ得る。一時的な虚血発作または軽度脳卒中は、血管が一時的に閉塞したときに生じ得る。虚血性脳卒中には、血栓性、塞栓性、腋窩性および低灌流型の脳卒中を挙げることができる。

【0106】

虚血性脳卒中対象は、虚血性脳卒中を有するか、または虚血性脳卒中を有するリスクを有する対象を指し得る。一部の場合には、虚血性脳卒中対象は、24時間以内に虚血性脳卒中を有する対象であってもよい。特定の例において、虚血性脳卒中対象は、4.5時間以内に虚血性脳卒中を有する対象であってもよい。非虚血性脳卒中対象とは、虚血性脳卒中を有していない対象であってもよい。一部の場合には、非虚血性脳卒中対象とは、虚血性脳卒中を有さず、虚血性脳卒中を有するリスクのない対象であってもよい。

10

20

30

40

50

【0107】

脳卒中（例えば、虚血性脳卒中）を有する対象は、1つまたは複数の脳卒中症状を有する場合がある。脳卒中症状は、任意の種類（例えば、虚血性脳卒中または出血性脳卒中）の発症時に存在し得る。脳卒中症状は、任意の種類（例えば、虚血性脳卒中または出血性脳卒中）の発症の前または後に存在してもよい。脳卒中症状としては、National Stroke Associationが認める次のような症状が挙げられる：（a）顔、腕または脚の（特に身体の片側の）突然の麻痺または衰弱；（b）突然の混乱、言葉遣いまたは理解の問題；（c）一方または両方の眼の突然の視力トラブル；（d）突然の歩行、めまい、バランスまたは調整の喪失という問題、および（e）原因不明の突然の重度の頭痛。

【0108】

非虚血性脳卒中対象は、疑似脳卒中症状を有する場合がある。疑似脳卒中症状としては、疼痛、頭痛、失語症、失行症、失認症、健忘症、昏迷、混乱、めまい、昏睡、せん妄、認知症、発作、片頭痛不眠、過眠症、睡眠時無呼吸、振戦、運動障害、麻痺、視覚障害、複視、知覚異常、構音障害、半身不随、片側感覚消失および片側視野欠損が挙げられる。脳卒中に罹患していない対象に疑似脳卒中症状が存在するとき、症状は「疑似脳卒中（stroke mimics）」と呼んでもよい。脳卒中の鑑別診断の状態としては、脳腫瘍（例えば、原発性および転移性疾患）、動脈瘤、感電、火傷、感染症（例えば、髄膜炎）、脳低酸素症、頭部損傷（例えば、脳震盪）、外傷性脳損傷、ストレス、脱水、神経麻痺（例えば、脳または末梢）、低血糖症、片頭痛、多発性硬化症、末梢血管障害、末梢神経障害、発作（例えば、大発作）、硬膜下血腫、失神、および一過性の片側性の衰弱が挙げられる。本明細書中に開示される虚血性脳卒中のバイオマーカーは、急性虚血性脳卒中をこれらの疑似脳卒中から区別することができるバイオマーカーであってもよい。一部の場合には、本明細書中に開示されるバイオマーカーは、本明細書中に開示される疑似脳卒中を識別することができる。一部の場合には、本明細書中に開示されるバイオマーカーは、本明細書中に開示される非脳卒中状態を識別することができる。

【0109】

バイオマーカーは、生体分子を指してもよい。一部の場合には、バイオマーカーは、疾患に関連する生体分子であってもよい。疾患に関連するとき、バイオマーカーは、非疾患状態と比較して疾患状態下で異なるプロファイルを有する場合がある。バイオマーカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、炭水化物および脂質を含む、任意のクラスの生体分子であってもよい。一部の場合には、バイオマーカーはポリヌクレオチドであってもよい。一部の場合には、バイオマーカーは、ポリペプチドであってもよい。ポリヌクレオチドは、DNA、RNA、それらのハイブリダイゼーション、またはその任意の組合せを含む、任意の種類（例えば、cDNA、ゲノムDNA、mRNA、tRNA、rRNAまたはマイクロRNA）の核酸分子であってもよい。一部の場合には、ポリヌクレオチドは、血液中を循環する無細胞核酸分子であってもよく、または血液中を循環する細胞中の細胞核酸分子であってもよい。ポリペプチドまたはタンパク質は、その任意の断片、特に免疫学的に検出可能な断片を含むことが企図され得る。バイオマーカーは、フルサイズのバイオマーカーと同じまたは実質的に同じ機能を依然として有するような十分な配列を有するバイオマーカーの1つまたは複数の断片を含んでもよい。バイオマーカーの活性断片は、フルサイズバイオマーカーの活性の100%、またはその活性の少なくとも約99%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、もしくは少なくとも50%を保持する。ある特定の場合によっては、バイオマーカーの活性断片は検出可能であってもよい（例えば、抗体によって検出可能なポリペプチド、またはオリゴヌクレオチドによって検出可能なポリヌクレオチド）。虚血性脳卒中のバイオマーカーは、虚血性脳卒中に関連する生体分子であってもよい。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、虚血性脳卒中に関連するが、他の疾患と関連しない生体分子であってもよい。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、虚血性脳卒中および他の疾患に関連する生体分子であってもよい。

【0110】

本明細書の方法、デバイス、およびキットは、状態を評価するために使用され得る。状態とは、対象の疾患または疾患のリスクであってもよい。例えば、本方法は、対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップ、および発現に基づいて対象における疾患または疾患のリスクを評価するステップを含み得る。一部の場合には、状態は、脳卒中のリスク因子、例えば、高血圧、心房細動、高コレステロール、糖尿病、アテローム性動脈硬化症、循環障害、タバコ使用、アルコール使用、身体活動不能、肥満、年齢、性別、人種、家族歴、以前の脳卒中、以前の一過性虚血発作（TIA）、線維筋性異形成、卵円孔開存、またはその任意の組合せであり得る。対象において1つまたは複数のリスク因子が知られている場合、例えば、バイオマーカーの群の発現と組み合わせ、そのリスク因子を使用して、対象における虚血性脳卒中または虚血性脳卒中のリスクを評価してもよい。

10

【0111】

状態とは疾患であり得る。疾患は虚血性脳卒中であってもよい。一部の場合には、疾患はアルツハイマー病またはパーキンソン病であってもよい。一部の場合には、疾患は、自己免疫疾患、例えば、急性播種性脳脊髄炎（ADEM）、急性壊死性出血性白血球炎、アジソン病、無ガンマグロブリン血症、アレルギー性喘息、アレルギー性鼻炎、円形脱毛症、アミロイドーシス、強直性脊椎炎、抗GBM/抗TBM腎炎、抗リン脂質症候群（APS）、自己免疫再生不良性貧血、自己免疫自律神経障害、自己免疫肝炎、自己免疫脂質異常症、自己免疫不全、自己免疫内耳疾患（AIED）、自己免疫心筋炎、自己免疫性膀胱炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性血小板減少性紫斑病（ATP）、自己免疫甲状腺疾患、軸索&ニューロン神経障害、パロ病、ベーチエット病、水疱性類天疱瘡、心筋症、キャッスルマン（Castlemenn）病、セリアックスブルー（非熱帯性）、シャーガス病、慢性疲労症候群、慢性炎症性脱髄性多発ニューロパシー（CIDP）、慢性再発性多巣性骨髄炎（CRMO）、チャグ・ストラウス症候群、癩痕性類天疱瘡/良性粘膜類天疱瘡、クローン病、コーガン症候群、寒冷凝集素病、先天性心ブロック、コクサッキー心筋炎、クレスト病、本態性混合型クリオグロブリン血症、脱髄性ニューロパシー、皮膚筋炎、デビック病（視神経脊髄炎）、円板状ループス、ドレスラー症候群、子宮内膜症、好酸性筋膜炎、結節性紅斑、実験的アレルギー性脳脊髄炎、エヴァンス症候群、線維筋痛症、線維性肺胞炎、巨細胞性動脈炎（側頭動脈炎）、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、グレープス病、ギラン・バレー症候群、橋本脳炎、橋本甲状腺炎、溶血性貧血、ヘノック・シェーンライン（Henock-Schonlein）紫斑病、妊娠性疱疹、低ガンマグロブリン血症、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、IgA腎症、免疫調節性リポタンパク質、封入体筋炎、インスリン依存性糖尿病（1型）、間質性膀胱炎、若年性関節炎、若年性糖尿病、川崎症候群、ランバート・イートン症候群、白血球破壊性血管炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、木質性結膜炎、線状IgA病（LAD）、ループス（SLE）、ライム病、メニエール病、顕微鏡的多発血管炎、混合性結合組織病（MCTD）、モーレン潰瘍、ムッハ・ハーベルマン病、多発性硬化症、重症筋無力症、筋炎、ナルコレプシー、視神経脊髄炎（デビック病）、好中球減少症、眼癩痕性類天疱瘡、視神経炎、回帰性リウマチ、PANDAS（溶連菌関連性小児自己免疫性神経精神疾患）、傍腫瘍性小脳変性症、発作性夜間血色素尿症（PNH）、パリー・ロンベルグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、毛様体扁平部炎（末梢ブドウ膜炎）、天疱瘡、末梢ニューロパシー、静脈周囲脳脊髄炎、悪性貧血、POEMS症候群、結節性多発動脈炎、I型、II型およびIII型の多腺性自己免疫症候群、リウマチ性多発筋痛症、多発性筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、プロゲステロン皮膚炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、乾癬、乾癬性関節炎、特発性肺線維症、壊疽性膿皮症、赤芽球癆、レイノー現象、反射性交感神経性ジストロフィー、ライター症候群、再発性多発性軟骨炎、下肢静止不能症候群、後腹膜線維症、リウマチ熱、慢性関節リウマチ、サルコイドーシス、シュミット症候群、強膜炎、強皮症、スログレン（Slogren）症候群、精子および精巢の自己免疫、全身硬直症候群、亜急性細菌性心内膜炎（SBE）、交感性眼炎、高安動脈炎、側頭動脈炎/巨細胞性動脈炎、血小板減少性紫斑病（TPP）、トロサ・ハント症候群、横断性脊髄炎

20

30

40

50

、潰瘍性大腸炎、未分化型結合組織病（UCTD）、ブドウ膜炎、血管炎、小水疱性皮膚症、白斑もしくはウェゲナー肉芽腫症または、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、拡張型心筋症、心筋炎、多内分泌腺自己免疫（autoimmune polyendocrine）症候群I型（APS-I）、嚢胞性線維症性血管炎（cystic fibrosis vasculitides）、後天性副甲状腺機能低下症、冠動脈疾患、落葉状天疱瘡、尋常性天疱瘡、ラスムッセン脳炎、自己免疫性胃炎、インスリン低血糖（insulin hypoglycemic）症候群（平田病）、B型インスリン抵抗性、表皮肥厚、全身性エリテマトーデス（SLE）、悪性貧血、治療抵抗性ライム関節炎、多発ニューロパシー、脱髄疾患、アトピー性皮膚炎、自己免疫性甲状腺機能低下症、白斑、甲状腺関連眼疾患、自己免疫性セリアック病、ACTH欠損症、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、全身性硬化症、進行性全身性硬化症、モルフェア、原発性抗リン脂質症候群、慢性特発性蕁麻疹、結合組織症候群、壊死性半月体形成性糸球体腎炎（NCGN）、全身性血管炎、レイノー症候群、慢性肝疾患、内臓リーシュマニア、自己免疫性C1欠損症、膜増殖性糸球体腎炎（MPGN）、凝固時間延長、免疫不全、アテローム性動脈硬化症、神経細胞障害、腫瘍随伴性天疱瘡、腫瘍随伴性全身硬直症候群、腫瘍随伴性脳脊髄症、亜急性自律神経性神経障害、癌関連網膜症、腫瘍随伴性眼球クローヌス・ミオクローヌス運動失調、下位運動ニューロン症候群、およびランバート・イートン筋無力症候群であってもよい。

10

【0112】

一部の場合には、疾患は、がん、例えば、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、副腎皮質癌、AIDS関連がん、AIDS関連リンパ腫、肛門がん、虫垂がん、星細胞腫、小児小脳または大脳のがん、基底細胞癌、胆管がん、肝臓外、膀胱がん、骨がん、骨肉腫/悪性線維性組織球腫、脳幹神経膠腫、脳腫瘍、脳腫瘍、小脳正常細胞腫、脳腫瘍、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫、脳腫瘍、上衣細胞腫、脳腫瘍、髄芽細胞腫、脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、脳腫瘍、視覚伝導路および視床下部膠腫、乳がん、気管支腺腫/カルチノイド、パーキットリンパ腫、カルチノイド腫瘍、小児期、カルチノイド腫瘍、消化管、原発不明癌、中枢神経系リンパ腫、原発性、小脳星（状）細胞腫、小児期、大脳星細胞腫/悪性神経膠腫、小児期、子宮頸がん、小児がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性障害、結腸がん、皮膚T細胞リンパ腫、脱細胞性小円形細胞腫瘍、子宮内膜がん、上衣腫、食道がん、ユーイングファミリーの腫瘍のユーイング肉腫、頭蓋外生殖細胞腫瘍、小児期、性腺外胚細胞腫瘍、肝外胆管がん、眼がん、眼内黒色腫、眼がん、網膜芽細胞腫、胆嚢がん、胃（胃）がん、胃腸カルチノイド腫瘍、消化管間質腫瘍（GIST）、生殖細胞腫瘍：頭蓋外、性腺外、または卵巣のがん、妊娠性絨毛腫瘍、脳幹神経膠腫、神経膠腫、小児大脳星細胞腫、神経膠腫、小児期視覚経路および視床下部、胃カルチノイド、毛状細胞白血病、頭頸部がん、心臓がん、肝細胞（肝臓）がん、ホジキンリンパ腫、下咽頭がん、視床下部および視覚経路神経膠腫、小児期、眼内黒色腫、膵島細胞癌（内分泌膵臓）、カポジ肉腫、腎がん（腎細胞がん）、喉頭がん、白血病、白血病、急性リンパ芽球白血病（急性リンパ球性白血病とも呼ばれる）、白血病、急性骨髄性（急性骨髄性白血病とも呼ばれる）、白血病、慢性リンパ球性白血病（慢性リンパ性白血病とも呼ばれる）、白血病、慢性骨髄性白血病（慢性骨髄性白血病とも呼ばれる）、白血病、毛状細胞、口唇および口腔腔内がん、肝臓がん（原発性）、肺がん、非小細胞、肺がん、小細胞、リンパ腫、リンパ腫、AIDS関連、リンパ腫、パーキット、リンパ腫、皮膚T細胞、リンパ腫、ホジキン、リンパ腫、非ホジキン（ホジキン以外の全てのリンパ腫の古い分類）、リンパ腫、原発性中枢神経系、マーカス・ホイットル（Marcus Whittle）、致死的な病気、マクログロブリン血症、ヴァルデンストレーム、骨の悪性線維性組織球腫/骨肉腫、髄芽細胞腫、小児期、黒色腫、黒色腫、眼内（眼）、メルケル細胞癌、中皮腫、成人悪性腫瘍、中皮腫、小児期、原発不明の転移性扁平上皮頸部がん、口腔がん、多発性内分泌機能低下症候群、小児期、多発性黒色腫/形質細胞新生物、菌状息肉腫、骨髄異形成症候群、脊髄形成異常/骨髄増殖性疾患、骨髄性白血病、慢性、骨髄性白血病、成人急性、骨髄性白血病、小児期急性、黒色腫、多発性（骨髄のがん

20

30

40

50

)、骨髄増殖性障害、慢性、鼻腔および副鼻腔がん、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、口腔がん、卵黄卵管がん、骨の骨肉腫/悪性線維性組織球腫、卵巣がん、卵巣上皮がん(表面上皮-間質腫瘍)、卵巣生殖細胞腫瘍、卵巣低悪性度腫瘍、膵臓がん、膵臓がん、島細胞、副鼻腔および鼻腔のがん、副甲状腺がん、陰茎がん、咽頭がん、褐色細胞腫、松果体星状細胞腫、松果体胚細胞腫、松果体芽細胞腫およびテント上未分化神経外胚葉性腫瘍、小児期、下垂体腺腫、形質細胞新生物/多発性黒色腫、胸膜肺芽腫、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌(腎臓がん)、腎盂および尿管、転移性細胞がん、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、小児期、唾液腺がん、肉腫、ユーンゲファミリーの腫瘍、肉腫、カポジ肉腫、肉腫、軟部組織、肉腫、子宮、セザリー症候群、皮膚がん(非黒色腫)、皮膚がん(黒色腫)、皮膚癌、メルケル細胞、小細胞肺癌、小腸がん、軟部組織肉腫、扁平上皮癌(皮膚がん(非黒色腫)参照)、原発不明扁平上皮頸部がん、転移性、胃がん、上咽頭原発性神経外胚葉腫瘍、小児期、T細胞リンパ腫、皮膚がん(菌状息肉腫およびセザリー症候群参照)、精巣がん、咽頭がん、胸腺腫、小児期、胸腺腫および胸腺癌、甲状腺がん、甲状腺がん、小児期、腎盂および尿管の転移性細胞がん、栄養膜腫瘍、妊娠性、未知の原発部位、成人の癌腫、未知の原発部位、小児期、尿路および腎盂のがん、転移性細胞がん、尿道がん、子宮がん、子宮内膜、子宮肉腫、膣がん、視覚経路および視床下部神経膠腫、小児期、乳頭がん、ワルデンスレーマクログロブリン血症、ウィルムス腫瘍(腎臓がん)、小児期であってもよい。

10

20

30

40

50

【0113】

一部の場合には、疾患は、炎症性疾患、感染性疾患、心血管疾患および代謝性疾患であってもよい。特定の感染症としては、限定するものではないが、AIDS、炭疽菌、ボツリヌス中毒、ブルセラ症、甲状腺炎、クラミジア感染、コレラ、コクシジオイデス症、クリプトスポリジウム症、シクロスポラ症、ジフテリア(diphtheria)、エールリヒア症、アルボウイルス脳炎、腸炎出血性*Escherichia coli*、ジアルジア症、淋病、デング熱、インフルエンザ菌、ハンセン病(らい病)、ハンタウイルス肺症候群、溶血性尿毒症症候群、A型肝炎、B型肝炎、C型肝炎、ヒト免疫不全ウイルス、レジオネラ症、リステリア症、ライム病、マラリア、麻疹、髄膜炎菌性疾患、流行性耳下腺炎、百日咳(百日咳)、伝染病、麻痺性灰白髄炎、オウム病、Q熱、狂犬病、ロッキー山発疹熱、風疹、先天性風疹症候群(SARS)、細菌性赤痢、天然痘、連鎖球菌性疾患(侵襲性A群)、連鎖球菌毒素性ショック症候群、肺炎連鎖球菌、梅毒、破傷風、毒素性ショック症候群、旋毛虫病、結核、野兔病、腸チフス、バンコマイシン中耐性黄色ブドウ球菌、水痘、黄熱病、変異型クロイツフェルトヤコブ病(vCJD)、エボラ出血熱、エキノкокクス症、Hendraウイルス感染、ヒトのサル痘、インフルエンザA、H5N1、ラッサ熱、マールブルグ出血熱、ニパウイルス、オニオン(O'nyong)熱、リフトバレー熱、ベネズエラマ脳炎および西ナイルウイルスが挙げられる。

【0114】

一部の実施形態では、本明細書に記載の方法、デバイスおよびキットは、本明細書に開示されている疾患の1つまたは複数を検出することができる。一部の実施形態では、本明細書に開示される1つまたは複数のバイオマーカーを使用して、本明細書に開示される1つまたは複数の疾患を評価してもよい。一部の実施形態では、本明細書に開示されているバイオマーカーの1つまたは複数を使用して、本明細書に開示される1つまたは複数の疾患を検出してもよい。

【0115】

本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、分化抗原群ファミリーメンバー、ミエリンおよびリンパ球タンパク質(MAL)、Ras-ERK経路の阻害剤、DNA結合ファミリーの阻害剤のメンバー、リソソームシステインプロテイナーゼ、運動タンパク質、および色素上皮由来因子の受容体のうちの1つまたは複数を含んでもよい。例えば、本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、

分化抗原群ファミリーメンバーM A L、R a s - E R K経路の阻害剤、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバー、リソソームシステインプロテイナーゼ、運動タンパク質、および色素上皮由来因子の受容体のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個を含んでもよい。

【0116】

バイオマーカーの中で、炭疽毒素受容体は、炭疽毒素受容体1 (A N T X R 1) および炭疽毒素受容体2 (A N T X R 2) を含んでもよい。一部の場合には、炭疽毒素受容体は、A N T X R 1 であってもよい。バイオマーカーの中で、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼは、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ3 (S T K 3) およびセリン/トレオニン-プロテインキナーゼ4 (S T K 4) を含んでもよい。一部の場合には、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼは、S T K 3 であってもよい。バイオマーカーのうちでも、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼとしては、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム1 (P D K 1)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム2 (P D K 2)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム3 (P D K 3)、およびピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼアイソザイム4 (P D K 4) が挙げられる。一部の場合には、ピルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼは、P D K 4 であってもよい。バイオマーカーの中で、分化抗原群ファミリーメンバーは、分化抗原群163 (C D 1 6 3) であってもよい。バイオマーカーの中で、R a s - E R K経路の阻害剤は、G R B 2 関連アダプタータンパク質 (G R A P) およびG R B 2 関連アダプタータンパク質2 (G R A P 2) を含んでもよい。一部の場合には、R a s - E R K経路の阻害剤は、G R A P であってもよい。バイオマーカーのうち、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバーは、D N A結合の阻害剤1 (I D 1)、D N A結合の阻害剤2 (I D 2)、D N A結合の阻害剤3 (I D 3)、およびD N A結合の阻害剤4 (I D 4) を含んでもよい。一部の場合には、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバーは、I D 3 であってもよい。バイオマーカーの中で、リソソームシステインプロテイナーゼは、C T S B、C T S C、C T S F、C T S H、C T S K、C T S L 1、C T S L 2、C T S O、C T S S、C T S W、およびC T S Zを含む、カテプシン (C T S) であってもよい。C T S A、C T S D、C T S E、およびC T S Gを含む、他のC T Sを本明細書のバイオマーカーとして使用してもよい。一部の場合には、リソソームシステインプロテイナーゼは、C T S Z であってもよい。バイオマーカーの中で、運動タンパク質としては、キネシン様タンパク質5 A (K I F 5 A)、キネシン様タンパク質5 B (K I F 5 B)、キネシン様タンパク質5 C (K I F 5 C)、キネシン様タンパク質3 A (K I F 3 A)、キネシン様タンパク質3 B (K I F 3 B)、キネシン様タンパク質1 7 (K I F 1 7)、キネシン様タンパク質1 A (K I F 1 A)、キネシン様タンパク質1 B (K I F 1 B)、キネシン様タンパク質1 C (K I F 1 C)、キネシン様タンパク質1 3 A (K I F 1 3 A)、キネシン様タンパク質1 3 B (K I F 1 3 B)、キネシン様タンパク質1 6 B (K I F 1 6 B)、キネシン様タンパク質4 (K I F 4)、およびキネシン様タンパク質2 1 B (K I F 2 1 B) を含む、キネシン様タンパク質が挙げられる。一部の場合には、キネシン様タンパク質は、K I F 1 B であってもよい。バイオマーカーのうち、色素上皮由来因子の受容体としては、プレキシンドメイン含有タンパク質1 (P L X D C 1) およびプレキシンドメイン含有タンパク質2 (P L X D C 2) が挙げられる。一部の場合には、色素上皮由来因子の受容体は、P L X D C 1 であってもよい。一部の場合には、本明細書中に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、およびP L X D C 2 のうちの1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個を含んでもよい。

【0117】

本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、本明細書に開示されるバイオマーカーの任意の組合せを含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体を含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体およびセリン/トレオニン-プロテインキナーゼを含んでもよい。本明細書に開示されるバイ

10

20

30

40

50

オマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、および
 ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼを含んでもよい。本明細書に開示される
 バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、ピ
 ルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、および分化抗原群ファミリーメンバ
 ーを含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/
 トレオニン-プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、分
 化抗原群ファミリーメンバ、ならびにミエリンおよびリンパ球タンパク質を含んでもよ
 い。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン
 -プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、分化抗原群フ
 ァミリーメンバ、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、ならびにR a s - E R K経路の
 阻害剤を含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、
 セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナ
 ーゼ、分化抗原群ファミリーメンバ、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、R a s - E
 R K経路の阻害剤、ならびにD N A結合ファミリーの阻害剤のメンバを含んでもよい。
 本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プ
 ロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、分化抗原群ファミ
 リーメンバ、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、R a s - E R K経路の阻害剤、D N
 A結合ファミリーの阻害剤のメンバ、ならびにリソソームシステインプロテイナーゼを
 含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン/
 トレオニン-プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、分
 化抗原群ファミリーメンバ、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、R a s - E R K経路
 の阻害剤、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバ、リソソームシステインプロテイナ
 ーゼ、ならびに運動タンパク質を含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの
 群は、炭疽毒素受容体、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロ
 ゲナーゼリポアミドキナーゼ、分化抗原群ファミリーメンバ、ミエリンおよびリンパ球
 タンパク質、R a s - E R K経路の阻害剤、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバ、
 リソソームシステインプロテイナーゼ、運動タンパク質、ならびに色素上皮由来因子の受
 容体を含んでもよい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、炭疽毒素受容体、セリン
 /トレオニン-プロテインキナーゼ、ビルビン酸デヒドロゲナーゼリポアミドキナーゼ、
 分化抗原群ファミリーメンバ、ミエリンおよびリンパ球タンパク質、R a s - E R K経
 路の阻害剤、D N A結合ファミリーの阻害剤のメンバ、リソソームシステインプロテイ
 ナーゼ、運動タンパク質、ならびに色素上皮由来因子の受容体のうちの1、2、3、4、
 5、6、7、8、9または10個を含んでもよい。

【0118】

本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2を含んでもよい。本明細書
 に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2およびS T K 3を含んでもよい。本明
 細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、およびP D K 4を含
 んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P
 D K 4、およびC D 1 6 3を含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は
 、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、およびM A Lを含んでもよい。本明
 細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6
 3、M A L、およびG R A Pを含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群
 は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、およびI D 3
 を含んでもよい。本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3
 、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、およびC T S Zを含んでもよい。
 本明細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D
 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、およびK I F 1 Bを含んでもよい。本明
 細書に開示されるバイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6
 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、およびP L X D C 2を含んでも
 よい。一部の場合には、バイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C

D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、および P L X D C 2 のうちの 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 1 0 個を含んでもよい。

【 0 1 1 9 】

本明細書のバイオマーカーの群は、任意の数のバイオマーカーを含んでもよい。例えば、バイオマーカーの群は、少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、400、800、または 1000 個のバイオマーカーを含んでもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 個のバイオマーカーを含む。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、および P L X D C 2 のうちの約 1、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個を含んでもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの群は、図 2 3 A および 図 2 3 B に示されるバイオマーカーのうちの少なくとも約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、または 50 個を含んでもよい。

10

【 0 1 2 0 】

本明細書に開示されるバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）としては、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド 1 9（C C L 1 9）、ケモカイン（C - C モチーフ）リガンド 2 1（C C L 2 1）、ガレクチン 3、進行したグリケーション最終産物の受容体（R A G E）、上皮好中球活性化タンパク質 7 8（E N A 7 8）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（G M - C S F）、分化抗原群 3 0（C D 3 0）、ケモカイン受容体 7（C C R 7）、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 2（C S P G 2）、I Q モチーフ含有 G T P アーゼ活性化タンパク質 1（I Q G A P 1）、オロソムコイド 1（O R M 1）、アルギナーゼ 1（A R G 1）、リンパ球抗原 9 6（L Y 9 6）、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9（M M P 9）、炭酸脱水酵素 4（C A 4）、s 1 0 0 カルシウム結合性タンパク質 A 1 2（s 1 0 0 A 1 2）、またはその活性断片のうちの少なくとも 1 つが挙げられる。一部の 경우에는、本明細書中に開示されるバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）としては、C C L 1 9、C C L 2 1、ガレクチン 3、R A G E、E N A 7 8、G M C S F、C D 3 0、C C R 7、C S P G 2、I Q G A P 1、O R M 1、A R G 1、L Y 9 6、M M P 9、C A 4、s 1 0 0 A 1 2、N a v 3、S A A、I G、I G、I G、I G、またはその活性断片をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが挙げられる。本明細書に開示されるバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）は、少なくとも 1 つのサイトカインまたはそのコードするポリヌクレオチドを含んでもよい。一部の 경우에는、本明細書に開示されるバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）としては、B A F F、M M P 9、A P P、アグリカン、ガレクチン 3、F a s、R A G E、エフリン A 2、C D 3 0、T N R 1、C D 2 7、C D 4 0、T N F、I L 6、I L 8、I L 1 0、I L 1、I F N、R A N T E S、I L 1、I L 4、I L 1 7、I L 2、G M C S F、E N A 7 8、I L 5、I L 1 2 P 7 0、T A R C、G r o A l p h a、I L 3 3、B L C B C A、I L 3 1、M C P 2、I G G 3、I G G 4、テニユールン 1 のアイソフォーム 2、およびディスインテグリンのアイソフォーム 2 またはその活性断片のうちの少なくとも 1 つが挙げられる。一部の 경우에는、本明細書に開示されるバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）としては、B A F F、M M P 9、A P P、アグリカン、ガレクチン 3、F a s、R A G E、エフリン A 2、C D 3 0、T N R 1、C D 2 7、C D 4 0、T N F、I L 6、I L 8、I L 1 0、I L 1、I F N_y、R A N T E S、I L 1、I L 4、I L 1 7、I L 2、G M C S F、F N A 7 8、I L 5、I L 1 2 P 7 0、T A R C、G r o A l p h a、I L 3 3、B L C B C A、I L 3 1、M C P 2、T L R 2、T L R 4、J A K 2、C C R 7、A K A P 7、I L 1 0、S Y K、I L 8、M y D 8 8、C D 3、C D 4、I L 2 2 R、I L 2 2、C E B P B、図 1 0 A ~ 1 0 H に列挙されるポリペプチドまたはその活性断片をコードする少なくとも 1 つのポリヌクレオチドが挙げられる。

20

30

40

50

【 0 1 2 1 】

本発明のバイオマーカーのアミノ酸および対応する核酸配列は、当該分野で公知であり、公に入手可能な刊行物およびデータベースに見出すことができる。例示的な配列は、表 1 に GenBank 受託番号の形式で示されている。

【 0 1 2 2 】

【 表 1 - 1 】

表 1 例示的なバイオマーカーおよび受託番号

遺伝子名	受託番号(mRNA)	受託番号(タンパク質)
ケモカイン(C-C モチーフ) 受容体 7(CCR7)	NM_001838.2	NP 001829
バーシカン(VCAN) (CSPG2)	NM_004385.2	NP 004376
IQ モチーフ含有 GTP ア ーゼ活性化タンパク質 1(IQGAP 1)	NM_003870.3	NP 003861.1
オロソムコイド 1(ORM 1)	NM_000607.2	NP 000598.2
アルギナーゼ、肝臓(ARG 1)	NM_000045.2	NP 000036.2
リンパ球抗原 96 (L Y96)	NM_015364.3	NP 056179.2
マトリックスメタロペプチダ ーゼ 9 (ゼラチナーゼ B、 92kDa ゼラチナーゼ、 92kDa IV 型コラゲナーゼ) (MMP9)	NM_004994.2	NP 004985.2
炭酸脱水酵素 IV (CA4)	NM 000717.3	NP 000708.1
S100 カルシウム結合性タ ンパク質 A12(S100A12)	NM_005621.1	NP 005612.1
B 細胞活性化因子 (BAFF)	AF116456	AAD25356
アミロイド前駆体タンパク 質(APP) (転写物バリアン ト 1)	NM_000484	BAA22264
アグリカン(転写物バリアン ト 1)	NM_001135	AAH36445
ガレクチン-3	AB006780	BAA22164
Fas (アイソフォーム 1 前 駆体)	NM_007987.2	AAH12479
進行したグリケーション最 終産物の受容体(RAGE) (アイソフォーム 1 前駆体)	NM_001136.4	AAH26069
エフリン-A2	NM_001405.3	EAW69517

10

20

30

40

【表 1 - 2】

CD30(アイソフォーム 1 前駆体)	NM_001243.4	CAC16652
TNFR1	NM_001065.3	AAA61201
CD27	NM_001242.4	NP_001233.1
CD40(アイソフォーム 1)	NM_001250.5	AAH64518
TNF α	NM_000594.3	NP_000585.2
IL-6	NM_000600.3	NP_000591.1
IL-8	NM_000584.3	NM_000584.3
IL-10	XM_011509506.1	XP_011507808.1
IL-1 β	NM_000576.2	NP_000567.1
IFN γ	NM_000619.2	NP_000610.2
活性化、正常 T 細胞発現および分泌の調節 (RANTES) (アイソフォーム 1)	NM_002985.2	EAW80120
IL-1 α	NM_000575.3	NP_000566.3
IL-4 (アイソフォーム 1)	NM_000589.3	AAH70123
IL-17	NM_002190.2	AAC50341
IL-2	NM_000586.3	AAB46883
顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GMCSF)	NM_000758.3	AAA98768
上皮由来好中球活性化ペプチド 78 (ENA-78)	NM_002994.4	CAG33709
IL-5	NM_000879.2	AAA98620.1
IL12/IL-23 p70	NM_002187.2	NP_002178.2
胸腺および活性化調節ケモカイン(TARC)	NM_002987.2	EAW82921.1
GRO-アルファ	NM_001511.	AAH11976.1
IL-33(アイソフォーム 3)	NM_033439.3	AAH47085.1
CXCL13 (BLCBCA)	NM_006419.2	AAH12589.1
IL-31	XM_011538326.1	EAW98310
単球走化性タンパク質 2 (MCP-2)	NM_005623.2	CAA71760.1

10

20

30

【 0 1 2 3 】

バイオマーカーは複数の形態で存在し得、その各々が本明細書に包含される。例えば、本明細書のバイオマーカーのパリアントは、少数、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個またはそれよりも多くのヌクレオチドまたはアミノ酸残基が、表1に示される例示的受託番号に関して異なって存在してもよい。しかしながら、これらのパリアントは、本明細書中の方法、キットおよびデバイスにおいて使用されることを意図される。さらに、本明細書のバイオマーカーは、バイオマーカーの「誘導體」を含んでもよい。バイオマーカー（またはそのコード核酸分子）の、そのバイオマーカーの修飾形態への「誘導體」。所与のバイオマーカーの修飾形態は、このような修飾形態が修飾されていない形態の生物学的活性を保持する、少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失、挿入またはその組合せを含んでもよい。アミノ酸置換は、その置換が同様の構造的または化学的特性（例えば、ロイシンのイソロイシンによる置換）をもたらすとき、「保存的」とみなすことができる。アミノ酸置換は、その構造および化学的性質が変化する（例えば、アルギニンの

40

50

アラニンへの置換)性質において「非保存的」であり得る。所与のバイオマーカーの修飾形態は、修飾形態が所与のバイオマーカーの生物学的活性を保持する化学修飾を含んでもよい。そのような修飾としては、限定するものではないが、グリコシル化、リン酸化、アセチル化、アルキル化、メチル化、ビオチン化、グルタミル化グリシル化、イソプレニル化、リポイル化、ペグ化、ホスホパンテテイル化、硫酸化、セレン化、およびC末端アミド化が挙げられる。他の修飾としては、ISG化 (ISGylation)、SUMO化、およびユビキチン化のような他のタンパク質に關与する修飾が挙げられる。さらに、修飾には、脱アミノ化および脱アミド化などのアミノ酸の化学的性質を変化させることに關与する修飾も含まれ得る。

【0124】

本明細書のバイオマーカーとしては、ユーザが虚血性脳卒中だけでなく、同時に、またはバイオマーカーの同じパネルもしくはセットを使用して他の状態も試験または検出することを望む場合には、任意の他の種類の脳卒中または他の非脳卒中状態を含む、虚血性脳卒中以外の他の疾患または状態に關連するバイオマーカーを含んでもよい。他のこのようなバイオマーカーの非限定的な例としては、血圧に關するバイオマーカー (例えば、A型ナトリウム利尿ペプチド、C型抗利尿ペプチド、ウロテンシンII、バソプレッシン、カルシトニン、アンギオテンシンII、アドレノメデュリンおよびエンドテリン)、凝固および止血に關連するバイオマーカー (例えば、D-ダイマー、プラスミン、b-トロンボグロブリン、血小板因子4、フィブリノペプチドA、血小板由来成長因子、プロトロンビン、P-セレクチンおよびトロンビン)、急性期応答に關連するバイオマーカー (例えば、C反応性タンパク質、マンノース結合性タンパク質、ヒト好中球エラスターゼ、誘導性一酸化窒素合成酵素、リゾホスファチジン酸、マロンジアルデヒドLDL、リポポリサッカライド結合性タンパク質)、ならびに炎症に關連するバイオマーカー (例えば、インターロイキン、腫瘍壊死因子、ミエロペルオキシダーゼ、可溶性細胞間接着分子、血管細胞接着分子、単球走化性タンパク質-1)が挙げられる。このような他のバイオマーカーは、患者の健康状態および脳卒中の潜在的な原因のより良い全体的臨床像を得るのを助けることができる。そのようなバイオマーカーは、当業者の知識に基づいて選択してもよい。このようなバイオマーカーのさらなる例は、当該分野において、例えば、その全体が参照によって本明細書に組み込まれる米国特許第7,608,406号で見出すことができる。

【0125】

虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーを識別するための方法は、第1の虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ、および第2の虚血性脳卒中試料中のポリペプチドのプロファイルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、第1および第2の虚血性脳卒中試料は、同じ対象 (例えば、同じ虚血性脳卒中患者)からのものであってもよい。一部の場合には、第1および第2の虚血性卒中試料は、異なる対象からのものであってもよい。第1および第2の虚血性卒中試料は、単一の試料の異なるアリコートであってもよい。例えば、第1および第2の虚血卒中試料は、虚血性脳卒中対象からの同じ血液試料の異なるアリコートであってもよい。一部の場合には、第1および第2の虚血性卒中試料は、異なる試料 (例えば、異なる対象から、または同じ対象からであるが異なる時間に採取された血液試料)からのものであってもよい。一部の場合には、第1および第2の虚血性脳卒中試料は、異なる種類の試料であってもよい。例えば、1つの虚血性脳卒中試料は、血液試料であってもよく、他の虚血性脳卒中試料は、固形組織試料であってもよい。別の例では、1つの虚血性脳卒中試料は血漿であってもよく、他の虚血性脳卒中試料は血球であってもよい。

【0126】

ポリヌクレオチドのプロファイルは、ポリヌクレオチドの特徴および/または量を含んでもよい。ポリヌクレオチドのプロファイルは、対象の試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドの発現レベル、後成的な修飾、および/または遺伝子のバリエーションを含んでもよい。一部の場合には、1つまたは複数のポリヌクレオチドの発現レベルは、1つまたは複数の遺伝子のmRNAレベルであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドのプロフ

10

20

30

40

50

ファイルは、患者の全血試料中の1つまたは複数の遺伝子のmRNAレベルであってもよい。1つまたは複数のポリヌクレオチドの後成的な修飾としては、1つまたは複数のポリヌクレオチドまたはその活性断片のアセチル化、メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化 (sumoylation)、リボシル化、またはシトルリン化が挙げられる。例えば、ポリヌクレオチドのプロファイルは、試料中の1つまたは複数のポリヌクレオチドのメチル化レベルであってもよい。1つまたは複数のポリヌクレオチドの遺伝的変異は、1つまたは複数の遺伝子またはその断片の単一ヌクレオチド変異 (SNV)、挿入、欠失、挿入/欠失、再構成、コピー数変動 (CNV) を含んでもよい。例えば、ポリヌクレオチドのプロファイルは、試料中に1つまたは複数の欠失を有する遺伝子のレベルであってもよい。ポリヌクレオチドのプロファイルはまた、試料中の1つまたは複数の遺伝子の多型 (例えば、単一ヌクレオチド多型 (SNP)) を含んでもよい。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドのプロファイルは、任意の種類核酸の発現レベルであってもよい。例えば、ポリヌクレオチドのプロファイルは、ゲノムから発現されるmiRNAのレベルであってもよい。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドのプロファイルは、体液 (例えば、血液) 中の無細胞ポリヌクレオチドの濃度も含んでもよい。例えば、ポリヌクレオチドのプロファイルは、血液中の1つまたは複数のゲノムDNA断片の無細胞DNAのレベルであってもよい。別の例では、ポリヌクレオチドのプロファイルは、血液中を循環する1種または複数のマイクロRNAのレベルであってもよい。

10

【0127】

一部の 경우에는、ポリヌクレオチドのプロファイルは、ポリヌクレオチドの発現パターンを含んでもよい。例えば、ポリヌクレオチドの発現パターンは、ポリヌクレオチドの発現レベルであってもよい。別の例では、ポリヌクレオチドの発現パターンは、ポリヌクレオチドの参照プロファイルと比較した、ポリヌクレオチドの発現レベル差であってもよい。

20

【0128】

ポリヌクレオチドのプロファイルは、核酸分析方法によって測定し得る。一部の 경우에는、核酸分析方法は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) であってもよい。PCRの例としては、増幅断片長多型PCR、対立遺伝子特異的PCR、Alu PCR、非対称PCR、コロニーPCR、ヘリカーゼ依存PCR、ホットスタートPCR、インバースPCR、インサイチュPCR、配列間特異的 (intersequence-specific) PCR、デジタルPCR、液滴デジタルPCR、リニア・アフター・ザ・エクスポネンシャル (linear-after-the-exponential) - PCR (Late PCR)、ロングPCR、ネスト化PCR、二本鎖PCR、マルチプレックスPCR、定量的PCR、またはシングルセルPCRが挙げられる。特定の例において、核酸分析方法は、定量的PCRであってもよい。一部の 경우에는、定量的PCRは、リアルタイムPCR、例えば、リアルタイム定量的PCRであってもよい。リアルタイム定量的PCRでは、増幅産物の蓄積は、標的DNAの標準希釈液および未知量の標的DNAを含む試料の両方において連続的に測定し得る。標準曲線は、標準試料における初期鋳型濃度を、産物の特定の閾値濃度を生成するのに必要なPCRサイクル数 (Ct) と関連させることにより、構築し得る。試験試料において、標的PCR産物の蓄積は、標準曲線からの標的DNA濃度の補間を可能にする同じCtの後に測定してもよい。一部の 경우에는、定量的PCRは、競合的定量的PCRであってもよい。競合的定量的PCRでは、内部競合DNAを、既知の濃度で、連続的に希釈した標準試料および未知の (環境) 試料の両方に添加してもよい。共増幅後、標準希釈液および未知試料の両方について、内部競合物および標的PCR産物の比を計算してもよく、標準希釈液の最初の標的DNA濃度に対して競合物-標的PCR産物比をプロットする標準曲線を構築してもよい。競合物質と標的DNAの増幅効率が等しいとすれば、環境試料中の標的DNAの濃度を、この標準曲線から外挿してもよい。一部の 경우에는、定量的PCRは相対的定量的PCRであってもよい。相対的定量的PCRは、特異的核酸の相対濃度を決定し得る。例えば、対象から単離されたmRNA種に対して逆転写酵素PCRを実施してもよい。特定のmRNA種の濃度が変化するこ

30

40

50

とを決定することによって、本方法で、特定の mRNA 種をコードする遺伝子が示差的に発現されるかを決定し得る。定量的 PCR を使用して、試料中の DNA または RNA のレベルを測定してもよい。一部の場合には、マイクロアレイを使用してポリヌクレオチドのプロファイル測定してもよい。例えば、ポリヌクレオチドのプロファイルは、ゲノムマイクロアレイを使用したゲノムスキャンによって測定してもよい。

【0129】

核酸分析方法は、配列決定ステップを含んでもよい。配列決定ステップを使用して、本明細書の他の方法によって分析されたポリヌクレオチドを識別および/または定量してもよい。配列決定はまた、マキサム・ギルバート配列決定、チェーンターミネーションシーケンシング、ショットガンシーケンシングまたはブリッジ PCR を含む基本的な配列決定法によって実施してもよい。配列決定は、ハイスループット配列決定、ピロシーケンシング、合成による配列決定、単一分子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーション配列決定 (sequencing-by-ligation)、ハイブリダイゼーション配列決定 (sequencing-by-hybridization)、RNA-Seq (Illumina)、デジタル遺伝子発現 (Helicos)、次世代配列決定、合成による単一分子配列決定 (SMS) (Helicos)、大規模並列配列決定、クローン単一分子アレイ (Solexa)、ショットガンシーケンシング、マキサム・ギルバートまたはサンガー配列決定、プライマーウォーキング、Illumina を使用した配列決定、PacBio、SOLID、Ion Torrent、454、またはナノポアプラットフォームを含む、大規模並行配列決定法によって実施してもよい。

10

20

【0130】

試料中のバイオマーカの群の発現は、プローブであって、バイオマーカの群の1つまたは複数のバイオマーカに結合するプローブのパネルを、試料と接触させることによって測定してもよい。一部の場合には、1つのプローブは、バイオマーカの群の複数のバイオマーカに結合し得る。一部の場合には、1つのプローブは、バイオマーカの群のうちの1つの特定のバイオマーカのみの特異的に結合し得る。一部の場合には、プローブのパネルは、バイオマーカの群の全てのバイオマーカに結合し得る。一部の場合には、プローブのパネルは、バイオマーカの群の全てではないが、一部のバイオマーカに結合し得る。一部の場合には、プローブのパネルは、バイオマーカに由来する分子に結合し得る。例えば、プローブは、バイオマーカの RNA (例えば、mRNA または miRNA) に由来する (例えば、逆転写された) DNA に結合し得る。

30

【0131】

バイオマーカの群の発現は、アッセイを使用して測定することができる。アッセイは、本明細書中に開示される任意の核酸分析方法またはポリペプチド分析方法であってもよい。一部の場合には、アッセイは、本明細書中に開示される任意の核酸法およびポリペプチド分析法の組合せであってもよい。アッセイは、PCR、イムノアッセイ、またはその組合せであってもよい。アッセイは、本明細書中に開示される核酸分析において使用される任意の種類 PCR であってもよい。例えば、PCR は、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応であってもよい。アッセイはイムノアッセイであってもよい。イムノアッセイの例としては、免疫沈降、粒子イムノアッセイ、免疫比濁法、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ (例えば、ELISA)、蛍光イムノアッセイ、化学発光イムノアッセイ、およびウェスタンブロット分析が挙げられる。

40

【0132】

ポリペプチドのプロファイルは、ポリペプチドの特徴および/または量を含んでもよい。一部の場合には、ポリペプチドのプロファイルは、ポリペプチドの発現レベルであってもよい。ポリペプチドの発現レベルは、ポリペプチドの濃度または絶対量であってもよい。一部の場合には、ポリペプチドのプロファイルは、ポリペプチドの翻訳後修飾のレベルであってもよい。ポリペプチドまたはタンパク質は、複数の異なる形態で存在してもよい。これらの形態は、翻訳前および翻訳後修飾のいずれかまたは両方から生じ得る。翻訳前

50

修飾形態としては、対立遺伝子バリエーション、スプライスバリエーションおよびRNA編集形態が挙げられる。翻訳後修飾形態としては、タンパク質分解的切断（例えば、シグナル配列または親タンパク質の断片の切断）、グリコシル化、リン酸化、脂質化、酸化、メチル化、システイン化、スルホン化およびアセチル化から生じる形態が挙げられる。ポリペプチドの翻訳後修飾としては、リン酸化、アセチル化、アミノ化、メチル化、グリコシル化、脂質化、またはポリペプチドの任意の他の化学修飾が挙げられる。

【0133】

一部の場合には、ポリペプチドのプロファイルは、ポリペプチドの発現パターンを含んでもよい。例えば、ポリペプチドの発現パターンは、そのポリペプチドの発現レベルであってもよい。別の例では、ポリペプチドの発現パターンは、ポリペプチド参照プロファイルと比較したそのポリペプチドの発現レベル差であってもよい。一部の場合には、発現パターンは、疾患状態におけるバイオマーカーの第1の群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現の増加/減少であってもよい。一部の場合には、発現パターンは、非疾患状態のバイオマーカーの第1の群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現の増加/減少であってもよい。一部の場合には、発現パターンは、疾患状態におけるバイオマーカーの第2の群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現の増加/減少であってもよい。一部の場合には、発現パターンは、非疾患状態におけるバイオマーカーの第2の群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現の増加/減少であってもよい。一部の場合には、発現パターンは、疾患および/または非疾患におけるCK-MBのレベル、ヘマトクリットパーセント、プロトロンビン時間、白血球数、リンパ球数、血小板数または好中球パーセントであってもよい。一部の場合には、発現パターンは、少なくとも1つのバイオマーカーが増加するか、および/または少なくとも1つのバイオマーカーが試料中で減少している場合があり得る。一部の場合には、少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、200、500、1000のバイオマーカーが試料で増加する。一部の場合には、試料中で少なくとも約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、75、100、200、500、1000が減少する。

【0134】

バイオマーカーの発現パターンは、統計的分析によって決定してもよい。一部の場合には、バイオマーカーの発現パターンは、統計的回帰によって測定してもよい。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、第1のバイオマーカー発現および第2のバイオマーカー発現の複数のスコアであってもよい。例えば、バイオマーカー1×バイオマーカー2の複数のスコア。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、第1のバイオマーカー発現および第2のバイオマーカー発現の複数のスコアであってもよく、ここで第1および第2のバイオマーカーは、同一または異なる治療群および/または疾患群にある。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、第1のバイオマーカー発現の第2のバイオマーカー発現に対する比であってもよい。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、第1のバイオマーカー発現の第2のバイオマーカー発現に対する比であってもよく、ここで第1および第2のバイオマーカーは同一または異なる治療群および/または疾患群にある。一部の態様では、第1のバイオマーカー発現の第2のバイオマーカー発現に対する比は、約0.01~約10000の範囲であってもよい。一部の態様では、第1のバイオマーカー発現の第2のバイオマーカー発現に対する比は、少なくとも約0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、500または少なくとも1000であってもよい。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、多変量統計分析によって決定してもよい。多変量統計解析は、主成分分析、判別分析、判別分析による主成分分析、部分最小二乗、判別分析による部分最小二乗、正則相関、カーネル主成分分析、非線形主成分分析、因子分析、多次元分析スケーリング、およびクラスター分析であってもよい。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、主要成分分析によって決定してもよい。別の例では、バイオマーカーの発現パターンは、機械学習および/またはパターン認識によって決定してもよい。

10

20

30

40

50

【0135】

ポリペプチドのプロファイルは、ポリペプチド分析方法によって測定してもよい。ポリペプチド分析方法は、質量分析法、マルチプレックスアッセイ、マイクロアレイ、酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）、またはその任意の組合せを含んでもよい。質量分析法（MS）を使用して、タンパク質の異なる形態を分析し得る。なぜなら、異なる形態は、典型的には、質量分析法によって解明することができる異なる質量を有するからである。したがって、ポリペプチドまたはタンパク質の1つの形態が、バイオマーカーの別の形態よりも疾患のためのより良いバイオマーカーである場合、質量分析法を使用して、有用な形態を特異的に検出および測定してもよい。MSとしては、飛行時間（TOF）MS（例えば、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化（MALDI）TOF MS）、表面増強レーザー脱離/イオン化（MELDI）MS、エレクトロスプレーイオン化MS、またはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴（FT-ICR）MSが挙げられる。マルチプレックスアッセイとしては、ファージディスプレイ、抗体プロファイリング、またはLuminesxプラットフォームを使用するアッセイが挙げられる。ポリペプチドのプロファイルを分析するためのマイクロアレイとしては、分析用マイクロアレイ、機能性タンパク質マイクロアレイ、または逆相タンパク質マイクロアレイが挙げられる。一部の 경우에는、ポリペプチドまたはタンパク質のプロファイルは、プロテオミクスマイクロアレイを使用したプロテオームスキャン（例えば、全プロテオームスキャン）によって測定してもよい。

10

【0136】

ある分析方法が、異なる形態のタンパク質バイオマーカーを区別する能力は、その相違の性質および測定に使用される方法に依存し得る。例えば、モノクローナル抗体を使用するイムノアッセイは、エピトープを含むタンパク質の全ての形態を検出することができ、それらの間を識別しない。しかしながら、タンパク質上の異なるエピトープに対する2つの抗体を使用するサンドイッチイムノアッセイは、両方のエピトープを含むタンパク質の全ての形態を検出し得、エピトープの1つのみを含む形態を検出しない。バイオマーカーのプロファイルを測定するための1つの方法論は、質量分析をイムノアッセイと組み合わせてもよい。第1に、生体特異的捕捉試薬（例えば、バイオマーカーおよびその他の形態を認識する抗体）を使用して、目的のバイオマーカーを捕捉してもよい。生体特異的捕捉試薬は、ビーズ、プレート、膜またはアレイのような固相に結合してもよい。未結合物質が洗い流された後、捕捉された分析物は、質量分析によって検出および/または測定してもよい。この方法はまた、タンパク質に結合しているか、そうでなければ抗体によって認識され、それ自体がバイオマーカーであり得るタンパク質結合パートナーの捕捉をもたらし得る。質量分析の様々な形態は、レーザー脱着アプローチ、例えば、伝統的なMALDIまたはSELDI、およびエレクトロスプレーイオン化を含む、タンパク質形態の検出に有用である。バイオマーカーに特異的な固定化された抗体の使用も企図される。この抗体は、様々な固体支持体、例えば、磁性またはクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイ部位の表面（マイクロタイターウェルなど）、固体基材材料または膜（例えば、プラスチック、ナイロン、紙）などのピースなどの上に固定してもよい。アッセイストリップは、固体支持体上に抗体または複数の抗体をアレイでコーティングすることによって調製してもよい。次いで、このストリップを試験試料に浸漬し、次いで洗浄および検出ステップを介して迅速に処理して、有色スポットなどの測定可能なシグナルを生成してもよい。

20

30

40

【0137】

バイオマーカーの存在またはレベルは、任意の適切なイムノアッセイ、例えば酵素結合イムノアッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、競合結合アッセイなどを使用して測定してもよい。バイオマーカーへの抗体の特異的な免疫学的結合は、直接的または間接的に検出し得る。直接標識としては、抗体に結合した蛍光タグまたは発光タグ、金属、色素、放射性核種などが挙げられる。間接的標識としては、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼなどの当該分野で周知の種々の酵素が挙げられる。

50

【0138】

複数のバイオマーカーの分析は、1つの試験試料とは別個に実施してもよく、または同時に実施してもよい。バイオマーカーの分離アッセイまたは連続アッセイのために、適切な装置としては、臨床実験分析装置、例えば、ELECTSYS（登録商標）（Roche）、AXSYM（登録商標）（Abbott）、ACCESS（登録商標）（Beckman）、ADVIA（登録商標）CENTAUR（登録商標）（Bayer）イムノアッセイシステム、NICHOLS ADVANTAGE（登録商標）（Nichols Institute）イムノアッセイシステムなどが挙げられる。装置またはタンパク質チップは、単一表面上で複数のバイオマーカーの同時アッセイを実施することができる。有用な物理フォーマットは、複数の異なる分析物の検出のための複数の個別のアドレス指定可能な位置を有する表面を含む。そのようなフォーマットとしては、タンパク質マイクロアレイまたは「タンパク質チップ」（例えば、NgおよびHag、J.CellMol. 6巻：329～340頁（2002年）を参照のこと）および特定のキャピラリーデバイス（例えば、米国特許第6,019,944号を参照のこと）が挙げられる。これらの実施形態では、各別個の表面位置は、各位置での検出のために1つまたは複数の分析物（例えば、バイオマーカー）を固定するための抗体を含み得る。表面は、代わりに、表面の別個の位置に固定された1つまたは複数の別個の粒子（例えば、微粒子またはナノ粒子）を含んでもよく、ここで微小粒子は、検出のための1つの分析物（例えばバイオマーカー）を固定する抗体を含む。タンパク質バイオチップとしてはさらに、例えば、Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, Calif.), Packard Bioscience Company (Meriden Conn.), Zyomyx (Hayward, Calif.), Phyllos (Lexington, Mass.) および Biacore (Uppsala, Sweden) によって生成されたタンパク質バイオチップが挙げられる。このようなタンパク質バイオチップの例は、その各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、以下の特許または公開特許出願に記載されている：米国特許第6,225,047号；PCT国際公開番号WO99/51773；米国特許第6,329,209号、国際公開番号WO00/56934号、および米国特許第5,242,828号。

【0139】

虚血性脳卒中のバイオマーカーを識別するステップは、虚血性脳卒中試料からのポリヌクレオチドのプロファイル进行分析するステップを含み得る。ポリヌクレオチドのプロファイル进行分析するステップは、ポリヌクレオチドのプロファイルをポリヌクレオチド参照プロファイルと比較するステップを含み得る。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドのプロファイルを参照プロファイルと比較するステップは、虚血性脳卒中試料中のポリヌクレオチドと参照プロファイル中のポリヌクレオチドの間の発現レベル差を決定するステップを含み得る。虚血性脳卒中の試料中のポリヌクレオチドの発現レベルが、参照プロファイルのポリヌクレオチドの発現レベルと比較してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされているとき、ポリヌクレオチドは、バイオマーカーとして識別され得る。バイオマーカーは、虚血性脳卒中と関連し得る。一部の 경우에는、虚血性脳卒中のバイオマーカーとしてバイオマーカーを識別するために、さらなる解析を実施してもよい。ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較したとき、そのポリヌクレオチドにおける、少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍の発現レベル差が、虚血性脳卒中試料において検出されるとき、バイオマーカーとして識別することができる。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較したとき、そのポリヌクレオチドにおける、発現レベル差が、虚血性脳卒中試料において少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍増加するとき、バイオマーカーとして識別することができる。一部の 경우에는、ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較したとき、そのポリヌクレオチドにおける発現レベル差が、

10

20

30

40

50

虚血性脳卒中試料において少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍減少するとき、バイオマーカーとして識別することができる。

【0140】

虚血性脳卒中のバイオマーカーを識別するステップは、虚血性脳卒中試料からのポリペプチドのプロファイル进行分析するステップを含み得る。ポリペプチドのプロファイル进行分析するステップは、ポリペプチドのプロファイルをポリペプチド参照プロファイルと比較するステップを含み得る。一部の場合には、ポリペプチドのプロファイルを参照プロファイルと比較するステップは、虚血性脳卒中試料中のポリペプチドと、参照プロファイル中のポリペプチドの間の発現レベル差を決定することを含み得る。虚血性脳卒中の試料中のポリペプチドの発現レベルが、参照プロファイルのポリペプチドの発現レベルと比較してアップレギュレートまたはダウンレギュレートされているとき、ポリペプチドはバイオマーカーであり得る。そのようなバイオマーカーは、虚血性脳卒中と関連し得る。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーとしてバイオマーカーを識別するために、さらなる解析を実施してもよい。ポリペプチドは、ポリペプチド参照プロファイルと比較したとき、少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍のポリヌクレオチドにおける発現レベル差が、虚血性脳卒中試料において検出されるとき、ポリペプチドはバイオマーカーとして識別され得る。一部の場合には、ポリペプチドは、ポリペプチド参照プロファイルと比較したとき、ポリペプチド中の発現レベル差が、虚血性脳卒中試料において少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍増加するとき、バイオマーカーとして識別され得る。一部の場合には、ポリペプチドは、ポリペプチド参照プロファイルと比較したとき、ポリペプチド中の発現レベル差が、虚血性脳卒中試料において少なくとも0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍減少するとき、バイオマーカーとして識別され得る。

10

20

【0141】

一部の態様では、バイオマーカーのプロファイル进行分析するステップは、多変量統計分析を使用するステップを含み得る。

30

【0142】

虚血性脳卒中のバイオマーカーを識別するための方法は、以下のうちの1つまたは複数を含み得る：a) 虚血性卒中試料の遺伝子の群の発現および非虚血性脳卒中試料の遺伝子の群の発現を測定するステップであって、イムノアッセイ、ポリメラーゼ連鎖反応、またはその組合せにより実施されるステップ；b) 虚血性卒中試料の遺伝子の群の発現および非虚血性脳卒中試料の遺伝子の群の発現を解析するステップであって、それによって虚血性脳卒中について断定的な遺伝子の複数のサブグループを特定する、ステップ；ならびにc) 基準値を超える回数についてb)で識別されるサブグループ中に遺伝子が含まれる場合、その遺伝子の群の遺伝子をバイオマーカーとして指定するステップ。

40

【0143】

虚血性脳卒中のバイオマーカーは、機械学習および/またはパターン認識などの方法を使用して識別し得る。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、予測モデルに基づいて識別され得る。モデルとして有用であるか、または予測モデルを設計する上で有用な確立された統計アルゴリズムおよび方法としては、限定するものではないが、以下が挙げられる：分散分析(ANOVA)；ベイジアンネットワーク；ブースティングおよびAdaブースティング；ブートストラップ・アグリゲーティング(bootstrap aggregating)(またはバギング)アルゴリズム；決定木による分類手法、例えば分類および回帰木(CART)、ブーステッド(boosted)CART、ランダムフォレスト(RF)、再帰分割木(RPART)、およびその他；カード・アンド・ホエー(Curds and Whey: CW)；カード・アンド・ホエー-Lasso；

50

次元縮小法、例えば主成分分析 (PCA) および因子回転または因子分析；線形判別分析 (LDA)、Eigengene 線形判別分析 (ELDA)、および二次判別分析を含む、判別分析；判別関数分析 (DFA)；因子回転または因子分析；遺伝的アルゴリズム；隠れマルコフモデル；カーネル (kernel) ベースのマシナルゴリズム、例えばカーネル密度推定、カーネル部分最小二乗アルゴリズム、カーネルマッチング追跡アルゴリズム、カーネルフィッシャー判別分析アルゴリズム、およびカーネル主成分分析アルゴリズム；前進線形ステップワイズ回帰、Lasso (または LASSO) 縮小選択法、および Elastic Net 正則化および選択法を含むまたは利用する、線形回帰および一般化線形モデル；glmnet (Lasso および Elastic Net 正則化一般化線形モデル)；ロジスティック回帰 (LogReg)；メタ学習アルゴリズム；分類または回帰のための近傍法、例えば K 近傍法 (KNN)；非線形回帰または分類アルゴリズム；ニューラルネットワーク；部分最小二乗法；ルールベース分類；シュランケンセンテロイド (shrunken centroid) (SC)；層別化逆回帰法；製品モデルデータ交換規格、アプリケーション翻案構成体 (StepAIC)；スーパー主成分 (SPC) 回帰；ならびにサポートベクターマシン (SVM) および再帰的サポートベクターマシン (RSVM) など。さらに、クラスタリングアルゴリズムは、対象サブグループを決定するのに使用され得る。一部の 경우에는、分類方法を使用して虚血性脳卒中のバイオマーカーを識別してもよい。このような分類方法としては、サポートベクターマシン (support vector machine: SVM)、k - 最近傍 (kNN)、および分類ツリー (Hastieら (2001年) The Elements of Statistical Learning, Springer, N.Y.) が挙げられる。分類精度を評価するために、10倍交差検定を使用してもよい。

【0144】

一部の 경우에는、虚血性脳卒中のバイオマーカーは、遺伝的アルゴリズム - K 近傍法 (GA - kNN)、試料のクラス間を最適に区別できる予測変数のセットを識別するために設計されたパターン認識アプローチを使用して識別することができる。GA - kNN法を使用した高次元ゲノムデータセットの解析は、癌生物学および毒物学などの分野で、強力な予測能力を持つ診断上関連するバイオマーカーパネルを識別するのに首尾よく使用されている。

【0145】

GA / kNNアプローチは、強力な検索ヒューリスティック、GA とノンパラメトリック分類法、kNN とを組み合わせ得る。GA / kNN 分析では、遺伝子の小さな組合せ (染色体と呼ばれる) は、遺伝子発現データの全プールから無作為選択により、生成し得る (図 22、ステップ A)。次いで、この無作為に生成された染色体が試料クラスを予測する能力は、kNN を使用して評価され得る。この kNN 評価では、各試料を n 次元空間にベクトルとしてプロットしてもよく、各ベクトルの座標は染色体の遺伝子の発現レベルで構成されている。次いで、各試料のクラスは、最近傍に参照され得る、ユークリッド距離に最も近い他の試料のほとんどのクラスに基づいて予測可能である (図 22、ステップ B)。染色体の予測能力は、適性スコアとして、または染色体が正しく予測することができる試料の割合として定量され得る。終止カットオフ (正しい断定の最小割合) は、評価に合格するのに必要な適性のレベルを決定し得る。kNN 評価を合格する染色体は、近最適解として識別してもよく、記録してもよいが、評価に失敗した染色体は突然変異を受けてもよく、再評価されてもよい。この突然変異および再評価のプロセスは、染色体の適性スコアが終止カットオフを超えるまで繰り返してもよい (図 22、ステップ A)。このプロセスは、異種の近最適解のプールを生成するために複数回 (通常は数千回) 繰り返してもよい (図 22、ステップ C)。遺伝子発現の全プールにおける各遺伝子の断定的能力は、それが近最適解の一部である回数に従ってランク付けしてもよい (図 22 のステップ D)。次いで、最上位の遺伝子の集合的な予測能力を、一個抜き交差検証で試験してもよい (図 22、ステップ E)。

【0146】

本明細書中で使用される場合、「参照」および「参照プロファイル」という用語は、参

照対象における生体分子のプロファイル（例えば、発現）を指して交換可能に使用され得る。一部の場合には、参照は、参照対象におけるバイオマーカーの群の発現であってもよい。参照または参照プロファイルは、参照対象におけるポリヌクレオチドのプロファイルであってもよく、またはポリペプチドのプロファイルであってもよい。一部の場合には、参照対象は、脳卒中対象であってもよい。一部の場合には、参照対象は、非脳卒中対象であってもよい。一部の場合には、参照対象は、非虚血性脳卒中対象であってもよい。一部の場合には、非虚血性脳卒中は、虚血性脳卒中を有さないが、一過性虚血発作、非虚血性脳卒中、または疑似脳卒中を有する対象であってもよい。非虚血性脳卒中を有する対象は、出血性脳卒中を有する場合がある。参照対象における生体分子のプロファイルに対して、虚血性脳卒中対象におけるポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドのプロファイルと比較するとき、以下の対象群を使用してもよい：（１）虚血性脳卒中；（２）出血性脳卒中；（３）正常；（４）TIA；（５）他の疑似脳卒中。全ての対象の生体分子のプロファイルを測定する。次に、これらの５つの群のいずれか１つのメンバーを、これらの群の任意の他のメンバーのプロファイルと比較して、測定されたプロファイルに基づいてこれらの群を最も区別する関数および重み係数を定義してもよい。これは、５つの群全てが対で比較されるように繰り返してもよい。参照プロファイルは、コンピュータ可読形式で保存してもよい。一部の態様では、参照プロファイルをデータベースまたはサーバーに記憶してもよい。一部の場合には、コンピュータネットワーク（例えば、インターネット）を介してアクセス可能なデータベースに参照を記憶してもよい。一部の場合には、参照を記憶し、クラウドストレージテクノロジーでアクセス可能にしてもよい。

10

20

【0147】

上に開示されたバイオマーカーは、さらなる分析により、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別することができる。一部の場合には、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートされるポリヌクレオチドバイオマーカーは、そのポリヌクレオチドバイオマーカーによってコードされるタンパク質またはポリペプチドもまた、タンパク質またはポリペプチドの参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中においてアップレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。例えば、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートされるポリヌクレオチドバイオマーカーは、ポリヌクレオチドバイオマーカーによってコードされるタンパク質またはポリペプチドがまた、タンパク質またはポリペプチドの参照プロファイルと比較して、虚血性脳卒中試料において、少なくとも約0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍アップレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして特定され得る。一部の場合には、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされるポリヌクレオチドバイオマーカーは、ポリヌクレオチドバイオマーカーによってコードされるタンパク質またはポリペプチドがまた、タンパク質参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。例えば、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされるポリヌクレオチドバイオマーカーは、そのポリヌクレオチドバイオマーカーによってコードされるタンパク質またはポリペプチドがまた、タンパク質またはポリペプチド参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料中で、少なくとも約0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍ダウンレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。一部の場合には、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートされるポリペプチドは、ポリペプチドバイオマーカーをコードするポリヌクレオチドがまた、タンパク質参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料において、アップレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。例えば、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてアップレギュレートされるポリペプチドバイオマーカーは、そのポリヌクレオチドバイオマーカーをコードする

30

40

50

ポリヌクレオチドがまた、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較して、虚血性脳卒中試料において、少なくとも約0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍アップレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。一部の 경우에는、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされるポリペプチドバイオマーカーは、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドバイオマーカーがまた、タンパク質参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。例えば、参照プロファイルと比較して虚血性脳卒中試料においてダウンレギュレートされるポリペプチドバイオマーカーは、そのポリヌクレオチドバイオマーカーをコードする

10

ポリヌクレオチドがまた、ポリヌクレオチド参照プロファイルと比較して、虚血性脳卒中試料において、少なくとも約0.5、1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、または少なくとも100倍ダウンレギュレートされている場合、虚血性脳卒中のバイオマーカーとして識別され得る。

【0148】

本明細書の方法は、所与のバイオマーカー（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）またはバイオマーカーの所与の群（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカー）の有効性を決定するステップをさらに含み得る。測定されるパラメーターとしては、その全体が本明細書に組み込まれる、Fischerら、Intensive Care Med. 29巻：1043～51頁、2003年に記載されているパラメーターが挙げられる。これらのパラメーターとしては、感度および特異性、予測値、尤度比、診断オッズ比、ならびに受信者動作特性（ROC）曲線面積が挙げられる。有効なバイオマーカーの1つまたは一群は、これらの様々なパラメーターについて、以下の結果の1つまたは複数を示し得る：少なくとも75%の特異性と組み合わせた、少なくとも75%の感度；少なくとも0.7、少なくとも0.8、少なくとも0.9、もしくは少なくとも0.95のROC曲線面積；ならびに/または少なくとも5、少なくとも10、または少なくとも20の正の尤度比（感度 / (1 - 特異性)として計算される）、および0.3未満もしくはそれに等しい、0.2未満もしくはそれに等しい、または0.1未満もしくはそれに等しい、負の尤度比（(1 - 感度) / 特異性として計算される）。ROC面積を計算して、その全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願公開第2013/0189243号に記載されているように、バイオマーカーの有効性を決定するのに使用してもよい。

20

30

【0149】

本明細書で提供される方法、デバイスおよびキットは、高い特異性および感度で、対象における状態（例えば、虚血性脳卒中または虚血性脳卒中のリスク）を評価し得る。本明細書で使用される場合、「特異性」という用語は、そのように正しく識別された陰性の割合（例えば、その状態を有さないと正しく識別された健常者のパーセンテージ）の尺度を指し得る。本明細書で使用される場合、「感度」という用語は、そのように正確に識別される陽性の割合の尺度（例えば、症状を有すると正確に識別された病気の人のパーセンテージ）を指し得る。本明細書で提供される方法、デバイスおよびキットは、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の特異性で、対象における状態（例えば、虚血性脳卒中）を評価し得る。本明細書で提供される方法、デバイスおよびキットは、少なくとも約75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の感度で、対象における状態（例えば、虚血性脳卒中）を評価し得る。本明細書で提供される方法、デバイスおよびキットは、少なくとも約70%の特異性および少なくとも約70%の感度、少なくとも約75%の特異性および少なくとも約75%の感度、少なくとも約80%の特異性および少なくとも約80%の感度、少なくとも約85%の特異性および少なくとも約85%の感度、少なくとも約90%の特異性および少なくとも約90%の感度、少なくとも約95%の特異性および少なくとも約95%の感度、少なくとも約96%の特異性および少なくとも約96%の感度、少なくとも約97%の特異性および少なくとも約97%の感度、少

40

50

なくとも約 98% の特異性および少なくとも約 98% の感度、少なくとも約 99% の特異性および少なくとも約 99% の感度、または約 100% の特異性、約 100% の感度で、被験体の状態（例えば、虚血性脳卒中）を評価し得る。

【0150】

本明細書中の対象における状態を評価する方法は、様々な数のバイオマーカーの発現に基づいて高い特異性および感度を達成し得る。一部の場合には、対象における状態を評価する方法は、2、3、4、5、6、7、8、9 または 10 個以下のバイオマーカーの発現に基づいて、少なくとも約 70% の特異性および少なくとも約 70% の感度、少なくとも約 75% の特異性および少なくとも約 75% の感度、少なくとも約 80% の特異性および少なくとも約 80% の感度、少なくとも約 85% の特異性および少なくとも約 85% の感度、少なくとも約 90% の特異性および少なくとも約 90% の感度、少なくとも約 95% の特異性および少なくとも約 95% の感度、少なくとも約 96% の特異性および少なくとも約 96% の感度、少なくとも約 97% の特異性および少なくとも約 97% の感度、少なくとも約 98% の特異性および少なくとも約 98% の感度、少なくとも約 99% の特異性および少なくとも約 99% の感度、または 100% の特異性 100% の感度を達成し得る。一部の場合には、対象における状態を評価する方法、デバイスおよびキットは、2 つのバイオマーカーの発現に基づいて、少なくとも約 92% の特異性および少なくとも約 92% の感度、少なくとも約 95% の特異性および少なくとも約 95% の感度、少なくとも約 96% の特異性および少なくとも約 96% の感度、少なくとも約 97% の特異性および少なくとも約 97% の感度、少なくとも約 98% の特異性および少なくとも約 98% の感度、少なくとも約 99% の特異性および少なくとも約 99% の感度、または約 100% の特異性および約 100% の感度を達成し得る。一部の場合には、対象における状態を評価する方法は、ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、MAL、GRAP、ID3、CTS2、KIF1B、および PLXDC2 のうちの 2 つまたはそれよりも多くの発現を測定するステップを含み得、本方法は、少なくとも 90% の特異性および少なくとも 90% の感度、少なくとも 92% の特異性および少なくとも 92% の感度、少なくとも 95% の特異性および少なくとも 95% の感度、少なくとも 96% の特異性および少なくとも 96% の感度、少なくとも 97% の特異性および少なくとも 97% の感度、少なくとも 98% の特異性および少なくとも 98% の感度、少なくとも 99% の特異性および少なくとも 99% の感度、または 100% の特異性および 100% の感度を達成し得る。一部の場合には、対象における状態を評価する方法は、ANTXR2、STK3、PDK4、CD163 のうちの 2 つまたはそれよりも多く（例えば、4 つ）の発現を測定するステップを含み得、本方法は、少なくとも 98% の特異性および少なくとも 98% の感度を達成し得る。

【0151】

虚血性脳卒中を評価するステップは、虚血性脳卒中を有する対象を、健康対象または疑似脳卒中を有する対象と識別するステップを含み得る。本明細書における方法、デバイスおよびキットは、虚血性卒中を有する対象を健康対象から識別し、虚血性脳卒中を有する対象を、疑似脳卒中を有する対象から識別する際に高い特異性および感度を達成し得る。例えば、本明細書の方法、デバイスおよびキットは、虚血性脳卒中の対象を健常者から識別する際に、少なくとも 92% の特異性および少なくとも 92% の感度、少なくとも 95% の特異性および少なくとも 95% の感度、少なくとも 96% の特異性および少なくとも 96% の感度、少なくとも 97% の特異性および少なくとも 97% の感度、少なくとも 98% の特異性および少なくとも 98% の感度、少なくとも 99% の特異性および少なくとも 99% の感度、または 100% の特異性および 100% の感度を達成し得、その一方で、虚血性脳卒中を有する対象を、疑似脳卒中を有する対象から識別する際に、少なくとも 92% の特異性および少なくとも 92% の感度、少なくとも 95% の特異性および少なくとも 95% の感度、少なくとも 96% の特異性および少なくとも 96% の感度、少なくとも 97% の特異性および少なくとも 97% の感度、少なくとも 98% の特異性および少なくとも 98% の感度、少なくとも 99% の特異性および少なくとも 99% の感度、または

100%の特異性および100%の感度を達成し得る。

【0152】

一部の場合には、無細胞核酸のレベルを測定するステップを含む虚血性脳卒中を評価する方法（例えば、健常状態または疑似脳卒中から虚血性脳卒中を識別する）も、本明細書に開示される特異性および感度を達成し得る。例えば、このような方法は、少なくとも80%の感度および少なくとも75%の特異性、少なくとも85%の感度および少なくとも80%の特異性、少なくとも90%の感度および少なくとも85%の特異性、少なくとも95%の感度および少なくとも80%の特異性、100%の感度および少なくとも85%の特異性、100%の感度および少なくとも90%の特異性、100%の感度および少なくとも95%の特異性、100%の感度および100%の特異性を達成し得る。一部の場合には、特異性は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%であってもよい。一部の場合には、感度は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%であってもよい。

10

【0153】

対象の虚血性脳卒中を検出する方法も本明細書において提供される。本方法は、虚血性脳卒中の有無を検出するために使用してもよい。一部の場合には、対象が脳卒中を有するリスクを検出するためにも、本方法を使用してもよい。

【0154】

虚血性脳卒中を検出する方法は、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群および虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群のプロファイルを測定するステップであって、ここでこの虚血性脳卒中のバイオマーカの第1および第2の群が、生体分子の異なるクラスであるステップを含み得る。一部の場合には、バイオマーカの第1の群はポリヌクレオチドであってもよく、バイオマーカの第2の群はポリペプチドであってもよい。本方法は、バイオマーカの第1および第2の群のプロファイルを分析するステップ、ならびに対象における虚血性脳卒中を検出するステップをさらに含み得る。一部の場合には、分析はコンピュータシステムによって実施してもよい。

20

【0155】

虚血性卒中を検出するために使用される虚血性脳卒中のバイオマーカは、本明細書で提供されるか、または当該分野で公知の方法によって識別される虚血性脳卒中の任意のバイオマーカであってもよい。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカ（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群）としては、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IG またはその活性断片のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカ（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群）としては、CCL19、CCL21、ガレクチン3、RAGE、ENA78、GMCSF、CD30、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ORM1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、s100A12、Nav3、SAA、IG、IG、IG、IG、またはその活性断片のうち少なくとも1つが挙げられる。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカとしては、1つまたは複数のサイトカインが挙げられる。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカ（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカの第1の群）としては、BAFF、MMP9、APP、アグリカン、ガレクチン3、Fas、RAGE、エフリンA2、CD30、TNR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1、IFN、RANTES、IL1、IL4、IL17、IL2、GMCSF、ENA78、IL5、IL12P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBA、IL31、MCP2、IGG3、IGG4、テネウリン1のアイソフォーム2、およびディスインテグリンのアイソフォーム2またはその活性断片のうち少なくとも1つをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。一部の場合には、虚血性脳卒中のバイオマーカ（例えば、虚血性脳卒中のバイオマーカの第2の群）としては、BAFF、MM

30

40

50

P9、APP、アグリカン、ガレクチン3、Fas、RAGE、エフリンA2、CD30、TNR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1、IFN、RANTES、IL1、IL4、IL17、IL2、GMCSF、ENA78、IL5、IL12P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBCA、IL31、MCP2、TLR2、TLR4、JAK2、CCR7、AKAP7、IL10、SYK、IL8、MyD88、CD3、CD4、IL22R、IL22、CEBPBまたはその活性断片のうち少なくとも1つが挙げられる。一部の場合には、本明細書で提供される虚血性脳卒中のバイオマーカーとしては、表1、図10A~図10Hの少なくとも1つのバイオマーカーまたはそのいずれかの活性型が挙げられる。一部の場合には、本明細書で提供される虚血性脳卒中のバイオマーカーとしては、表1、図10A~図10Hの少なくとも1つのバイオマーカーまたはそのいずれかの活性型をコードするポリヌクレオチドが挙げられる。

10

【0156】

虚血性脳卒中のバイオマーカーのプロファイルは、本明細書に開示される虚血性脳卒中の少なくとも1つのバイオマーカーのプロファイルを含んでもよい。一部の場合には、本方法は、虚血性脳卒中の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000のバイオマーカーのプロファイルを測定するステップであって、虚血性脳卒中のバイオマーカーがポリヌクレオチドであるステップ、および/または虚血性脳卒中の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、もしくは1000のバイオマーカーのプロファイルを測定するステップであって、虚血性脳卒中のバイオマーカーがポリペプチドであるステップを含み得る。一部の場合には、本方法は、同じ数の虚血性脳卒中のポリヌクレオチドバイオマーカーおよび虚血性脳卒中のポリペプチドバイオマーカーのプロファイルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、本方法は、異なる数の虚血性脳卒中のポリヌクレオチドバイオマーカーおよび虚血性脳卒中のポリペプチドバイオマーカーのプロファイルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、虚血性脳卒中を検出する方法は、LY96、ARG1、およびCA4のうちの一つもしくは複数をコードするポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ、ならびに/またはLY96、ARG1、およびCA4のうちの一つもしくは複数のプロファイルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、虚血性脳卒中を検出する方法は、CCR7、CSPG2、IQGAP1、およびORM1のうちの一つもしくは複数をコードするポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ、ならびに/またはCCR7、CSPG2、IQGAP1、およびORM1のうちの一つもしくは複数のプロファイルを測定するステップを含み得る。一部の場合には、虚血性脳卒中を検出する方法は、CCR7、CSPG2、IQGAP1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、およびs100A12およびORM1のうちの一つもしくは複数をコードするポリヌクレオチドのプロファイルを測定するステップ、ならびに/またはCCR7、CSPG2、IQGAP1、ARG1、LY96、MMP9、CA4、およびs100A12およびORM1のうちの一つもしくは複数のプロファイル

20

30

40

【0157】

虚血性脳卒中を検出する方法は、本明細書に開示される虚血性脳卒中のバイオマーカーの第1および第2の群のプロファイル进行分析するステップをさらに含み得る。分析するステップは、虚血性卒中のバイオマーカーの第1および第2の群のプロファイル、それらの参照プロファイルと比較するステップを含み得る。一部の場合には、分析ステップは、

50

参照プロファイルと比較して、対象の試料における虚血性脳卒中のバイオマーカの発現レベル差を決定することを含み得る。参照プロファイルと比較した試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカの発現レベル差が、基準値の範囲外になる場合、虚血性脳卒中が、対象において検出され得る。例えば、参照プロファイルは、1つまたは複数の非虚血性脳卒中対象から得てもよい。一部の場合には、分析ステップは、対象における虚血性脳卒中のバイオマーカのプロファイルを、基準値の範囲と比較するステップを含んでもよく、バイオマーカのプロファイルが基準値の範囲内にある場合、虚血性脳卒中が検出され得る。例えば、基準値の範囲は、虚血性脳卒中対象における虚血性脳卒中のバイオマーカのプロファイルとして予め決定してもよい。一部の場合には、虚血性脳卒中を検出する方法は、バイオマーカの第1および第2の群の発現パターンをそれらの参照プロファイルと比較するステップ、ならびに虚血性脳卒中を検出するステップを含み得る。

10

【0158】

本明細書における方法は、虚血性卒中のバイオマーカの2つ以上の群のプロファイル进行分析するステップによって虚血性脳卒中を検出し得る。一部の場合には、本方法は、虚血性脳卒中のバイオマーカの2つの群のプロファイル进行分析するステップを含み得る。バイオマーカの1つの群は、生体分子のクラスを含んでもよく、第2の群は、生体分子の異なるクラスを含んでもよい。例えば、虚血性脳卒中のポリヌクレオチドバイオマーカのプロファイルおよび虚血性脳卒中のポリペプチドバイオマーカのプロファイル进行分析することによって、対象において虚血性脳卒中を検出してよい。虚血性脳卒中のバイオマーカの両方の群のプロファイルの分析の転帰によって、対象が虚血性脳卒中を有することが示唆されるとき、対象において虚血性脳卒中が検出され得る。

20

【0159】

対象における虚血性脳卒中を評価する方法は、バイオマーカの群の発現を参照と比較するステップを含み得る。虚血性脳卒中は、バイオマーカの群における1つまたは複数のバイオマーカの発現と参照の間の相違によって示され得る。一部の場合には、虚血性脳卒中は、バイオマーカの群における1つまたは複数のバイオマーカの発現の増加、例えば、参照と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100または1000倍の増加によって示され得る。一部の場合には、虚血性脳卒中は、バイオマーカの群における1つまたは複数のバイオマーカの発現の減少、例えば、参照と比較して、少なくとも0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100または1000倍の減少によって示され得る。一部の場合には、虚血性脳卒中は、ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、CTS Z、KIF1B、およびPLXDC2のうちの1つまたは複数の発現の増加によって示され得る。一部の場合には、虚血性脳卒中は、MAL、GRAP、およびID3のうちの1つまたは複数の発現の減少によって示され得る。

30

【0160】

一部の場合には、虚血性脳卒中は、バイオマーカの群の第1のサブグループの発現の増加およびバイオマーカの群の第2のサブグループの発現の減少によって示され得る。バイオマーカの第1のサブグループは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、または100個のバイオマーカを含み得、バイオマーカの第2のサブグループは、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、50、または100個のバイオマーカを含み得る。一部の場合には、バイオマーカの第1のサブグループは、4つのバイオマーカを含み得、バイオマーカの第2のサブグループは3つのバイオマーカを包み得る。ある特定の場合には、バイオマーカの第1のサブグループは、7つのバイオマーカを含み得、バイオマーカの第2のサブグループは3つのバイオマーカを含み得る。一部の場合には、ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、CTS Z、KIF1B、およびPLXDC2のうちの1つまたは複数の発現の増加、ならびにMAL、GRAP、およびID3のうちの1つまたは複数の発現の減少によって

40

50

虚血性脳卒中が示され得る。一部の 경우에는、ANTXR2、STK3、PDK4、およびCD163の発現の増加、ならびにMAL、GRAP、およびID3の発現の減少によって虚血性脳卒中が示され得る。場合によっては、ANTXR2、STK3、PDK4、CD163、CTS Z、KIF1B、およびPLXDC2の発現の増加、ならびにMAL、GRAP、およびID3の発現の減少によって虚血性脳卒中が示され得る。

【0161】

バイオマーカーの異なる群の発現は、異なる対象群において（例えば、より良好な特異性および感受性を達成するために）虚血性脳卒中を評価するために測定され得る。一部の 경우에는、異なる年齢、性別、または民族、地理的領域、または体重の対象を評価するために、バイオマーカーの異なる群の発現を測定してもよい。一部の 경우에는、脳卒中の異なるリスク因子を有する対象を評価するために、バイオマーカーの異なる群の発現を測定してもよい。例えば、90%より大きい特異性および90%より大きい感度を達成するために、バイオマーカー#1、#2、#3および#4の発現は、地理的領域Aからの対象の虚血性脳卒中を評価するために測定してもよく、バイオマーカー#1、#2、#5、および#6の発現は、地理的領域Bからの対象の虚血性脳卒中を評価するために測定してもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの異なる群の全てではないが一部のバイオマーカーが同じであってもよい。一部の 경우에는、バイオマーカーの異なる群のバイオマーカーで同じものはない。

10

【0162】

本明細書の対象で虚血性脳卒中を検出する方法はまた、対象で血液のプロファイルを測定するステップを含み得る。血液のプロファイルは、血球のプロファイルであってもよい。血液細胞のプロファイルは、全白血球数、白血球差（例えば、リンパ球および好中球数）、および好中球/リンパ球比を含み得る。一部の 경우에는、本方法は、対象の血液中の白血球差を測定するステップを含み得る。白血球差とは、血液中の異なる種類の白血球の割合を指す場合がある。一部の 경우에는、白血球差は、白血球の1つまたは複数の種類のパーセンテージまたは絶対数を指す場合がある。例えば、白血球差としては、以下のうちの1つまたは複数を挙げることができる：絶対好中球数または好中球の%、絶対リンパ球数またはリンパ球の%、絶対単球数または単球の%、絶対好酸球数または好酸球の%、および絶対好塩基球数または好塩基球の%。別の例では、白血球差は、リンパ球および好中球のパーセンテージまたは絶対数であってもよい。血球のプロファイルは、血小板数を含み得る。

20

30

【0163】

血液細胞のプロファイルは、白血球以外の血液細胞の割合または数も含み得る。一部の 경우에는、血球のプロファイルは、赤血球、血小板、またはその組合せの数またはパーセンテージを含み得る。血液細胞のプロファイルは、ヘモグロビンレベル、トロポニンレベル、クレアチンキナーゼレベル、プロトロンビン時間、部分トロンボプラスチン時間（例えば、活性化部分トロンボプラスチン時間）、またはその任意の組合せを含む、当該分野で公知の他の試験によって測定してもよい。血液のプロファイルとしてはまた、ヘマトクリット（例えば、パックされた細胞容積）、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球ヘモグロビン濃度、赤血球分布幅、またはその任意の組合せが挙げられる。血液細胞のプロファイルは、対象の虚血性脳卒中を検出するために、本明細書に開示される虚血性脳卒中のバイオマーカーの任意のプロファイルと一緒に使用してもよい。一部の 경우에는、虚血性脳卒中のバイオマーカーの群のプロファイルおよび血球のプロファイルの両方の分析結果によって、対象が虚血性脳卒中を有することが示唆される場合、対象は虚血性脳卒中を有するとみなされ得る。

40

【0164】

一部の態様では、検出するステップは、試料中のクレアチンキナーゼの量を測定するステップを含み得る。一部の態様では、CKMBが測定される。

【0165】

虚血性脳卒中を検出するステップは、対象が虚血性脳卒中に罹患しているか、または虚

50

血性脳卒中を発症するリスクがある程度あるか否かを推定および/または決定し得る方法を使用して実施してもよい。当業者（例えば、脳卒中の臨床家または救急室医師）は、1つまたは複数の診断指標、例えば、その存在、不在、または量が、状態、例えば、虚血性脳卒中の存在、重症度または不在を示すバイオマーカー、リスクに基づいて疾患を検出し得る。

【0166】

対象における虚血性脳卒中を検出する方法は、その対象における虚血性脳卒中発症の時間を検出するステップをさらに含み得る。複数の試料の効率的な処理のために、複数のバイオマーカーおよび/または血液プロファイルを1つの試験に組み合わせてもよい。さらに、当業者は、同じ個体からの複数の試料（例えば、連続する時点で）を試験する価値を認識するであろう。同じ対象からの複数の試料の試験は、経時的なバイオマーカーレベルの変化の識別を可能にし得る。バイオマーカーレベルの増加または減少、ならびにバイオマーカーレベルの変化の欠如によって、疾患状態についての有用な情報が提供され得、これは、その事象の発症からのおおよその時間、救済可能な組織の存在および量、薬物療法の妥当性、再灌流または症状の解消で示される種々の治療の有効性、様々な種類の脳卒中の識別、事象の重症度の識別、疾患の重症度の識別、および将来の事象のリスクを含む患者の転帰の識別を特定することを含む。

10

【0167】

一部の実施形態では、転帰は、一時的または永続的な症状または苦痛を含み得る。一部の実施形態では、転帰は、身体の片側を動かすことができないこと；体の片側の衰弱；思考、意識、注意、学習、判断および記憶に関する問題；スピーチを理解するかもしくは構成する問題；情動の制御もしくは表現の問題；知覚麻痺もしくは奇妙な感覚；運動および温度変化によって悪化する手および足の疼痛；うつ病またはその組合せである場合がある。一部の実施形態では、cfDNAの増加または高レベルは、悪化した転帰と正に相関する場合がある。一部の実施形態では、cfDNAの減少または低レベルは、より良好な転帰と正の相関があり得る。一部の実施形態では、バイオマーカーの増加または高レベルは、悪化した転帰と正に相関する場合がある。一部の実施形態では、バイオマーカーの減少または低レベルは、より良好な転帰と正に相関する場合がある。

20

【0168】

虚血性脳卒中発症の時間は、本明細書のバイオマーカーのプロファイルおよび/もしくは血液のプロファイルを、虚血性脳卒中発症の時間と相関させることによって、ならびに/または発症の時間が未知であるとき、発症の時間を決定することによって検出され得る。本明細書の方法、デバイスおよびキットは、虚血性脳卒中の発症の時間から120時間、96時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、1時間、または0.5時間以内に、虚血性脳卒中を検出し得る。例えば、本方法は、虚血性脳卒中の発症から4.5時間以内に虚血性脳卒中を検出し得る。虚血性脳卒中症状の発症の時間は、試料中のバイオマーカーの群の発現を、虚血性脳卒中症状の発症の時間と相関させることによって決定され得る。

30

【0169】

本明細書の方法を実施して、対象における症状の発症から一定期間内に対象における状態（例えば、虚血性脳卒中）を評価し得る。一部の場合には、本方法を実施して、対象における虚血性脳卒中症状発症からの短期間内に対象における虚血性脳卒中を評価してもよい。例えば、本方法は、病院の外で、例えば対象の家で、虚血性脳卒中を評価するために使用できる臨床現場即時ケアデバイスを使用することによって実施してもよい。一部の場合には、本方法を実施して、状態の症状発症から120時間、96時間、72時間、60時間、48時間、36時間、24時間、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、1時間、30分、20分、または10分以内に対象の状態を評価してもよい。

40

【0170】

50

本明細書の方法は、虚血性脳卒中が検出される対象に虚血性脳卒中の処置を投与するステップをさらに含み得る。一部の場合には、本方法は、虚血性脳卒中を処置するための薬学的に有効な用量の薬物またはその塩を投与するステップを含み得る。一部の実施形態では、虚血性脳卒中を処置するための薬物は、血栓溶解剤または抗血栓剤を含んでもよい。一部の実施形態では、虚血性脳卒中を治療するための薬物は、血餅を溶解し得る1つまたは複数の化合物、例えば、サイロシピン、tPA（アルテプラゼまたはアクチパーゼ）、レテプラゼ（レタパス）、テネクテプラゼ（TNKasa）、アニストレプラゼ（エミナーゼ）、ストレプトキナーゼ（カビキナーゼ、ストレプターゼ）またはウロキナーゼ（アボキナーゼ）および抗凝固化合物、すなわち、凝固を妨げる化合物であってもよく、これには、限定するものではないが、ビタミンK拮抗薬（ワルファリン、アセノクマロール、フェンプロクモンおよびフェニジオン）、ヘパリンおよびヘパリン誘導体、例えば、低分子量ヘパリン、第Xa因子阻害剤、例えば、合成五糖類、直接トロンビン阻害剤（アルガトロバン、レピルジン、ビパリルジンおよびキシメラガトラン）および血小板凝集の阻害によって、したがって血栓形成のために作用する抗血小板化合物が挙げられ、これには、限定するものではないが、シクロオキシゲナーゼ阻害剤（アスピリン）、アデノシン二リン酸受容体阻害剤（クロピドグレル（clopidogrel）およびチクロピジン）、ホスホジエステラーゼ阻害剤（シロスタゾール）、糖タンパク質IIB/IIIA阻害剤（アブキシマブ、エプチフィパチド、チロフィバンおよびデフィプロチド）およびアデノシン摂取阻害剤（ジピリダモール）が挙げられる。虚血性脳卒中を治療するための薬物は、組織プラスミノゲンアクチベーター（tPA）であってもよい。

10

20

【0171】

一部の場合には、処置は血管内治療を含み得る。一部の場合には、処置が投与された後に血管内治療を実施してもよい。一部の場合には、処置が投与される前に血管内治療を実施してもよい。一部の場合には、処置は血栓溶解剤を含み得る。一部の場合には、血管内治療は機械的な血栓摘出術であってもよい。一部の場合には、ステントのレトリバーを、血餅を除去するために、脳内の遮断された血管の部位に送ってもよい。一部の場合には、ステントレトリバーが血餅またはその一部を把持した後、ステントレトリバーおよび血餅またはその一部を除去してもよい。一部の場合には、カテーテルを、動脈を通して脳の閉塞動脈まで通してもよい。一部の場合には、ステントは、血餅またはその一部を開いて把持し得、閉じ込められた血餅またはその一部を有するステントを除去することを可能にする。一部の場合には、吸引管を使用してもよい。一部の場合には、ステントは、自己拡張型、バルーン拡張型、および/または薬物溶出型であってもよい。

30

【0172】

一部の場合には、本発明の本明細書に開示される処置は、限定するものではないが、経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、くも膜下腔内、脳室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、腸内、局所、舌下または直腸経路を含む、任意の経路によって投与されてもよい。使用される活性成分および賦形剤の異なる剤形、ならびにそれらの製造方法の概説は、「Tratado de Farmacia Galenica」、C.FauliおよびTrillo、Luzan、5、S.A.de Ediciones、1993年、およびRemington's Pharmaceutical Sciences(A. R. Gennaro、編集)、第20版、Williams & Wilkins PA、USA(2000年)に示される。薬学的に許容されるビヒクルの例は、従来技術で知られており、リン酸緩衝化生理食塩水、水、エマルジョン、例えば、油/水エマルジョン、異なる種類の湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。前記ビヒクルを含む組成物は、従来技術において公知である従来のプロセスによって製剤化されてもよい。

40

【0173】

一部の場合には、本方法は、虚血性脳卒中発症から24時間、12時間、11時間、10時間、9時間、8時間、7時間、6時間、5時間、4時間、3時間、2時間、または1時間、30分、20分、または10分以内に虚血性脳卒中を処置するための薬学的に有効な用量の薬物を投与するステップを含み得る。例えば、本方法は、虚血性脳卒中発症の4.5時間以内に、虚血性脳卒中を処置するための薬学的に有効な用量の薬物を投与するス

50

テップを含み得る。特定の例では、本方法は、虚血性脳卒中の発症から4.5時間以内に、薬学的に有効な用量のtPAを投与するステップを含み得る。一部の場合には、本方法は、血餅除去または動脈内tPAのために患者に神経介入性放射線学を行うべきか否かを決定するステップを含み得る。この特定の例では、本方法は、虚血性脳卒中の発症から8時間以内に、動脈内tPAの薬学的有効量を投与するステップを含み得る。ある特定の場合には、対象における無細胞核酸のレベルが参照レベルよりも高い場合、その方法は対象に処置を投与するステップを含む。一部の実施形態では、対象における無細胞核酸のレベルが参照と同等またはそれ未満である場合、処置は投与されない。一部の実施形態では、虚血性脳卒中であると決定される場合、処置が投与される。

【0174】

虚血性脳卒中を処置するための薬物は、薬物を投与される対象において1つまたは複数のバイオマーカーの発現を変化し得る。一部の場合には、虚血性脳卒中を処置するための薬物は、薬物を投与される対象において、1つまたは複数のバイオマーカーの発現、機能、またはその両方を少なくとも部分的に増加し得る。一部の場合には、虚血性脳卒中を処置するための薬物は、薬物を投与される対象において、1つまたは複数のバイオマーカーの発現、機能、またはその両方を少なくとも部分的に低減または抑制し得る。

【0175】

本明細書の方法は、他の用途をさらに含み得る。一部の場合には、本方法は、対象における虚血性脳卒中の転帰を予測するステップをさらに含み得る。転帰は、バイオマーカーの群の発現または核酸（例えば、無細胞核酸）のレベルに基づいて予測され得る。

【0176】

本方法は、対象における虚血性脳卒中のリスクを評価し得る。リスクは、バイオマーカーの群の発現に基づいて評価され得る。一部の場合には、バイオマーカーの群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現が、参照と比較して、例えば、少なくとも約0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100または1000倍まで増加するならば、その対象に虚血性脳卒中の可能性がある。一部の場合には、バイオマーカーの群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現が、参照と比較して、例えば、少なくとも約0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100または1000倍まで減少するならば、その対象に虚血性脳卒中の可能性がある。

【0177】

一部の場合には、脳卒中、虚血性卒中の可能性、脳卒中のリスク、または脳卒中の重症度の検出は、第2の評価によってさらに示され得る。第2の評価は、臨床評価であってもよい。このような評価は、コンピュータ断層撮影（CT）スキャン、磁気共鳴画像法MRI（例えば、機能性磁気共鳴画像法（fMRI）、拡散光学画像法、事象関連光信号、脳磁図、陽電子放射断層撮影（PET）、単一光子放出コンピュータ断層撮影、頭蓋超音波、またはその任意の組合せを含む、神経画像化技術であってもよい。

【0178】

対象における虚血性脳卒中を評価する方法を、異なる時点で繰り返して、虚血性脳卒中および/または対象をモニタリングしてもよい。例えば、本方法は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、1週間、2週間、3週間、1カ月、2カ月、3カ月、4カ月、5カ月、6カ月、7カ月、8カ月、9カ月、10カ月、11カ月、1年、2年、3年、4年、5年、10年、20年、30年、40年または50年以内に繰り返してもよい。一部の場合には、本方法は、上記の時間内に少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、40、60、80または100回繰り返してもよい。虚血性脳卒中を評価する方法は、対象へ処置を投与した後に実施してもよい。これらの場合、バイオマーカーの群の発現は、処置に対する対象の応答を決定し得る。一部の場合には、対象の応答は、処置に対する有害反応であってもよい。一部の場合には、対象における無細胞核酸またはそのサブ

10

20

30

40

50

グループのレベルは、処置に対する対象の応答を決定づけるものである。

【0179】

本方法は、対象が臨床試験に適格であるかを決定するステップをさらに含み得る。例えば、対象におけるバイオマーカーの群の発現は、対象が臨床試験に適格であるかについて少なくとも部分的に決定的であり得る。一部の場合には、バイオマーカーの群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現が、参照と比較して、例えば、少なくとも約0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100、または1000倍まで増加するならば、その対象は、臨床試験に適格である。一部の場合には、バイオマーカーの群における1つまたは複数のバイオマーカーの発現が、参照と比較して、少なくとも約0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、10、100、または1000倍まで減少するならば、その対象は、臨床試験に適格ではない。一部の場合には、その対象は、状態（例えば、虚血性脳卒中）の処置を投与されてもよく、バイオマーカーの群の発現が測定されてもよい。バイオマーカーの群の発現は、処置に対する対象の応答を決定づけ得る。一部の場合には、対象における無細胞核酸またはそのサブグループのレベルは、処置に対する対象の応答を決定づけるものである。応答のレベルは、対象が臨床試験に適格であるかを決定するために使用してもよい。

10

【0180】

本方法は、処置に対して虚血性脳卒中を有することが疑われる対象の応答を予測するステップを含み得る。このような方法は、以下の1つまたは複数を含み得る：対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップ；バイオマーカーの群の発現を参照と比較するステップ；対象に処置を投与するステップ；処置に対する対象の応答を予測するステップ。予測は、バイオマーカーの群の発現と参照の間の相違を分析することによって行ってもよい。

20

【0181】

本方法は、薬物を評価すること（例えば、薬物の効率を評価すること）を含み得る。このような方法は、以下のうちの1つまたは複数を含み得る：対象からの試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップ；対象に薬物を投与するステップ；第2の試料中のバイオマーカーの群の発現を測定するステップであって、第2の試料が、対象に薬物が投与された後に対象から得られるステップ；第1の試料中のバイオマーカーの群の発現と、第2の試料中のバイオマーカーの群の発現とを比較するステップ；ならびに薬物を評価するステップ。評価は、第1の試料中のバイオマーカーの群の発現と第2の試料中のバイオマーカーの群の発現の間の相違を分析することによって実施してもよい。

30

【0182】

本方法は、対象における状態の重症度を評価し得る。一部の場合には、本方法は、虚血性脳卒中の重症度を評価し得る。本方法は、バイオマーカーの群の発現を測定するステップを含み得る。この評価は、例えば、バイオマーカーの発現を参照と比較することによって、バイオマーカーの群の発現に基づいて行ってもよい。例えば、バイオマーカーの発現と参照の間の相違は、虚血性脳卒中の重症度を示し得る。一部の場合には、バイオマーカーの発現と参照の間の相違は、虚血性脳卒中の重症度のスケールと相関し得る。例えば、参照は、特定の重症度の虚血性脳卒中を有する対象からのバイオマーカーの発現レベルの参照範囲を有し得る。対象におけるバイオマーカーの発現レベルが、重症度レベルに相関する参照範囲に入る場合、その対象は、その重症度の虚血性脳卒中を有すると決定され得る。虚血性脳卒中の重症度のスケールは、国立衛生研究所（NIHSS）、カナダの神経学的スケール、ヨーロッパの脳卒中スケール、グラスゴー昏睡スケール、半球脳卒中スケール、ハント&ヘススケール、マッシュー脳卒中スケール、オルゴゴゾ脳卒中スケール、オックスフォードシャーコミュニティ脳卒中プロジェクト分類、およびスキャンジナビア脳卒中スケールを含む当該分野で公知の任意のスケールであってよい。一部の場合には、脳卒

40

50

中の重症度は、試料中の1つまたは複数のバイオマーカのレベルが増加するにつれて増加する。一部の場合には、脳卒中の重症度は、試料中の1つまたは複数のバイオマーカのレベルが増加するにつれて減少する。

【0183】

虚血性脳卒中のバイオマーカのプロファイルの分析を実施して、様々な臨床設定において臨床的感受性または特異性を最適化してもよい。これには、通院、緊急ケア、救急ケア、救命ケア、集中ケア、モニタリングユニット、入院患者、外来患者、医院、医療クリニック、および健康スクリーニングの設定が挙げられる。さらに、当業者は、単一のバイオマーカを使用してよく、または臨床的感度および特異性を最適化するために、上記の各設定における診断閾値の調整と組み合わせて、バイオマーカのより大きなパネルを含むバイオマーカのサブセットを使用してもよい。

10

【0184】

虚血性脳卒中のバイオマーカのプロファイルは、様々な物理的フォーマットでも測定され得る。例えば、マイクロタイタープレートまたは自動化を使用して、多数の試験試料の処理を容易にし得る。あるいは、単一の試料フォーマットを開発して、例えば外来の輸送または緊急処置室の設定において、タイムリーな方式で即時的な処置および診断を容易にし得る。

【0185】

虚血性脳卒中のバイオマーカのプロファイルは、本明細書のバイオマーカのプロファイルを測定および分析する任意の方法を使用して測定および分析してもよい。一部の場合には、多数のイムノアッセイまたは核酸ベースの試験を使用して、特に緊急の臨床設定の状況で行われたとき、生物学的試料中の本明細書の虚血性脳卒中のバイオマーカの存在を迅速に検出し得る。例としては、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ（例えば、ELISA）、免疫蛍光、免疫沈降、ラテックス凝集、血球凝集、および組織化学的試験が挙げられる。しかし、特に好ましい方法は、その速度および使用の容易さのために、ラテックス凝集である。ラテックス凝集アッセイは、参照により本明細書に組み込まれる、Beltz, G. A.ら、Molecular Probes: Techniques and Medical Applications, A. Albertiniら編、Raven Press, New York, 1989年に記載されている。ラテックス凝集アッセイでは、特定のバイオマーカに対して産生された抗体をラテックス粒子に固定してもよい。ラテックス粒子の一滴を、試験すべき血清の適切な希釈液に添加し、カードを穏やかに揺ることによって混合してもよい。バイオマーカのレベルが十分でない試料では、ラテックス粒子は懸濁状態のままであり、滑らかで乳白色の外観を保持する。しかし、抗体と反応するバイオマーカが存在する場合、ラテックス粒子は、目に見える検出可能な凝集体に凝集する。凝集アッセイはまた、対応する抗体が、ラテックスビーズ以外の適切な粒子上に、例えばゼラチン、赤血球、ナイロン、リポソーム、金粒子などの上に固定されたバイオマーカを検出するために使用してもよい。アッセイにおける抗体の存在は、沈降反応の凝集と同様の凝集を引き起こし、これが次に比濁分析、濁度、赤外分光法、目視検査、比色法などの技術によって検出され得る。ラテックス凝集という用語は、検出可能な凝集の形成に基づく任意の方法を指して本明細書において一般的に用いられ、免疫吸着基質としてのラテックスの使用に限定されない。凝集のための好ましい基質は、ポリスチレンおよびポリプロピレン、特にポリスチレンのようなラテックスベースであるが、他の周知の基質としては、ガラス、紙、デキストラン、およびナイロンから形成されたビーズが挙げられる。固定された抗体は、アミド結合またはエステル結合による共有結合、イオン引力、または吸着などの技術によって、固相免疫吸着剤に対して共有結合的、イオンのまたは物理的に結合され得る。当業者は、抗体に結合するための多くの他の適切な担体を知っているか、または慣用的な実験を使用してそのようなものを確かめることができるであろう。

20

30

40

【0186】

虚血性脳卒中を検出するキット

本明細書では、対象における虚血性脳卒中を検出するキットも提供される。キットは、

50

本明細書に記載の任意の方法を実施するために使用されてもよい。例えば、キットは、対象における状態（例えば、虚血性脳卒中）を評価するために使用してもよい。キットを用いて状態を評価するとき、本明細書中に開示される任意の特異性および感度が達成され得る。キットは、状態の処置を評価するためにも使用してもよい。例えば、本明細書に開示されるキットは、プローブのパネルおよび検出試薬を含み得る。

【0187】

このキットは、対象からの試料中の無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブを含んでもよい。このプローブは、試料中の無細胞核酸の少なくとも1つに（例えば、直接的または間接的に）結合し得る。一部の場合には、このキットは、対象からの試料中の後成的マーカーを有する無細胞核酸のレベルを測定するためのプローブであって、後成的マーカーを有する無細胞核酸に結合するプローブを含み得る。キットは、無細胞核酸の少なくとも1つに対するプローブの結合を調べるための検出試薬をさらに含んでもよい。

10

【0188】

キットは、虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーを検出し得る複数のプローブを含んでもよい。一部の場合には、キットは、虚血性脳卒中のバイオマーカーの第1の群のうちの少なくとも1つのバイオマーカーを検出するためのプローブの第1のパネルと、脳卒中のバイオマーカーの第2の群のうちの少なくとも1つのバイオマーカーを検出するためのプローブの第2のパネルとを含んでもよい。一部の場合には、バイオマーカーの第1の群は、生体分子の第1のクラスを含んでもよく、バイオマーカーの第2の群は、生体分子の第2のクラスを含んでもよい。一部の場合には、生体分子の第1および第2のクラスは、生体分子の異なるクラスであってもよい。例えば、生体分子の第1のクラスは、ポリヌクレオチドであってもよい。別の例では、生体分子の第2のクラスはポリペプチドであってもよい。別の例では、生体分子の第1のクラスは、ポリヌクレオチドであってもよく、生体分子の第2のクラスはポリペプチドであってもよい。

20

【0189】

キットは、虚血性脳卒中の1つまたは複数のバイオマーカーに結合し得る1つまたは複数のプローブを含んでもよい。一部の場合には、このプローブは、虚血性脳卒中のバイオマーカーに結合し得るオリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドによって結合される虚血性脳卒中のバイオマーカーは、ポリヌクレオチド、ポリペプチドまたはタンパク質であってもよい。一部の場合には、キット中のプローブは、虚血性脳卒中のバイオマーカーのうちの少なくとも1つ（例えば、ポリヌクレオチドである虚血性脳卒中のバイオマーカー）にハイブリダイズし得るオリゴヌクレオチドであってもよい。オリゴヌクレオチドは、DNA、RNAまたはそれらのハイブリダイゼーションを含む任意の種類の核酸であってもよい。オリゴヌクレオチドは任意の長さであってもよい。一部の場合には、本明細書のプローブは、アプタマーを含む他の種類の分子であってもよい。

30

【0190】

プローブはまた、タンパク質性物質、例えば、本発明のバイオマーカーのポリペプチドまたはポリペプチド断片であってもよい。一部の場合には、プローブは、タンパク質性化合物であってもよい。多種多様なタンパク質-タンパク質相互作用が存在する；しかし、タンパク質はまた、核酸、金属および他の非タンパク質化合物（例えば、脂質、ホルモン、トランスミッタ）にも結合する。標的またはプローブのいずれかとして使用され得るタンパク質のいくつかの他の例としては、抗体、酵素、受容体、およびDNAまたはRNA結合性タンパク質が挙げられる。抗体および抗原調製物の両方は、定量的適用において容易に参照できる所定の抗原濃度および/または抗体力価を有する適切な滴定形態であってもよい。

40

【0191】

プローブは、虚血性脳卒中のバイオマーカーの少なくとも1つに特異的に結合し得る抗体であってもよい。特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに「特異的に結合する」または「特異的」である抗体は、任意の他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペ

50

プチド上のエピトープに結合する抗体であってもよい。あるいは、本発明に従って、抗原に特異的に結合する抗体は、適切な検出器具、例えば、B I A C O R E（登録商標）表面プラズモン共鳴システムおよびB I A C O R E（登録商標）動態評価ソフトウェア（例えば、バージョン2.1）を使用する表面プラズモン共鳴分析によって測定されるように、104またはそれ未満の解離定数（ IQ ）を有する抗体またはその断片による抗原の結合を指す。特異的結合相互作用の親和性または解離定数（ K_d ）は、好ましくは、約500 nMまたはそれ未満、より好ましくは約300 nMまたはそれ未満、および好ましくは少なくとも300 nM ~ 50 pM、200 nM ~ 50 pM、より好ましくは少なくとも100 nM ~ 50 pM、75 nM ~ 50 pM、10 nM ~ 50 pMである。

【0192】

プローブは標識されてもよい。例えば、プローブは、標識を含み得る。標識を使用して、試料中の虚血性脳卒中のバイオマーカーとのプローブの結合を追跡してもよい。標識は、蛍光タグまたは発光タグ、金属、色素、放射性同位元素などであってもよい。標識の例としては、常磁性イオン、放射性同位体；蛍光色素、金属、色素、NMR検出可能物質、およびX線画像形成化合物が挙げられる。常磁性イオンとしては、クロム（III）、マンガ（II）、鉄（III）、鉄（II）、コバルト（II）、ニッケル（II）、銅（II）、ネオジム（II）、サマリウム（III）、イッテルビウム（III）、ガドリニウム（III）、バナジウム（II）、テルビウム（III）、ジスプロシウム（III）、ホルミウム（III）および/またはエルビウム（III）が挙げられ、ガドリニウムが特に好ましい。X線画像のような他の状況で有用なイオンとしては、限定するものではないが、ランタニウム（III）、金（III）、鉛（II）および特にビスマス（III）が挙げられる。放射性同位体としては、 14 炭素、 15 クロム、 36 塩素、 57 コバルトなどを利用してよい。とりわけ、使用を企図する蛍光標識としては、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、ローダミンググリーン、ローダミンレッド、Rengraphin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはテキサスレッド（Texas Red）が挙げられる。発色基質との接触時に着色生成物を生成する酵素（酵素タグ）も使用してもよい。適切な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、（西洋ワサビ）水素ペルオキシダーゼまたはグルコースオキシダーゼが挙げられる。二次結合リガンドは、ビオチンおよび/またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物であってもよい。このような標識の使用は、当業者に周知であり、例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第3,817,837号；同第3,850,752号；同第3,939,350号；同第3,996,345号；同第4,277,437号；同第4,275,149号および同第4,366,241号に記載される。

【0193】

本明細書中に開示されるプローブを使用して、虚血性脳卒中を評価する方法におけるバイオマーカーの群の発現を測定してもよい。一部の場合には、虚血性卒中を評価する方法において群の発現を測定するために使用されるプローブは、本明細書に記載の任意の標識を含む標識されたプローブであってもよい。一部の場合には、プローブは、例えば *in vitro* で合成された合成物であってもよい。一部の場合には、プローブは、任意の天然に存在する分子とは異なってもよい。

【0194】

プローブは、1つまたは複数のポリヌクレオチドを含んでもよい。一部の場合には、プローブは、バイオマーカーの群と結合する（例えば、ハイブリダイズする）ポリヌクレオチドを含んでもよい。一部の場合には、プローブは、バイオマーカーの群のRNA（例え

10

20

30

40

50

ば、mRNAまたはmiRNA)と結合する(例えば、ハイブリダイズする)ポリヌクレオチドを含んでもよい。一部の場合には、プローブは、バイオマーカの群のRNA(例えば、mRNAまたはmiRNA)から誘導された(例えば、逆転写された)DNAに結合する(例えば、ハイブリダイズする)ポリヌクレオチドを含んでもよい。

【0195】

プローブは、ポリペプチドを含んでもよい。一部の場合には、プローブは、バイオマーカの群のタンパク質(またはタンパク質の断片)に結合するポリペプチドを含んでもよい。そのようなプローブは、抗体またはその断片であってもよい。

【0196】

プローブは、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド以外のバイオマーカの群に結合する任意の他の分子を含んでもよい。例えば、プローブは、アプタマーまたは化合物であってもよい。一部の場合には、プローブは、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、アプタマー、化合物、および任意の他の種類の分子の組合せを含んでもよい。

10

【0197】

キットは検出試薬をさらに含んでもよい。検出試薬は、プローブとバイオマーカの群との結合を調べるために使用してもよい。検出試薬は、本明細書に記載の任意の標識、例えば、蛍光標識または放射性標識を含んでもよい。一部の場合には、キットはまた、提供されるバイオマーカおよび/または抗体(場合によっては)と診断試料の間の特異的免疫反応の検出のための免疫検出試薬または標識を含んでもよい。適切な検出試薬は、抗原および/または抗体と会合して、または第1抗体に対する特異性を有する第2抗体と会合して典型的に用いられる、放射性リガンド、酵素リガンドまたは他の発色性リガンドによって例示されるように、当技術分野で周知である。したがって、反応は、標識を検出または定量する手段によって検出または定量されてもよい。本発明の新規な方法に関連して適用するのに適した免疫検出試薬およびプロセスは、当該分野において一般的に周知である。

20

【0198】

試薬は、緩衝剤およびタンパク質安定化剤、例えば、多糖類などのような補助剤を含んでもよい。キットは、必要なら、試験におけるバックグラウンド干渉を低減するための薬剤、シグナルを増加させる薬剤、試験を行うための装置、検量線およびチャート、標準化曲線およびチャートなどをさらに含んでもよい。

30

【0199】

キットは、対象の状態を評価するためのコンピュータ可読媒体をさらに含んでもよい。例えば、コンピュータ可読媒体は、対象からの試料中のバイオマーカの群の発現と参照と間の相違を分析し、それによって対象の状態を評価し得る。一部の実施形態では、本明細書に開示されるキットは、使用説明書を含んでもよい。

【0200】

虚血性脳卒中を検出するデバイス

対象の虚血性脳卒中を評価するためのデバイスが本明細書で開示される。そのようなデバイスは、実行可能命令を記憶するメモリを含んでもよい。デバイスは、本明細書で開示される方法を実施するために実行可能命令を実行するプロセッサをさらに備えてもよい。

40

【0201】

本明細書中に開示されるのは、対象における虚血性脳卒中を検出するデバイスがさらに挙げられる。デバイスは、実行可能命令を記憶するメモリと、実行可能命令を実行するプロセッサとを含み得る。デバイスは、本明細書で開示される虚血性脳卒中を検出する任意の方法を実施するように構成してもよい。

【0202】

デバイスは、ポリペプチドまたはタンパク質のプロファイルを測定するためのイムノアッセイデバイスを含み得る。例えば、これらの各々が、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,143,576号;同第6,113,855号;同第6,

50

019, 944号;同第5, 985, 579号;同第5, 947, 124号;同第5, 939, 272号;同第5, 922, 615号;同第5, 885, 527号;同第5, 851, 776号;同第5, 824, 799号;同第5, 679, 526号;同第5, 525, 524号;および同第5, 480, 792号を参照のこと。これらのデバイスおよび方法は、標識されたプローブを、種々のサンドウィッチで、競合的または非競合的アッセイ形式で利用して、目的の検体の存在または量に関連し得るシグナルを生成し得る。さらに、バイオセンサーおよび光学イムノアッセイなどの特定の装置およびデバイスを用いて、標識分子を必要とせずに検体の存在または量を決定してもよい。例えば、これらの各々が、参照により、全ての表、図および特許請求の範囲を含むその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第5, 631, 171号;および第5, 955, 377号を参照のこと。Beckman ACCESS (登録商標)、Abbott AXSYM (登録商標)、Roche ELECSYS (登録商標)、Dade Behring STRATUS (登録商標)システムを含むがこれらに限定されないロボット機器は、なかでも、本明細書に教示されたイムノアッセイを実施することができるイムノアッセイ分析装置であることが当業者にまた認識され得る。

10

【0203】

デバイスは、フィラメントベースの診断デバイスを含んでもよい。フィラメントベースの診断デバイスは、フィラメント支持体を含み、この支持体は装置の異なるゾーン(例えば、洗浄チャンバまたは報告チャンバなどのチャンバ)間でプローブを迅速かつ効率的に移動させる機会を提供し、それらの位置に関する情報を依然として保持する。それはまた、非常に少量の様々な試料(ナノリットル程度の小さい容積反応)の使用を可能にし得る。フィラメントは、プローブが環状に配列され、フィラメントの周囲にプローブバンドを形成するように構成してもよい。これによってまた、フィラメント上のプローブの高い線密度を達成するようにバンドを堆積させることも可能になる。

20

【0204】

フィラメントは、多数の異なる材料のうちの任意のものから作製してもよい。適切な材料としては、ポリスチレン、ガラス(例えば、光ファイバコア)、ナイロン、または所望の表面構造(3次元)および化学活性を付与するために化学的部分で誘導体化された他の基材が挙げられる。フィラメントはまた、細孔、磨耗剤、陥入、突起、または有効表面積を増加させる他の物理的もしくは化学的構造などの表面特徴を含むように構築してもよい。これらの表面特徴は、一態様では、フィラメントが溶液含有チャンバを通過する際の溶液の混合の向上を提供する場合もあり、またはプローブ分子の数および利用可能性の増大をもたらす場合もある。フィラメントはまた、単一のフィラメント上の多数の異なるプローブをユーザが追跡することを可能にするプローブ識別子を含み得る。プローブ識別子は、色素、磁性、放射性、蛍光性、または化学発光性分子であってもよい。あるいは、それらは様々なデジタルタグまたはアナログタグを含んでもよい。

30

【0205】

フィラメントに付着されるプローブは、核酸分子(例えば、オリゴヌクレオチド)および抗体または抗体断片を含む、任意の様々な生体分子であってもよい。結合または相互作用が検出可能であるように、プローブは、試験される試料(例えば、末梢血)中の目的の標的物質(例えば、本発明のポリペプチドバイオマーカーまたはそれらのコードするmRNA分子)に結合するか、または相互作用できなければならない。

40

【実施例】

【0206】

(実施例1)

PCRを使用した、虚血性脳卒中患者、一過性虚血発作患者および疑似脳卒中患者の間のバイオマーカーの遺伝子発現パターンの比較。

4つの群の患者(すなわち、8人の虚血性脳卒中患者、4人の一過性虚血発作(TIA)患者、7人の疑似脳卒中患者および19人の対照患者)からの末梢血血漿試料を、症状の発症から24時間以内にPAXgene血液RNAチューブ(Qiagen)に収集し

50

た。総血液RNAを、PAXgene Blood RNAキット(Qiagen)を使用して抽出し、精製した。

【0207】

PCRを実施して、対照群に対して、ARG1、CA4、CCR7、CSPG2、IQGAP1、LY96、MMP9、ORM1およびs100a12の遺伝子発現を測定した。虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群の間では、ARG1 ($p = 0.038$)、CCR7 ($p = 0.003$)、LY96 ($p = 0.018$)、CSPG2 ($p = 0.05$)の発現レベルは、有意に異なっていた(図1)。

【0208】

PCRをまた実施して、内部対照と比較してIQGAP、Ly96、MMP9、およびs100a12の遺伝子発現を測定した。IQGAP1 ($p = 0.05$)、Ly96 ($p = 0.05$)、MMP9 ($p = 0.08$)、s100a12 ($p = 0.62$ 、分析について異常値は外された)の発現レベルは、虚血性脳卒中群とTIA群とだけの間で有意に異なっていた(図2)。

【0209】

ARG1、CCR7、LY96、CSPG2、MMP9およびs100a12の間の相互影響は、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群において有意に異なっていた($p = 0.08$)(図3)。この相互影響は全ての目的の変数の発現パターンであった。パターン認識および機械学習分析を実施して、各疾患コホートの発現パターンを完全に捕捉してもよい。

【0210】

本明細書において試験された多くの遺伝子間の比もまた、虚血性脳卒中群、TIA群、および疑似脳卒中群の間で有意に異なり、これによって、3つの患者群の発現パターンが異なることが示唆された。臨床現場即時(ポイント・オブ・ケア:POC)技術の最も堅調な統計モデルは、さらなる最適化によって決定され得る。

【0211】

虚血性脳卒中群、TIA群、疑似脳卒中群の間の比の比較からのp値は、以下のとおりであった: ARG1対CCR7: $p = 0.016$ 、CCR7対Ly96: $p = 0.008$; CSPG2対MMP9: $p = 0.059$; IQGAP1対MMP9: $p = 0.07$; MMP9対s100a12: $p = 0.019$; ARG1対s100a12: $p = 0.04$; CCR7対s100a12: $p = 0.05$; およびCA4対s100a12: $p = 0.048$ 。CCR7対LY96およびMMP9対s100a12の比は、図4A~図4Bに示す。

【0212】

虚血性脳卒中群とTIA群の間の比の比較からのp値は、以下のとおりであった: ARG1対LY96: $p = 0.09$; CSPG2対MMP9: $p = 0.05$; IQGAP1対MMP9: $p = 0.08$; MMP9対s100a12: $p = 0.024$; ARG1対s100a12: $p = 0.045$; CCR7対s100a12: $p = 0.067$; およびCA4対s100a12: $p = 0.053$ 。MMP9対s100a12およびARG1対s100a12の比は、図5A~図5Bに示す。

【0213】

(実施例2)

PCRを使用した、虚血性脳卒中患者と代謝性疾患対照患者の間のバイオマーカーの遺伝子発現パターンの比較。

22人の虚血性脳卒中患者および19人の代謝性疾患対照患者からの末梢血血漿試料を、症状の発症から24時間以内に、PAXgene血液RNAチューブ(Qiagen)に収集した。血液総RNAを、PAXgene Blood RNAキットを使用して抽出し、精製した。

【0214】

ARG、MMP9、s100a12およびCCR7の遺伝子発現を測定するためにPC

10

20

30

40

50

Rを実施した。脳卒中对代謝疾患の対照の間では、ARG1 ($p = 0.003$)、MMP9 ($p = 0.001$)、s100a12 ($p = 0.018$)およびCCR7 ($p = 0.000$)の発現レベルが有意に異なっていた(図6A~6D)。

【0215】

ARG1、MMP9とs100a12との間の相互影響は、虚血性脳卒中群および代謝疾患対照群において有意に異なっていた($p = 0.009$)(図7)。この相互影響は全ての目的の変数の発現パターンであった。パターン認識および機械学習分析を実施して、各疾患コホートの発現パターンを完全に捕捉してもよい。

【0216】

(実施例3)

ELISAを使用した、虚血性脳卒中患者、一過性虚血発作患者および疑似脳卒中患者の間の、バイオマーカーのタンパク質発現パターンの比較。

3つの群の患者(すなわち、4人の虚血性脳卒中患者、2人のTIA患者、および2人の疑似脳卒中患者)からの全血試料を、EDTAチューブ(Becton Dickinson)に収集した。遠心分離により血漿を除去した。

【0217】

ARG1、CA4、CCR7、CSPG2、IQGAP1、LY96、MMP9、RAGEおよびORM1のタンパク質発現を、市販のELISAキットを使用して測定した。ARG1 ($p = 0.048$)およびLY96 ($p = 0.056$)のタンパク質発現レベルは、虚血性脳卒中群、TIA群および疑似脳卒中群の間で有意に異なっていた(図8A~8B)。

【0218】

LY96対ARG ($p = 0.07$)とLY96対CCR7 ($p = 0.09$)との間の相互影響は、3群間で有意に異なっており(図9A~図9B)、群間で異なるパターンのタンパク質発現が示唆された。この相互影響は全ての目的の変数の発現パターンであった。各疾患コホートの発現パターンは、パターン認識および機械学習分析によって完全に補足され得る。

【0219】

(実施例4)

虚血性脳卒中患者とTIA患者との間の全血試料の全プロテオームプロファイルの比較。

2つの群の患者(すなわち、10人の虚血性脳卒中患者および4人のTIA患者)からの全血試料を、EDTAチューブ(Becton Dickinson)に収集した。血漿試料を血液試料から遠心分離によって収集した。収集した血漿試料は、プロテオーム解析の前に解凍した。血漿試料のプロテオーム解析は、Protea Bioscience LAESI技術を使用した質量分析によって実施した。プロテオーム全体をスクリーニングした。

【0220】

タンパク質発現レベルを、虚血性卒中試料とTIA試料との間で比較した。図10Aは、虚血性脳卒中群とTIA群との間で異なる発現レベルを有する例示的なタンパク質を列挙した(図10A)。経路分析によって、これらのタンパク質のほとんどが凝固に関与していることが明らかになった。男性患者と女性患者の間にも有意差があった(図10A~10H)。

【0221】

(実施例5)

Luminex系を使用した、虚血性脳卒中患者、TIA患者および疑似脳卒中群の間のサイトカインの発現パターンの比較。

3つの群の患者(すなわち、17人の虚血性脳卒中患者、10人の疑似脳卒中および13人のTIA患者)からの全血試料を、EDTAチューブ(Becton Dickinson)に収集した。血漿試料を血液試料から遠心分離によって収集した。収集した血漿試料を、サイトカイン発現パターンの分析前に解凍した。

10

20

30

40

50

【0222】

収集した血漿試料中のサイトカインの発現レベルを、市販のサイトカインキットを介して、Luminexシステムによって測定し、このシステムでは、以下のサイトカインを測定する：BAFF、MMP9、APP、アグリカン、ガレクチン-3、Fas、RAGE、エフリン(Ephrin)A2、CD30、TNFR1、CD27、CD40、TNF、IL6、IL8、IL10、IL1ベータ、IFNy、RANTES、IL1a、IL4、IL17、IL12、GMCSF、ENA78、IL5、IL23P70、TARC、GroAlpha、IL33、BLCBCA、IL31、およびMCP2。

【0223】

MMP9 ($p = 0.065$)、ガレクチン3 ($p = 0.09$)、RAGE ($p = 0.06$)、CD30 ($p = 0.078$)、GMCSF ($p = 0.07$) および ENA78 ($p = 0.028$) の発現レベルは、3つの群全てにおいて有意に異なっていた(図11A~11E)。

10

【0224】

ガレクチン3 ($p = 0.09$) および RAGE ($p = 0.09$) の発現レベルは、虚血性脳卒中群とTIA群の間で有意に異なっていた(図12A~12B)。

【0225】

MMP9、RAGEおよびENA78の間の相互影響は、3つの群全てにおいて統計的に異なっていた($p = 0.048$) (図13)。

20

【0226】

(実施例6)

虚血性脳卒中患者と非虚血性脳卒中患者と間の血液試料のプロファイルの比較。

5つの群の患者(すなわち、43人の虚血性脳卒中患者、13人のTIA患者、3人の出血性脳卒中患者、14人の外傷性脳損傷(TBI)患者、および22人の疑似脳卒中患者)から全血試料を採取した。血液試料のプロファイルを測定するために種々の試験を行った。

【0227】

総白血球 ($p = 0.012$)、血小板数 ($p = 0.07$)、ヘマトクリット ($p = 0.036$)、ヘモグロビンレベル ($p = 0.1$)、プロトロンビン時間 ($p = 0.004$)、活性化部分トロンボプラスチン(APTT) ($p = 0.028$)、トロポニン1 ($p = 0.09$)、およびクレアチニンキナーゼ ($p = 0.07$) のベースラインは、5つの群全ての間で有意に異なっていた(図14A~図14D)。

30

【0228】

全血球数 ($p = 0.011$)、好中球パーセンテージ ($p = 0.05$)、およびクレアチニンキナーゼ-MB ($p = 0.018$) のベースラインレベルは、虚血性脳卒中群、TIA群および出血性虚血性脳卒中群の間で有意に異なっていた(図15A~図15B)。

【0229】

出血性脳卒中群では、リンパ球数および好中球リンパ球の比が非常に高かった。リンパ球数および好中球リンパ球の比は、出血性脳卒中群とTIA群の間で統計的に異なっていたが、虚血性脳卒中群と出血性脳卒中群の間で統計的に差はなかった(図16A~図16B)。

40

【0230】

(実施例7)

虚血性脳卒中症状発症からの時間と選択された時点でのバイオマーカーの間の相関。

血液総RNAを、バックスジーン(paxgene)プロトコルに従ってバックスジーンチューブから抽出した。全ゲノム発現プロファイリングを、IlluminaHiSeq2500 v2ピースチップを介して決定した。血液は、2つの時点(脳卒中が発症してから0~24時間後、再び24~48時間後)に採取した。遺伝子発現と症状の発現からの時間の間の関係は、ピアソン相関を使用して決定した。ベースラインとフォローアップの間の相違は、対の試料t検定によって決定した。先天性免疫および適応免疫経路の遺伝子を

50

標的とした。t o l l 様受容体 (T L R) 遺伝子 T L R 2、T L R 4、L Y 9 6、M Y D 8 8、J A K 2；細胞傷害性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A 4) 遺伝子 C D 3、C D 4、S Y K；他の免疫経路におけるゲノムマーカー (A K A P 7、C E B P B、I L 1 0、I L 8、I L 2 2 R；および診断団由来のゲノムマーカー (A R G 1、C A 4、C C R 7)。N = 3 4 の虚血性脳卒中対象。

【 0 2 3 1 】

症状発現からの時間 (0 ~ 4 8 時間) と各時点での以下の標的遺伝子の間の相関 : t o l l 様受容体 (T L R) 遺伝子 T L R 2 (0 . 1)、T L R 4 (0 . 3)、L Y 9 6 (0 . 0 0 0)、M Y D 8 8 (0 . 0 0 0)、J A K 2 (0 . 0 0 6)、細胞毒性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A 4) 遺伝子 C D 3 (0 . 0 0 2)、C D 4 (0 . 0 0 6)、S Y K (0 . 0 0 1)、他の免疫経路におけるゲノムマーカー (A K A P 7 (0 . 0 0 2)、C E B P B (0 . 0 0 0)、I L 1 0 (0 . 0 0 0)、I L 8 (0 . 0 0 3)、I L 2 2 R (0 . 0 0 1))、診断パネル由来のゲノムマーカー (A R G 1 (0 . 1)、C A 4 (0 . 3)、C C R 7 (0 . 1))。

10

【 0 2 3 2 】

ベースライン (0 ~ 2 4 時間) とフォローアップ (2 4 ~ 4 8 時間) の間の相違についての対の試料 t 検定 ; t o l l 様受容体 (T L R) 遺伝子 T L R 2 (0 . 0 1 3)、T L R 4 (0 . 0 8)、L Y 9 6 (0 . 0 0 0)、M Y D 8 8 (0 . 0 0 0)、J A K 2 (0 . 0 0 1)、細胞傷害性 T リンパ球抗原 - 4 (C T L A 4) 遺伝子 C D 3 (0 . 0 0 2)、C D 4 (0 . 0 0 1)、S Y K (0 . 0 0 1)、他の免疫経路におけるゲノムマーカー (A K A P 7 (0 . 0 0 0)、C E B P B (0 . 0 0 0)、I L 1 0 (0 . 0 0 0)、I L 8 (0 . 0 0 0)、I L 2 2 R (0 . 0 0 2))。本発明者らの診断パネル由来のゲノムマーカー (A R G 1 (0 . 0 3)、C A 4 (0 . 0 3)、C C R 7 (0 . 1))。(図 1 7 A ~ 図 1 7 H)。

20

【 0 2 3 3 】

(実施例 8)

虚血性兆候発症の時間と選択されたバイオマーカーの間の相関。

血漿を、遠心分離によって E D T A チューブ中で得られた全血から分離し、- 8 0 で凍結させ、市販のサイトカインキットを介して L u m i n e x システムで分析するために解凍した。1つの時点 (症状の発症から 0 ~ 2 4 時間) で血液を収集した。N = 1 7 の虚血性脳卒中対象。以下のサイトカインを分析に含めた (F A S リガンド、I L 6 および I L 1 0)。(図 1 8)。

30

【 0 2 3 4 】

症状発症からの時間と選択されたマーカーの発現の間のピアソン相関 : F a s リガンド $r = - 0 . 7 1$; $p = 0 . 0 2 1$ 、I L 6 $r = - 0 . 6 8$; $p = 0 . 1$ 、I L 1 0 $r = - 0 . 5$; $p = 0 . 3$ 。

【 0 2 3 5 】

(実施例 9)

虚血性脳卒中症状発症の時間とプロテオームマーカーの間の相関。

血漿を、E D T A チューブ中で遠心分離により得られた全血から分離し、- 8 0 で凍結し、全プロテオームをスクリーニングする P r o t e a B i o s c i e n c e s L A E S I 技術 (質量分析) による分析のために解凍した。1つの時点 (症状の発症から 0 ~ 2 4 時間) で血液を収集した。N = 1 0 の虚血性脳卒中対象。免疫グロブリンガンマ 3 (I G G 3)、テネウリン 1 のアイソフォーム 2、免疫グロブリンガンマ 4 (I G G 4) およびディスインテグリンのアイソフォーム 2 は、脳卒中症状の発症からの時間と関連していた。

40

【 0 2 3 6 】

症状発現からの時間と選択されたマーカーの発現の間のピアソン相関 : 免疫グロブリンガンマ 3 (I G G 3) ($r = 0 . 6$; $p = 0 . 0 4$)、テネウリン 1 のアイソフォーム 2 ($r = - 0 . 9$; $p = 0 . 0 0 8$)、免疫グロブリンガンマ 4 (I G G 4) ($r = 0 . 8$

50

; $p = 0.01$)、およびディスインテグリンのアイソフォーム 2 ($r = 0.9$; $p = 0.07$) は、脳卒中の発症からの時間と相関していた。(図 19 A ~ 図 19 B)。

【0237】

(実施例 10)

虚血性脳卒中症状発症の時間と免疫マーカーの間の相関。

クレアチンキナーゼ MD (CKMB) および血小板数は、医療記録からの急性血液採取によって得た。1つの時点(症状の発症から 0 ~ 24 時間)で血液を収集した。N = 17 の虚血性脳卒中対象。

【0238】

症状発症からの時間と選択されたバイオマーカーの発現の間のピアソン相関: 血小板数: $r = -0.5$; $p = 0.026$ 、CK-mb: $r = 0.6$; $p = 0.08$ 。(図 20 A ~ 20 B)。

10

【0239】

(実施例 11)

機械学習アプローチは、高レベルの正確さで急性虚血性脳卒中を識別し得る末梢血における遺伝子発現のパターンを識別した。

発見コホートおよび独立した検証コホートを含む 2 段階の研究デザインを使用した。発見コホートにおいて、末梢血全血試料は、緊急部門入院時に 39 人の AIS 患者から、ならびに 24 人の神経学的無症候性対照から得た。マイクロアレイを使用して 22,000 を超える遺伝子の発現レベルを測定し、GA/kNN を使用して、AIS 患者と対照とを最適に識別する遺伝子発現のパターンを識別した。次いで、別の検証コホートにおいて、発見コホートにおいて識別された遺伝子発現パターンを、39 人の AIS 患者と 2 つの異なる対照群のそれぞれ(1つは 30 の神経学的に無症状の対照からなり、もう 1 つは 15 の疑似脳卒中からなる)の間を識別するその能力について評価し、遺伝子発現レベルを qRT-PCR によって評価した。

20

【0240】

発見コホート:

急性虚血性脳卒中患者および神経学的無症候性対照は、Suburban Hospital、Bethesda、MD で 2007 年 ~ 2008 年に募集された。AIS 患者の場合、診断は MRI によって確認し、全ての試料は、患者が、最後に AIS 症状がないことが判明した時点で決定されるように、発症 24 時間以内に収集した。傷害の重症度は、採血時の NIH 脳卒中スケール (NIHSS) に従って決定した。対照対象は、登録時に訓練を受けた神経科医によって神経学的に正常とみなされた。人口統計学的情報は、訓練を受けた臨床医によって対象または重要な他者のいずれかから収集した。全ての手順は、NIH および Suburban 病院における神経障害の国立研究所 / 老化に関する国立研究所の施設審査委員会によって承認された。試験手順の前に、全ての対象またはその正当な代表者から書面のインフォームドコンセントを得た。

30

【0241】

採血および RNA 抽出:

PAXgene RNA チューブ (Qiagen、Valencia、CA) を介して末梢血全血試料を収集し、RNA 抽出まで -80°C で保存した。PreAnalytiX PAXgene 血液 RNA キット (Qiagen) を介して総 RNA を抽出し、QIACube システム (Qiagen) を使用して自動化した。単離された RNA の量および純度は、分光光度法 (NanoDrop、Thermo Scientific、Waltham、MA) を介して測定した。チップキャピラリー電気泳動 (Agilent 2100 Bioanalyzer、Agilent Technologies、Santa Clara、CA) により RNA の品質を確認した。

40

【0242】

RNA 増幅およびマイクロアレイ:

Total Prep RNA 増幅キット (Applied Biosystems、G

50

rand Island, NY) を使用して、RNA を増幅し、ビオチン化した。22,000 を超える遺伝子に由来する転写物のプローブを含む Human Ref - 8 発現ビーズチップ (Illumina, San Diego, CA) に試料をハイブリダイズし、Illumina Bead Station を使用してスキャンした。生のプローブ強度は、バックグラウンドを差引きし、変位値を正規化し、次いで Illumina Genome Studio を使用して遺伝子レベルで要約した。試料の標識、ハイブリダイゼーションおよびスキャンは、標準的なイルミナ (Illumina) プロトコルに従って実施した。

【0243】

GA / kNN 分析 :

統計的有意性にかかわらず、標準化マイクロアレイデータを、脳卒中と対照の間の絶対倍数差に基づいてフィルタリングした ; AIS と対照の間の発現における 1.7 倍を超える絶対差を示す遺伝子を分析のために保持した。フィルタリングされた遺伝子発現データを、z 変換し、GA / kNN 解析は、Liら、Gene assessment and sample classification for gene expression data using a genetic algorithm/k-nearest neighbor method. *CMB Chem High Throughput Screen*. 2001 年 ; 第 4 巻 (8 号) : 727 ~ 739 頁によって開発されたソースコードを使用して実施した。1 試料あたり 2 千の近最適解を、5 つの最近傍、多数決、染色体長 5、および終止カットオフ 0.97 を使用して、収集した。上位 50 個の遺伝子産物を使用して、一個抜き交差検証を実施した。

【0244】

検証コホート :

AIS 患者、疑似脳卒中、および神経学的無症候性対照は、Ruby Memorial Hospital, Morgantown, WV で 2011 年から 2015 年に募集された。発見コホートと同様に、AIS 診断は、神経放射線画像法により確認し、公知の症状発症の 24 時間以内に血液をサンプリングした。脳卒中様のシステムで救急部に入院したが、画像化の際に脳卒中の陰性診断を受けた患者は、疑似脳卒中であると識別された。傷害重症度の評価、神経学的無症候性対照のスクリーニング、および人口統計学的情報の収集は、発見コホートと同じ方法で実施した。全ての手順は、ウェストバージニア大学およびルビーメモリアル病院の施設審査委員会によって承認された。試験手順の前に、全ての対象またはその正当な代表者から書面によるインフォームドコンセントを得た。

【0245】

定量的逆転写 PCR :

Applied Biosystems 高容積逆転写キットを使用して精製 RNA から cDNA を生成した。qPCR については、配列特異的プライマー (表 2) を使用して 10 ng の cDNA 入力から標的配列を増幅し、Rotor Gene Q (Qiagen) 上で SYBR グリーン (Power SYBR, Thermo-Fisher) を介して検出した。生の増幅プロットを、バックグラウンド補正し、CT 値は、Rotor Gene Q ソフトウェアパッケージを介して生成した。全ての反応は三連で実施した。B2M、PP1B、および ACTB は、低変動性の参照転写物として増幅され、NORMA 遺伝子のデータ駆動標準化アルゴリズムを使用して、正規化を実施した¹⁻³。全ての表現値は、対照と比較して倍数の差として表した。

10

20

30

40

【表 2】

表 2 qRT-PCR に使用したプライマーおよびサーモサイクリング条件。

遺伝子	転写物 ¹	プライマー(5'~3') ²	生成物(Bp)
<i>ANTXR2</i>	NM_058172.5	FOR: GATCTCTACTTCGTCCTGGACA	90
	NM_001145794.1	REV: AAATCTCTCCGCAAGTTGCTG	
<i>STK3</i>	NM_006281.3	FOR: CGATGTTGGAATCCGACTTGG	105
	XM_011517258.1	REV: GTCTTTGACTTGTGGTGAGGTT	
	XM_011517255.1		
	XM_011517254.1		
	XM_011517253.1		
	XM_011517252.1		
	XM_011517251.1		
	XM_011517250.1		
	XM_011517249.1		
	XM_011517247.1		
<i>PK4</i>	NM_002612.3	FOR: GACCCAGTCACCAATCAAAATCT	82
		REV: GGTCATCAGCATCCGAGTAGA	
<i>CD163</i>	NM_004244.5	FOR: GCGGGAGAGTGGAAGTGAAAG	89
	XM_005253529.3	REV: GTTACAAATCACAGAGACCGCT	
	XM_005253528.3		
	NM_203416.3		
<i>MAL</i>	NM_002371.3	FOR: GCCCTCTTTTACCTCAGCG	95
	NM_022439.2	REV: GCAATGTTTTCATGGTAGTGCCT	
<i>GRAP</i>	NM_006613.3	FOR: AGCCCTTGCTCAAGTCACC	180
		REV: CGTAACTCCGTGGGAAGAAGC	
<i>ID3</i>	NM_002167.4	FOR: GAGAGGCACTCAGCTTAGCC	170
		REV: TCCTTTTGTGCTTGGAGATGAC	
<i>CTSZ</i>	NM_001336.3	FOR: CAGCGGATCTGCCCAAGAG	198
		REV: CGATGACGTTCTGCACGGA	
<i>PLXDC2</i>	NM_032812.8	FOR: ACTCAGATCGAGGAGGATACAGA	75
	XM_011519750.1	REV: CCGGCTGGCAGAATCAGATG	
<i>KIF1B</i>	NM_015074.3	FOR: AAACAAGGGTAATTTGCGTGTGC	78
	NM_183416.3	REV: GTAACCTGCCAAGTTGGACAGAT	
<i>PPIB</i>	NM_000942.4	FOR: AAGTCACCGTCAAGGTGTATTTT	153
		REV: TGCTGTTTTTGTAGCCAAATCCT	
<i>B2M</i>	NM_004048.2	FOR: GAGGCTATCCAGCGTACTCCA	248
	XM_006725182.2	REV: CGGCAGGCATACTCATCTTTT	
	XM_005254549.2		
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	FOR: CATGTACGTTGCTATCCAGGC	250
	XM_006715764.1	REV: CTCCTTAATGTCACGCACGAT	

¹NCBI 受託番号で列挙²全ての標的は、95°C(15 秒)/60°C(60 秒)の 40 サイクルで増幅した。

【 0 2 4 6 】

統計分析：

統計分析は、SPSS 統計ソフトウェアパッケージ (IBM, Chicago, IL) を使用して実施した。カイ二乗分析は、二分変数の比較に使用したが、スチューデント t 検定は連続変数の比較に使用した。複数の t 検定の場合、Benjamin Hochberg 較正を、5% の誤発見率カットオフを使用して p 値に適用した。有意水準は、全ての統計的試験について 0.05 で確立された。

10

20

30

40

50

【0247】

結果

発見コホート：

人口統計的および臨床的特徴に関して、A I S 患者は、神経学的無症候性対照より有意に高齢であり、高血圧および脂質異常症のような共存症の罹患率がより高かった（表3）。A I S 患者と対照の間の識別能力に基づいてGA / k N Nによるランク付けで上位50個の末梢血転写物を、図23Aに示しており、各転写物が近最適解の一部として選択された回数順に並べた。A I S 患者と対照の間の上位50の転写物の示唆的末梢血発現を、図23Bに示す。GA / k N Nによって識別された上位50個の転写物は、一個抜き交差検証において、k N Nを使用してA I S 患者と対照を区別する強力な能力を示した；ちょうど上位10個の転写物（A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、およびP L X D C 2）の組合せによって、発見コホートの対象の98.4%を、正確に97.4%の感度および100%の特異性で識別することができた（図24Aおよび図24B）。上位10個の転写物の組み合わせた識別力は、それらの発現レベルを個々の対象ごとにプロットしたときに明らかであった；発現の全体的パターンは、A I S 患者と対照の間で異なっていた（図25B、図25C、および図25D）。

10

【表3】

表3.発見コホートの臨床的特徴

	無症候性対照対脳卒中			
	対照(n=24)	脳卒中(n=39)	STAT (df)	p
年齢(平均±SD)	59.9 ± 9.7	73.1 ± 14.0	t= -4.40 (61)	0.000 *
男性 n (%)	9 (41.7)	17 (43.6)	$\chi^2= 0.12 (1)$	0.731
女性 n (%)	14 (58.3)	22 (56.4)	$\chi^2= 0.12 (1)$	0.731
NIHSS (平均±SD)	0 ± 0.0	5.3 ± 6.4	t= 5.17 (38)	0.000 *
脳卒中の家族歴 n (%)	4 (16.7)	15 (38.5)	$\chi^2= 7.02 (1)$	0.008 *
高血圧 n (%)	7 (29.2)	25 (64.1)	$\chi^2= 11.2 (1)$	0.001 *
脂質異常症 n (%)	0 (0.00)	18 (46.2)	$\chi^2= 15.5 (1)$	0.000 *
糖尿病 n (%)	2 (8.3)	11 (28.2)	$\chi^2= 3.58 (1)$	0.058
以前の脳卒中 n (%)	2 (8.30)	6 (15.4)	$\chi^2= 0.67 (1)$	0.414
心房細動 n (%)	0 (0.00)	6 (15.4)	$\chi^2= 4.08 (1)$	0.043
心筋梗塞 n (%)	0 (0.00)	6 (15.4)	$\chi^2= 4.08 (1)$	0.043
高血圧薬 n (%)	8 (33.3)	29 (74.4)	$\chi^2= 10.3 (1)$	0.001 *
糖尿病薬 n (%)	1 (4.20)	7 (17.9)	$\chi^2= 2.55 (1)$	0.111
コレステロール薬 n (%)	5 (20.8)	17 (43.6)	$\chi^2= 3.39 (1)$	0.066
抗凝固薬または抗血小板薬 n (%)	1 (4.20)	20 (51.3)	$\chi^2= 14.9 (1)$	0.000 *
rtPA n (%)	0 (0.00)	9 (23.1)	$\chi^2= 6.46 (1)$	0.011
現在喫煙者 n (%)	2 (8.30)	2 (5.13)	$\chi^2= 0.26 (1)$	0.612

20

30

40

【0248】

検証コホート：

発見コホートの場合と同様に、A I S 患者は神経学的無症候対照より有意に高齢であったが、A I S 患者および無症候対照は、併存疾患の有病率に関してより良好に一致した（表4）。A I S 患者はまた、疑似脳卒中よりも有意に高齢であったが、共罹患率の存在に関して疑似脳卒中と良好に一致していた（表4）。

50

【表 4】

表 4. 検証コホートの臨床特徴

	無症候性対照対脳卒中				疑似対脳卒中			
	対照 (n=30)	脳卒中 (n=39)	Stat (df)	p	疑似 (n=15)	脳卒中 (n=39)	Stat (df)	p
年齢(平均± SD)	51.5 ± 14.3	73.1 ± 13.3	t= - 6.41 (67)	0.000 *	60.2 ± 17.2	73.1 ± 13.3	t= -2.94 (52)	0.005 *
男性 n (%)	5 (16.7)	14 (35.9)	χ ² = 3.14 (1)	0.076	7 (46.7)	14 (35.9)	χ ² = 0.53 (1)	0.467
女性 n (%)	25 (83.3)	25 (64.1)	χ ² = 3.14 (1)	0.076	8 (53.3)	25 (64.1)	χ ² = 0.53 (1)	0.467
NIHSS (平 均± SD)	0.0 ± 0.0	8.6 ± 7.5	t= 7.16 (38)	0.000 *	5.0 ± 4.5	8.6 ± 7.5	t= -1.74 (52)	0.088
脳卒中の家 族歴 n (%)	16 (53.3)	15 (38.5)	χ ² = 1.52 (1)	0.213	4 (26.7)	15 (38.5)	χ ² = 0.66 (1)	0.416
高血圧 n (%)	17 (56.7)	32 (82.1)	χ ² = 5.31 (1)	0.021 *	13 (86.7)	32 (82.1)	χ ² = 0.16 (1)	0.684
脂質異常症 n (%)	11 (36.7)	16 (41.0)	χ ² = 0.14 (1)	0.713	10 (66.7)	16 (41.0)	χ ² = 2.85 (1)	0.091
糖尿病 n (%)	2 (6.70)	8 (20.5)	χ ² = 2.62 (1)	0.105	5 (33.3)	8 (20.5)	χ ² = 0.97 (1)	0.324
以前の脳卒 中 n (%)	1 (3.30)	7 (17.9)	χ ² = 3.53 (1)	0.061	4 (26.7)	7 (17.9)	χ ² = 0.51 (1)	0.476
心房細動 n (%)	0 (0.00)	13 (33.3)	χ ² = 12.3 (1)	0.000 *	3 (20.0)	13 (33.3)	χ ² = 0.92 (1)	0.337
心筋梗塞 n (%)	0 (0.00)	11 (28.2)	χ ² = 10.0 (1)	0.002 *	5 (33.3)	11 (28.2)	χ ² = 0.14 (1)	0.712
高血圧薬 n (%)	15 (50.0)	27 (69.2)	χ ² = 2.63 (1)	0.105	13 (86.7)	27 (69.2)	χ ² = 1.72 (1)	0.191
糖尿病薬 n (%)	2 (6.70)	8 (20.5)	χ ² = 2.62 (1)	0.105	5 (33.3)	8 (20.5)	χ ² = 0.97 (1)	0.323
コレステロー ル薬 n (%)	7 (23.3)	14 (35.9)	χ ² = 1.26 (1)	0.261	9 (60.0)	14 (35.9)	χ ² = 2.57 (1)	0.109
抗凝固薬ま たは抗血小 板薬 n (%)	1 (3.30)	23 (59.0)	χ ² = 23.1 (1)	0.000*	11 (73.3)	23 (59.0)	χ ² = 0.96 (1)	0.327
rtPA n (%)	0 (0.00)	13 (33.3)	χ ² = 12.3 (1)	0.000 *	0 (0.00)	13 (33.3)	χ ² = 6.59 (1)	0.011 *

10

20

30

40

【0249】

発見コホートにおける上位10個の転写物にわたって観察されたAIS患者と無症候性対照の間の示差的発現の全体的パターンはまた、検証コホートにおけるAIS患者と無症候性対照を比較したときに見られた(図25A)。上位10の転写物が、脳卒中患者と無症候性対照の間を、kNNを使用した発見コホートにおいて識別する強力な能力も検証コホートにおいて再現された; 組み合わせて使用された上位10個の転写物は、92.3%の感度および100%の特異性で、対象の95.6%を正確に識別することができた(図25B)。

【0250】

50

A I S 患者を疑似脳卒中と比較すると、上位 10 個のマーカーにわたって観察された示差的発現の全体的パターンは、A I S 患者を無症候対照と比較したときに観察されたものと同一であったが、発現レベル差の大きさは、いくつかの転写物の場合には小さかった（図 25 C）。この示差的発現の大きさの減少にもかかわらず、組み合わせて使用された上位 10 個のマーカーは、A I S 患者と疑似脳卒中を比較したときに、k N N を正確に使用して、高い割合の対象をまだ特定可能であり、96.3% の対象を、97.4% の特異性および 93.3% の感度で正確に特定した（図 25 D）。

【0251】

（実施例 12）

対象における虚血性脳卒中の予測

末梢血を対象から採取し、P A X g e n e R N A チューブ（Q i a g e n、V a l e n c i a、C A）を介して収集する。P r e A n a l y t i X P A X g e n e 血液 R N A キット（Q i a g e n）を介して総 R N A を抽出し、Q I A c u b e システム（Q i a g e n）を使用して自動化する。c D N A は、A p p l i e d B i o s y s t e m s の高容積逆転写キットを使用して精製 R N A から生成される。

【0252】

血液試料中の本明細書に記載のバイオマーカー、例えば A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、M A L、G R A P、I D 3、C T S Z、K I F 1 B、および P L X D C 2 などの発現レベルは、q P C R によって決定される。B 2 M、P P I B および A C T B 遺伝子発現は、内部対照として使用される。バイオマーカーの発現レベルは、参照と比較される。参照は、脳卒中のリスクがない 1 人または複数の健常者において評価されたバイオマーカーの発現レベルの平均値を有し得る。

【0253】

参照と比較して被験体で、評価されたバイオマーカー、例えば A N T X R 2、S T K 3、P D K 4、C D 1 6 3、C T S Z、K I F 1 B、および P L X D C 2 の発現が少なくとも 1 倍増加し、M A L、G R A P、および I D 3 の発現が、少なくとも 1 倍まで減少するとき、虚血性脳卒中が予測される。この予測は、98% を超える特異性および 98% を超える感度を有し得る。

【0254】

（実施例 13）

t P A 処置に対する虚血性脳卒中患者の応答の予測

発現レベルが t P A 処置に応答して変化するバイオマーカーは、例えば、実施例 11 に記載の G A / k N N 法を使用して識別される。t P A 処置に対する応答レベルと相関するバイオマーカーの発現レベルの参照範囲は、患者のバイオマーカーの発現レベルが参照範囲に入るときに、確立される。t P A 処置に対する患者の応答は、参照範囲と相関するレベルであると予測される。

【0255】

末梢血を患者から採取し、P A X g e n e R N A チューブ（Q i a g e n、V a l e n c i a、C A）を介して収集する。P r e A n a l y t i X P A X g e n e 血液 R N A キット（Q i a g e n）を介して総 R N A を抽出し、Q I A c u b e システム（Q i a g e n）を使用して自動化する。c D N A は、A p p l i e d B i o s y s t e m s の高容積逆転写キットを使用して精製 R N A から生成される。

【0256】

血液試料中で、上記で識別されたバイオマーカーの発現レベルは、q P C R によって決定される。B 2 M、P P I B および A C T B 遺伝子発現は、内部対照として使用される。バイオマーカーの発現レベルは、上記で確立された参照範囲と比較される。バイオマーカーの発現レベルが減少する範囲に基づいて、t P A 処置に対する患者の応答が予測される。

【0257】

（実施例 14）

10

20

30

40

50

虚血性脳卒中患者における脳卒中の重症度の特定

発現レベルが脳卒中重症度スケールと相関するバイオマーカーは、例えば、実施例 11 に記載の GA/kNN 法を使用して識別される。患者のバイオマーカーの発現レベルが、重症度レベルを示す範囲に入るとき、患者の脳卒中の重症度が識別されるように、異なるレベルの重症度についてのバイオマーカーの発現レベルの参照範囲を確立する。

【0258】

末梢血を患者から採取し、PAXgene RNA チューブ (Qiagen, Valencia, CA) を介して収集する。PreAnalytiX PAXgene 血液 RNA キット (Qiagen) を介して総 RNA を抽出し、QIACube システム (Qiagen) を使用して自動化する。cDNA は、Applied Biosystems の高容積逆転写キットを使用して精製 RNA から生成される。

10

【0259】

血液試料中で、上記で識別されたバイオマーカーの発現レベルは、qPCR によって決定される。B2M、PPIB および ACTB 遺伝子発現は、内部対照として使用される。バイオマーカーの発現レベルは、参照範囲と比較される。バイオマーカーの発現レベルが入る範囲に基づいて、患者の脳卒中の重症度が識別される。脳卒中の重症度は、(1) 脳卒中症状なし、(2) 軽度脳卒中、(3) 中等度脳卒中、(4) 中等度から重度の脳卒中、または (5) 重度脳卒中である。

【0260】

(実施例 15)

無細胞 DNA は、急性虚血性脳卒中患者の末梢循環において上昇し、先天性免疫系活性化に関連していた。

20

43 人の AIS 患者および 20 人の疑似脳卒中を募集した。救急部入院時に末梢血をサンプリングし、血漿 cfDNA レベルを qRT-PCR で評価した。末梢血好中球数を、末梢血自然免疫系状態の指標として使用し、梗塞容積および NIHSS を使用して傷害の重症度を評価した。AIS 患者と疑似脳卒中の間で cfDNA レベルを比較し、cfDNA レベル、傷害重症度、および好中球数の間の関係性を評価した。

【0261】

試料は、患者が、最後に脳卒中症状がないことが判明した時点で決定されるように、ED 入院時および発症の 24 時間以内に収集した。傷害の重症度は、採血時の NIH 脳卒中スケール (NIHSS) に従って決定した。人口統計学的情報は、訓練を受けた臨床医によって対象または重要な他者のいずれかから収集した。

30

【0262】

K2 EDTA バキューターを介して静脈血を収集した。血漿単離のために、EDTA 処理した血液を 2,000 g で 10 分間スピンドさせて血球を沈降させた。血漿を収集し、10,000 × g で 10 分間スピンドさせて、残留血液細胞または破片を除去した。試料を分析まで -80 で保存した。溶血試料を識別するために、血漿吸光度を分光光度法により 385 および 414 nm で測定し、これを使用して溶血スコア (HS) を計算した。音波処理された赤血球の連続希釈をスパイクとして加えた非溶血血漿を陽性対照として使用した。0.57 より大きい HS を有する血漿試料を、cfDNA 分析から除外した。

40

【0263】

QIAamp DNA マイクロキット (Qiagen, Valencia, CA) を使用して 200 μL の血漿から総 DNA を抽出し、QIACube システム (Qiagen) を使用して自動化した。精製された DNA は、35 μL 容積の超純粋 H₂O で溶出された。

【0264】

DNA 抽出効率の試料間変動を制御するために、DNA 抽出の前に、ポンテリナ・ブルマタ (ponteilina plumata) ゲノムの GFP コード部分に由来する非ヒト 605 bp DNA 断片 (GFP605) をスパイクとして血漿試料に加えた。この GFP605 スパイクイン対照は、配列特異的プライマーおよび精製された pGFP-V

50

- R S プラスミド (O r i g e n e) を鋳型として使用して P C R によって生成した (図 2 6 A) 。 G F P 6 0 5 P C R 産物を、アガロースゲルで電気泳動し、Q I A q u i c k ゲル抽出キット (Q i a g e n 、 図 2 6 B) を使用して精製した。G F P 6 0 5 の濃度および純度は、分光測定法を介して決定した。精製 G F P 6 0 5 を最終濃度 1 0 , 0 0 0 コピー / m L でスパイクとして血漿試料に加えた。血漿溶離液中の c f D N A レベルを、q P C R を介した単一コピー核ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (T E R T) 遺伝子の検出によって定量した。T E R T は、9 7 b p の断片の増幅によって検出された。G F P 6 0 5 のスパイクインは、正常化のために使用された 1 0 8 b p の内部断片 (G F P 1 0 8) の増幅を介して並行して検出された (図 2 6 C) 。標的配列を、5 μ L の溶出液から増幅し、R o t o r G e n e Q (Q i a g e n) 上の S Y B R グリーン (P o w e r S Y B R 、 T h e r m o - F i s h e r) を介して検出した。生の増幅プロットを、バックグラウンド補正し、C T 値を、R o t o r G e n e Q ソフトウェアパッケージを介して生成した。T E R T C T 値は、G F P 1 0 8 C T 値を介して正規化し、T E R T レベルは、 $2^{-C T}$ 法を使用して群間を比較した。全ての反応は三連で実施し、単一 P C R 産物の存在を、融解曲線分析で確認した。実験によって、G F P 6 0 5 スパイクインの存在が T E R T 検出を妨害しないこと、および G F P スパイクインが全ヒト D N A の存在下で検出可能であることが確認された (図 2 6 D) 。

10

【 0 2 6 5 】

神経放射線画像法は、発症 2 4 時間以内に M R I または C T のいずれかを使用して行った。B r a i n l a b i P l a n ソフトウェアパッケージを使用して、手動追跡によって梗塞容積を計算し、全ての梗塞容積計算は、神経放射線学者が検証した。

20

【 0 2 6 6 】

標準的な臨床自動化血液学系を使用して好中球数を評価した。

【 0 2 6 7 】

全ての統計は、G r a p h P a d P r i s m 統計ソフトウェアパッケージを使用して実施した。二分変数の群間比較にはカイ二乗分析を使用し、連続変数の群間比較にはシュューデント t 検定を使用した。スピアマンのロー (r h o) を使用して、観察された相関関係の強度を試験した。バイナリ分類器の性能を試験するために R O C 分析を使用した。最適カットオフ値は、最高レベルの組合せ感度および特異性を生じたカットオフによって決定し、9 5 % 信頼区間 (0 . 9 5 C I) を算出した。有意水準は、全ての統計的試験

30

【 0 2 6 8 】

結果：

A I S 患者は、疑似脳卒中よりも高齢であったが、心血管疾患リスク因子および併存疾患に関して群は良好に一致した (図 2 7) 。発症から全対象の血液採取までの中央時間は 6 . 7 時間であった。

【 0 2 6 9 】

A I S 患者は、T E R T を標的とする q P C R によって測定されるように、疑似脳卒中よりも c f D N A の 3 倍近く高い循環レベルを示した (図 2 8 A) 。c f D N A レベルが、A I S 患者と疑似脳卒中の間を識別する能力を試験するための R O C 分析によって、0 . 8 6 という曲線下面積が得られ、c f D N A レベルが診断的に有用であることが示唆された。最適なカットオフでは、c f D N A レベルは A I S について 8 6 % (0 . 9 5 C I = 7 2 ~ 9 5 %) の感度および 7 5 % (0 . 9 5 C I = 5 1 ~ 9 1 %) 特異的であった (図 2 8 B) 。

40

【 0 2 7 0 】

循環 c f D N A レベルは A I S 患者において高いだけでなく、傷害の重症度とも正に相関した。循環 c f D N A レベルは、N I H S S と弱い正の相関を示したが (図 2 9 A) 、梗塞容積と有意な正の相関を示した (図 2 9 B) 。

【 0 2 7 1 】

循環 c f D N A レベルは、好中球数と正に相関した：

50

循環 c f D N A レベルも、A I S 患者の脳卒中後好中球数と正に相関し、それによって c f D N A レベルが先天性免疫系の脳卒中後の活性化に寄与し得ることが示唆されている (図 3 0) 。

【 0 2 7 2 】

本明細書に記載の一部の実施形態が本明細書に示され説明されたが、そのような実施形態は単なる例示として提供される。多くの変形、変更、および置換が、本明細書で提供される開示から逸脱することなく、当業者に思い浮かぶであろう。本明細書に記載の実施形態に対する様々な代替物を、本明細書に記載の方法を実施する際に用いることができることを理解すべきである。

【 図 1 A B 】

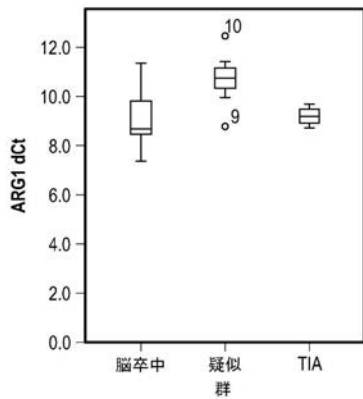


FIG. 1A

【 図 1 C D 】

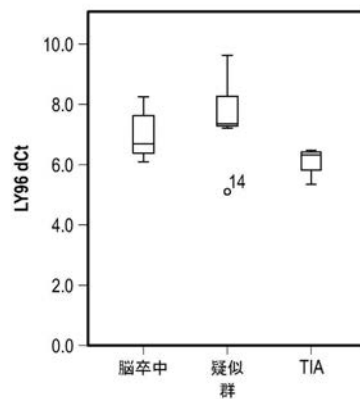


FIG. 1C

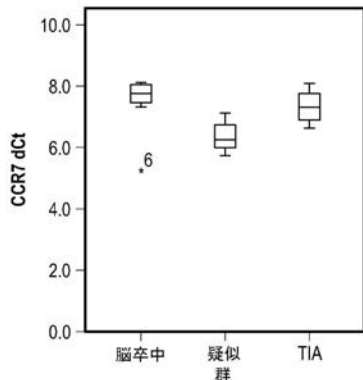


FIG. 1B

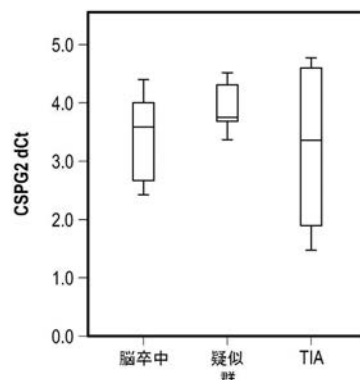


FIG. 1D

【 图 2 A B 】

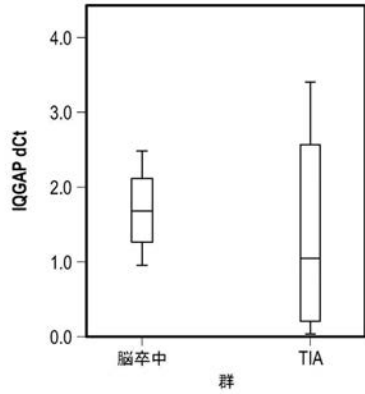


FIG. 2A

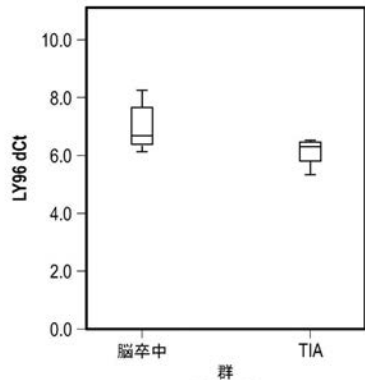


FIG. 2B

【 图 2 C D 】

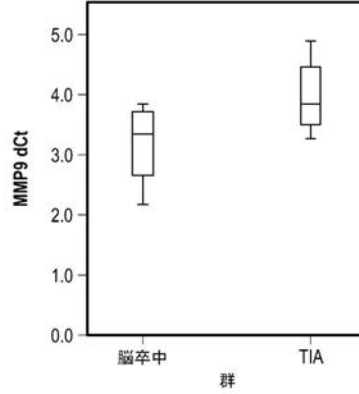


FIG. 2C

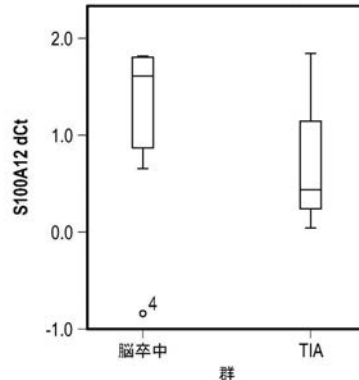


FIG. 2D

【 图 3 】

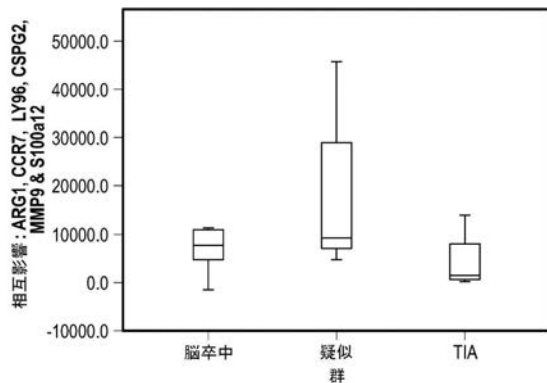


FIG. 3

【 图 4 】

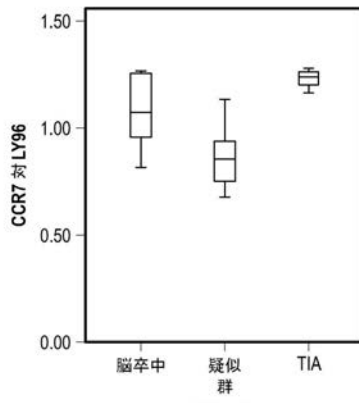


FIG. 4A

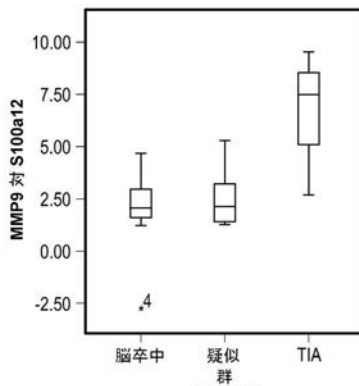


FIG. 4B

【 図 5 】

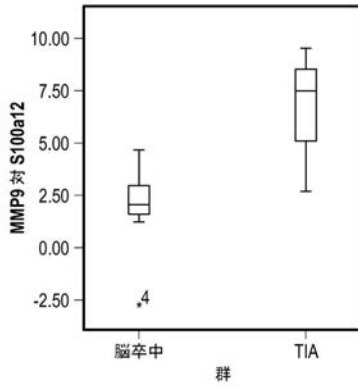


FIG. 5A

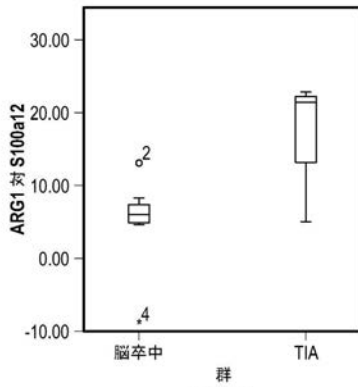


FIG. 5B

【 図 6 A B 】

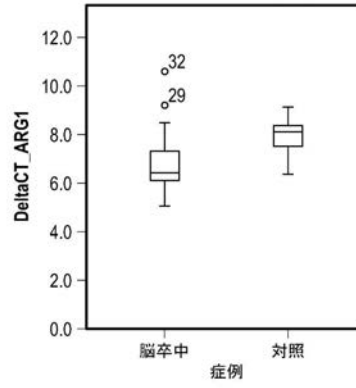


FIG. 6A

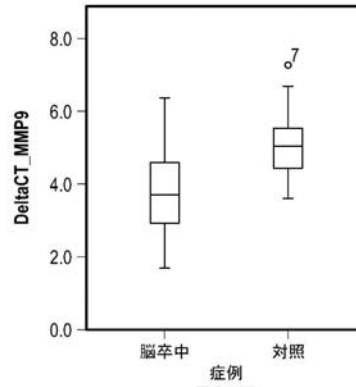


FIG. 6B

【 図 6 C D 】

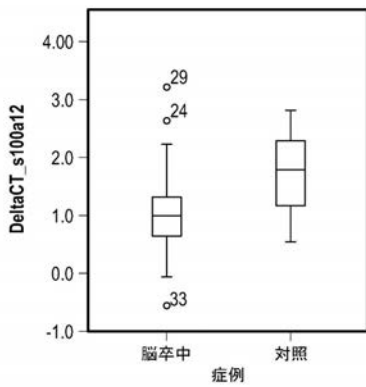


FIG. 6C

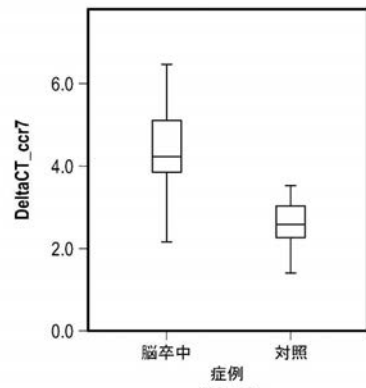


FIG. 6D

【 図 7 】

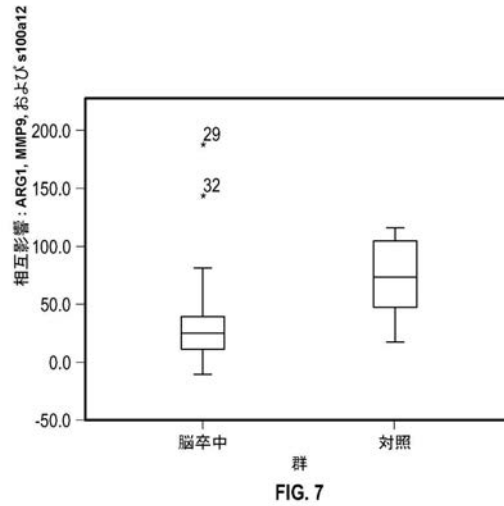


FIG. 7

【 図 8 】

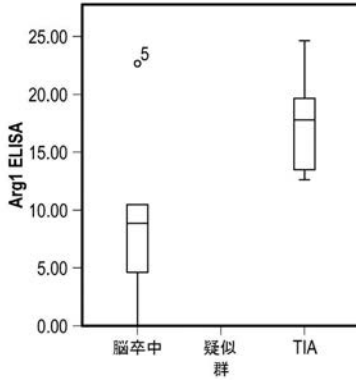


FIG. 8A

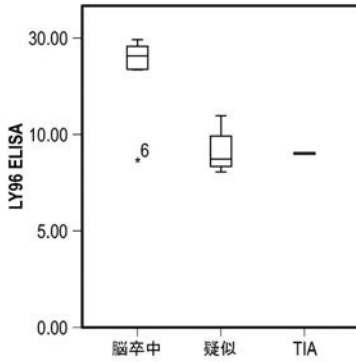


FIG. 8B

【 図 9 】

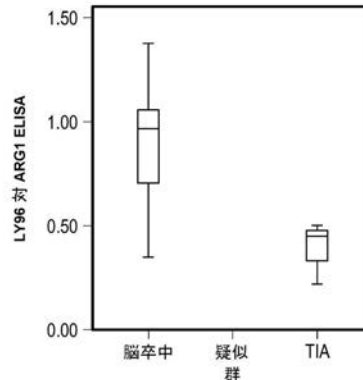


FIG. 9A

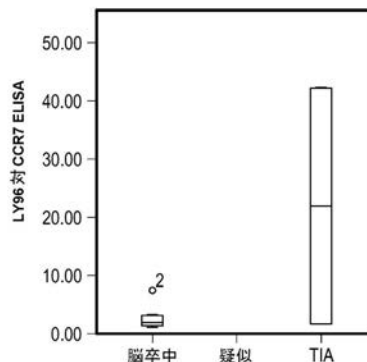


FIG. 9B

【 図 10 A 】

タンパク質(遺伝子):	倍数	統計的有意性 (P-value)
アファミン(AFM)	2.1	**
インター-アルファトリプシン阻害剤重鎖H3 (ITH3)	7.5	**
アルファ-1B糖タンパク質 (A1BG)	3.1	**
カリスタチン (SERPINA4)	14.5	**
コリンエステラーゼ (BCE)	15.0	**
プラスミノーゲン (PLG)	3.2	**
IGF結合性タンパク質複合体不安定性サブユニット (IGFALS)	40.5	**
補体成分C8ガンマ鎖 (C8G)	4.3	**
フィブリノーゲンベータ鎖 (FGB)	2.3	**
フィコリン-3 (FCN3)	11.3	**
アポリipoprotein A-II (APOA2)	1.7	**
補体因子H (CFH)	2.6	**
N-アセチルムラモール-L-アラニンアミダーゼ (PGLYRP2)	8.4	**
HCG1745306 (HBA2)	-5.6	**
タイチン (TTN)	-2.4	**
アルファ-2-マクロglobulin (A2M)	1.3	**
フィブリノーゲンガンマ鎖 (FGG)	2.3	**
テトラネクチン (CLEC3B)	22.5	**
カルボキシペプチダーゼN触媒鎖 (CPN1)	7.1	**
ヒスタジリンリッチ糖タンパク質 (HRG)	1.5	**
フィブリノーゲンアルファ鎖 (FGA)	2.1	**
アポリipoprotein C-II (APOC2)	4.0	*
IGカプタン鎖 (IGKC)	1.4	*
プロトドヘリンFAT2 (FAT2)	-9.3	*
補体因子H関連タンパク質1 (CFHR1)	6.1	*
FRAS1関連細胞外マトリックスプロテイン2 (CFHR1)	-16.0	*
血清バラオキシナーゼアルフェラーゼ1 (IPON1)	2.6	*
単球分化抗原CD14 (CD14)	16.5	*
微小管アクチン架橋因子1 (IMACF1)	-3.7	*
血清アミロイドタンパク質 (SAA1)	6.8	*
凝固因子XIII鎖 (F13B)	2.7	*
推定Gプロテイン結合受容体179 (GPR179)	-19.3	*
290KDAの中心体タンパク質 (CEP280)	-10.7	*
SCO-スポンジ (SSPO)	-5.3	*
キネシン様タンパク質KIF15 (KIF15)	-11.3	*
細胞質分裂タンパク質9のデイクレーター (DOCK9)	-3.3	*
免疫グロブリンラムダ様ホリペプチド5 (IGLL5)	1.4	*
ムチン-16 (MUC16)	-3.2	*
アポリipoprotein A-IV (APOA4)	1.6	*
インボチン-8 (IP08)	-4.0	*
スペクトリンアルファ (SPTA1)	-27.3	*
鎌状赤血球タンパク質ホログ (KIAA1217)	6.5	*
ベータ-2-糖タンパク質1 (APOH)	3.0	*
IGカプタン鎖 (IGHG1)	1.4	*
細胞質分裂タンパク質10のデイクレーター (DOCK10)	4.0	*
妊娠性血管タンパク質 (PZP)	4.7	*
ラミニンサブユニットアルファ5 (LAMA5)	-5.3	*
CD5抗原様 (CD5L)	3.7	*
微小管関連タンパク質1B (MAP1B)	-8.0	*
リソソーム輸送調節因子 (LYST)	-11.3	*
トランスサイレチン (TTR)	1.6	*

FIG. 10A

【 図 10 B 】



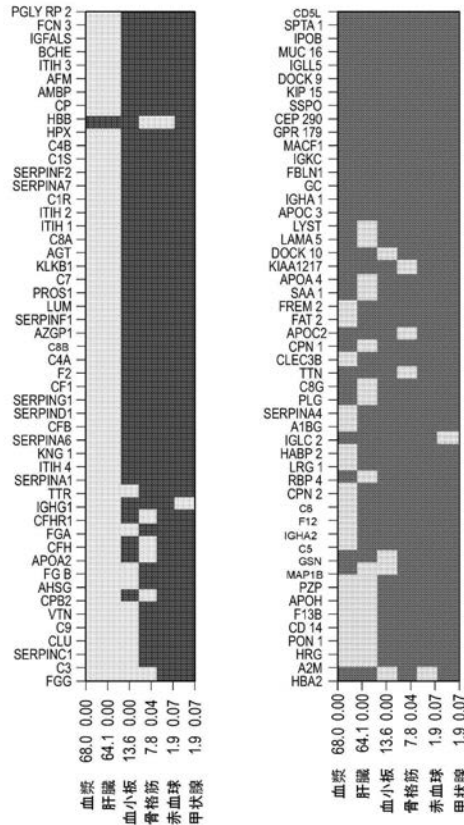
FIG. 10B

【図 10C】

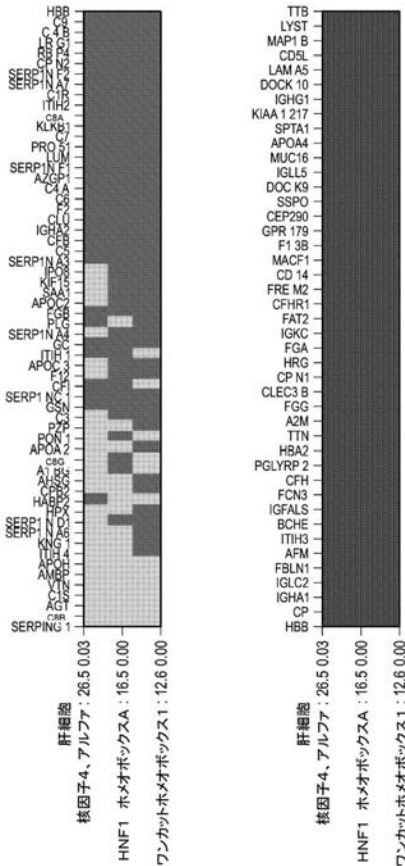


FIG. 10C

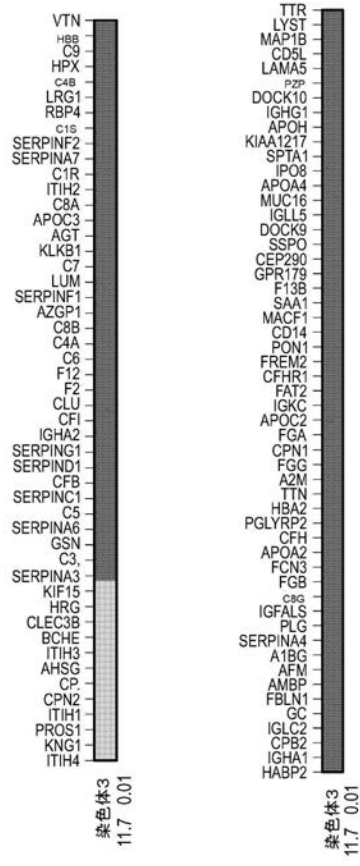
【図 10D】



【図 10E】



【図 10F】



【 図 1 0 G 】

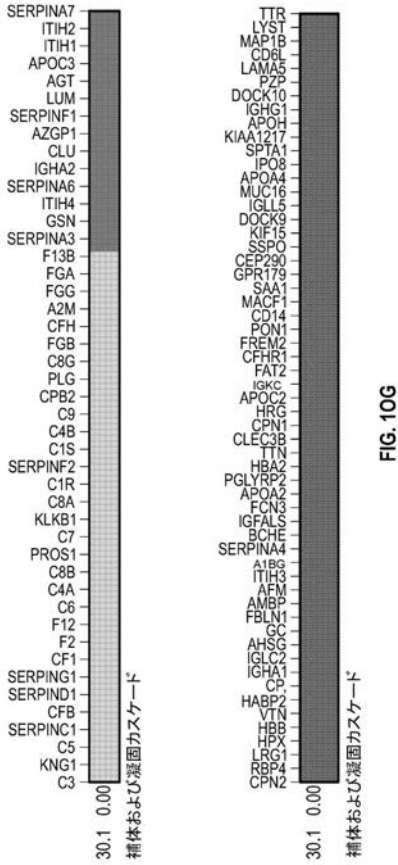


FIG. 10G

【 図 1 0 H 】

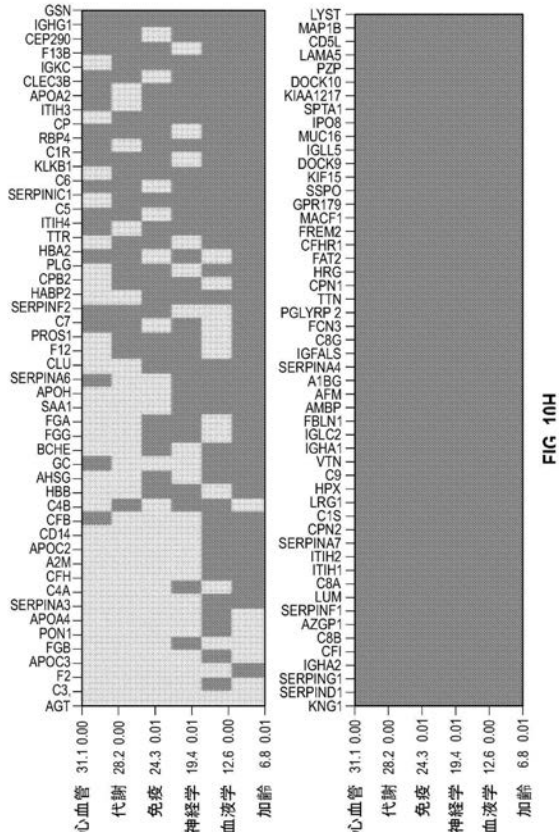


FIG. 10H

【 図 1 1 A B 】

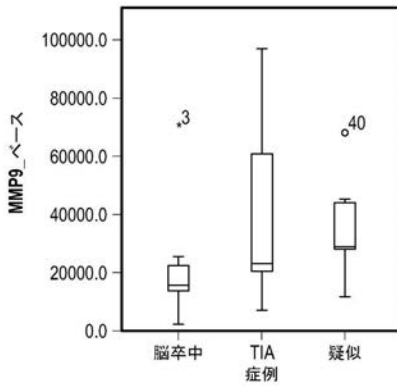


FIG. 11A

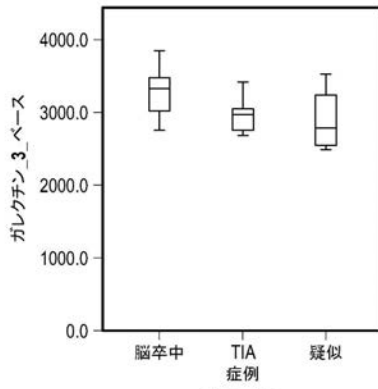


FIG. 11B

【 図 1 1 C D 】

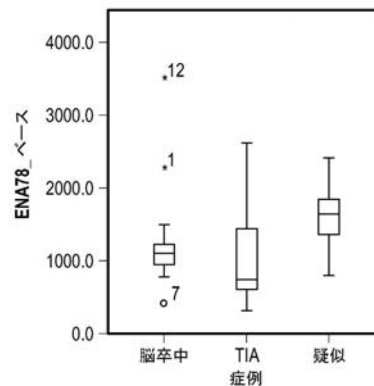


FIG. 11C

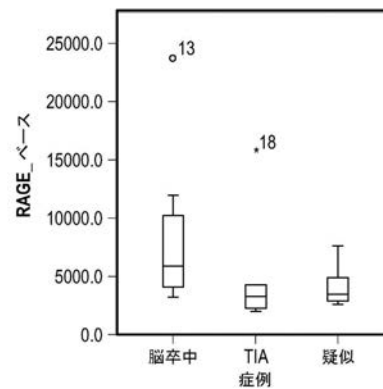
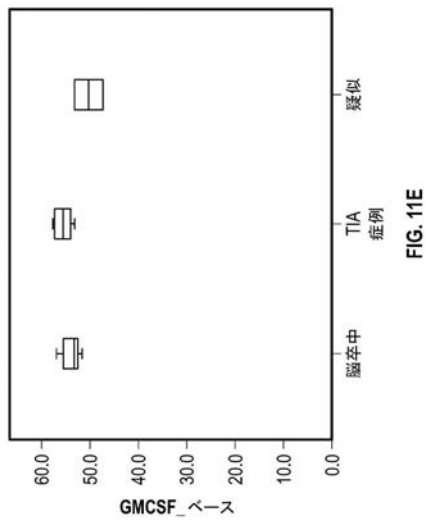
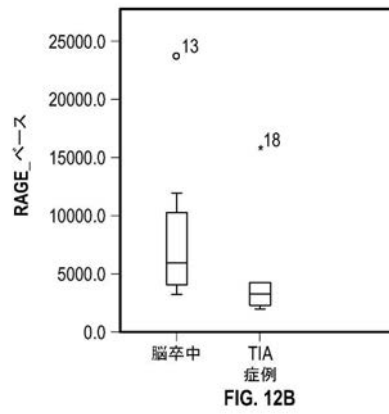
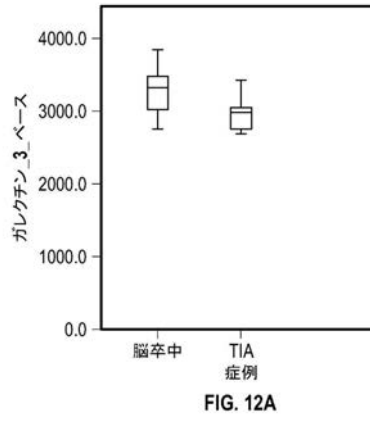


FIG. 11D

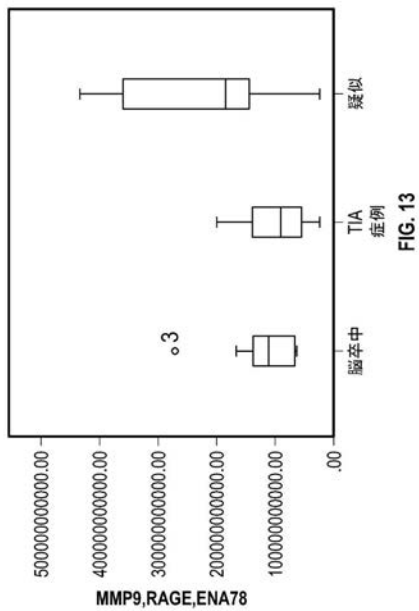
【 図 1 1 E 】



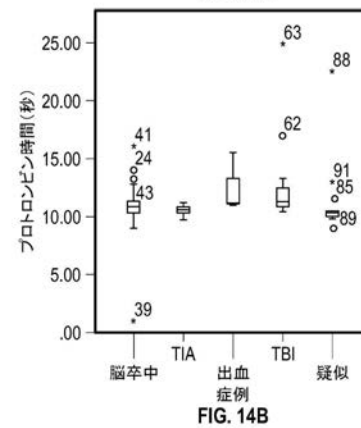
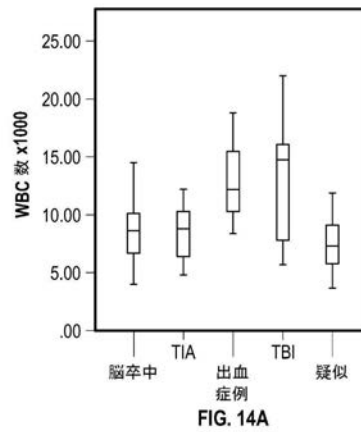
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 A B 】



【 図 1 4 C D 】

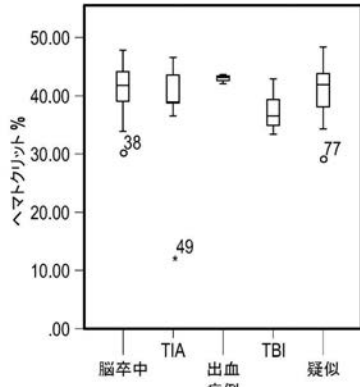


FIG. 14C

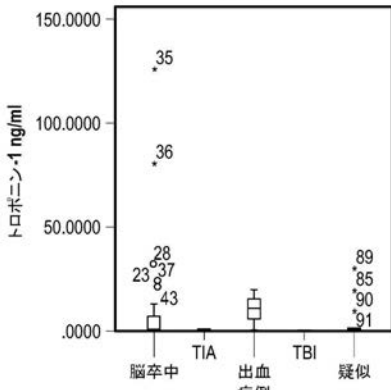


FIG. 14D

【 図 1 5 】

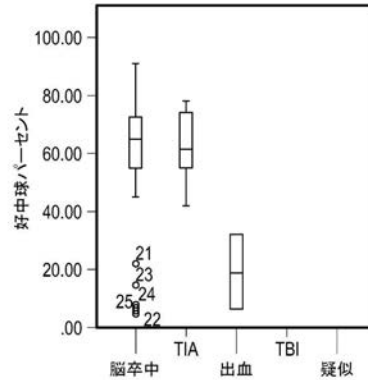


FIG. 15A

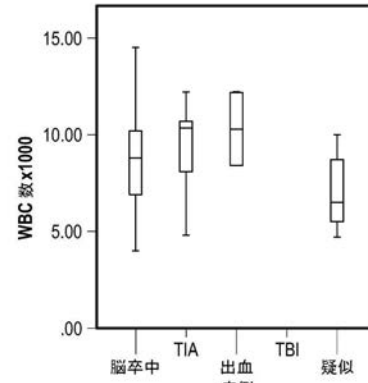


FIG. 15B

【 図 1 6 】

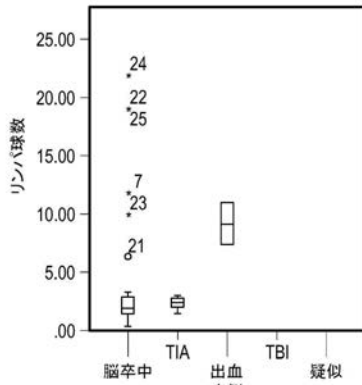


FIG. 16A

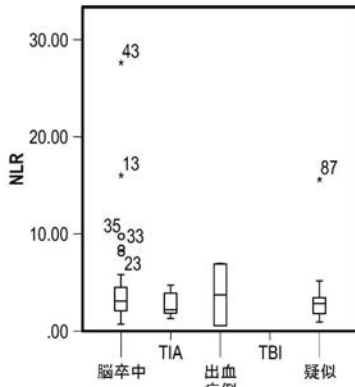


FIG. 16B

【 図 1 7 A B 】

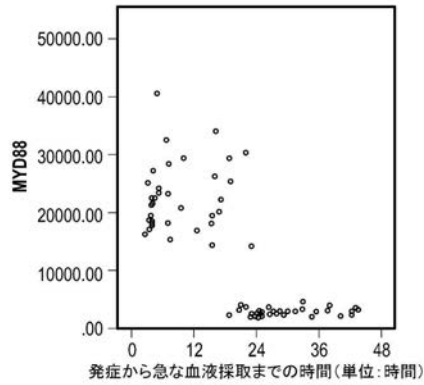


FIG. 17A

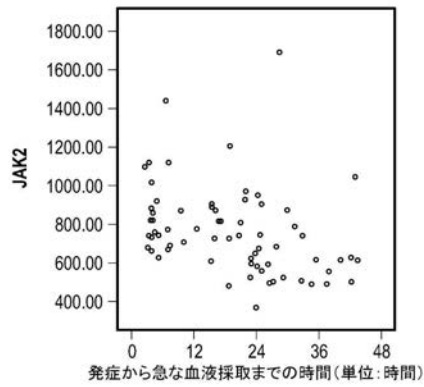


FIG. 17B

【 図 1 7 C D 】

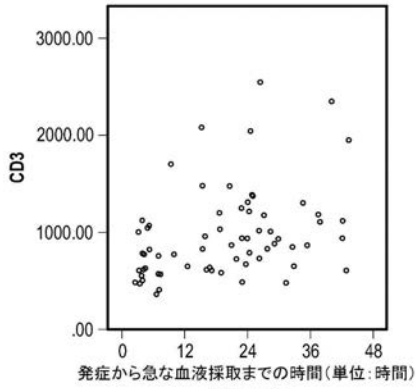


FIG. 17C

【 図 1 7 E F 】

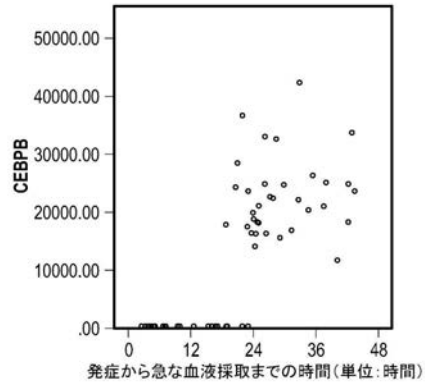


FIG. 17E

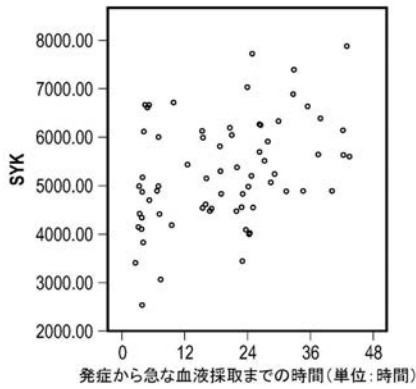


FIG. 17D

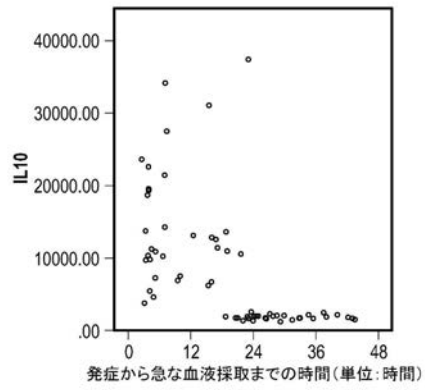


FIG. 17F

【 図 1 7 G H 】

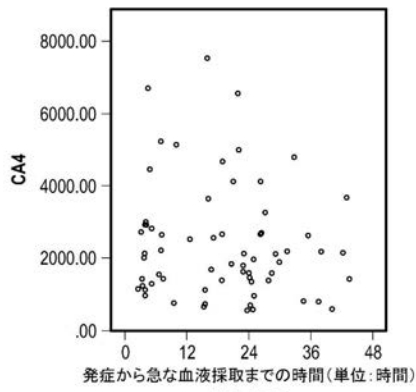


FIG. 17G

【 図 1 8 】

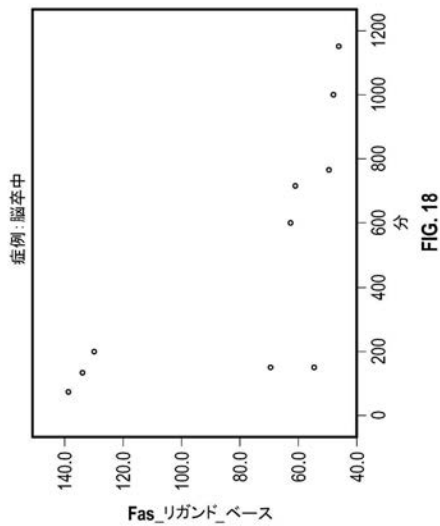


FIG. 18

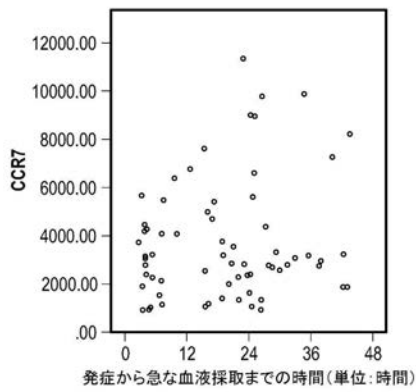
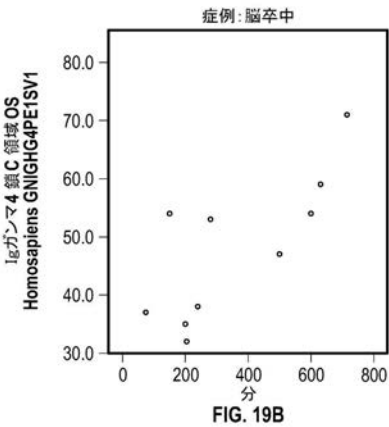
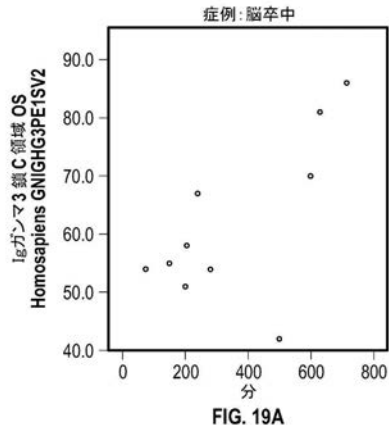
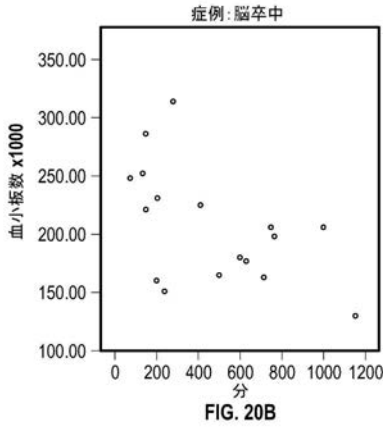
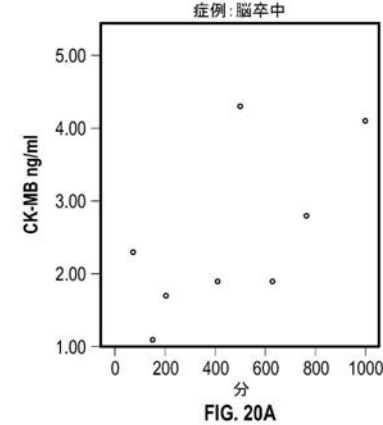


FIG. 17H

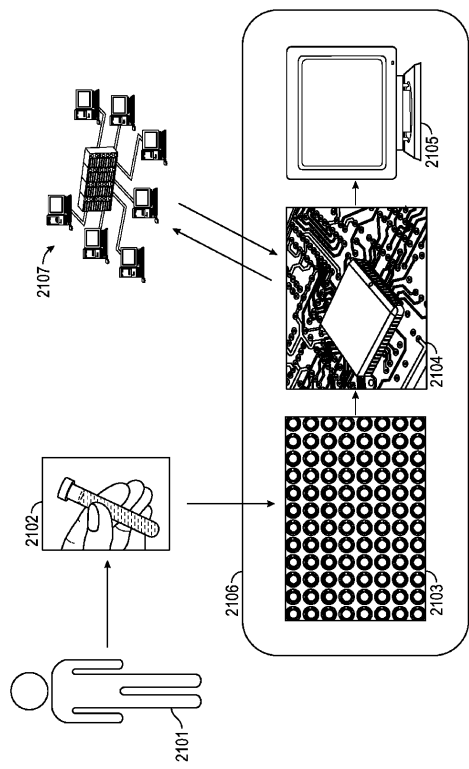
【 図 1 9 】



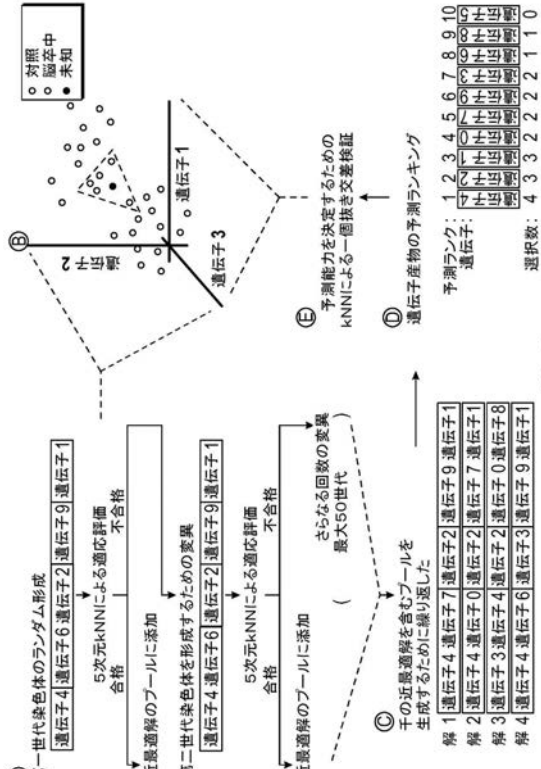
【 図 2 0 】



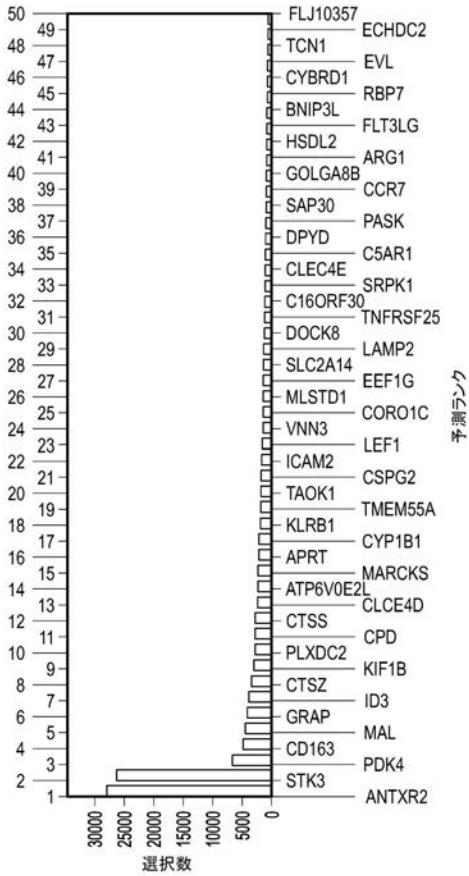
【 図 2 1 】



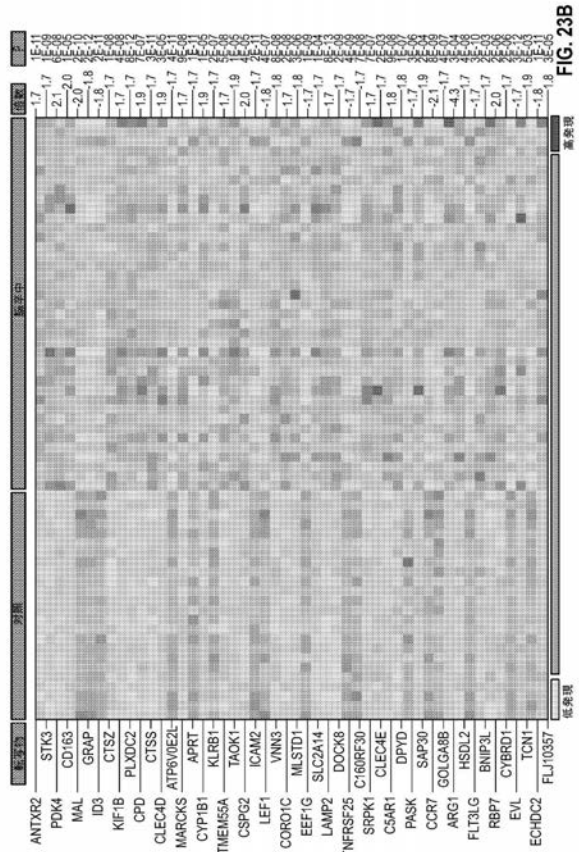
【 図 2 2 】



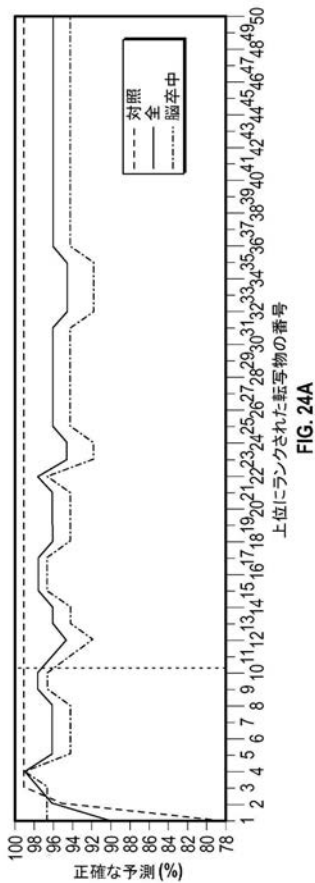
【 図 2 3 A 】



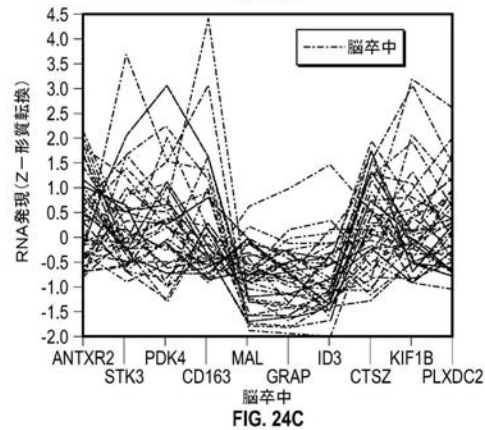
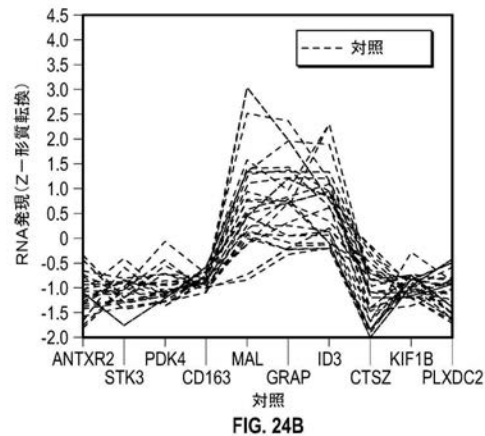
【 図 2 3 B 】



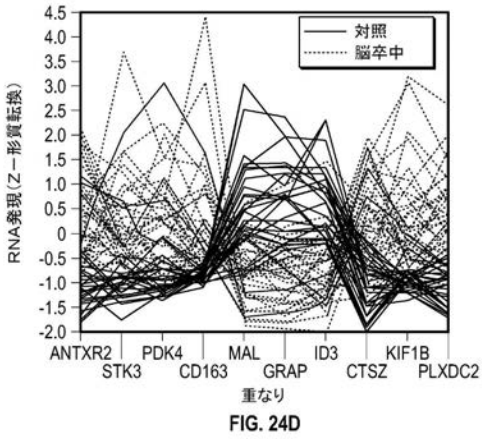
【 図 2 4 A 】



【 図 2 4 B C 】



【 図 2 4 D 】



【 図 2 5 A 】

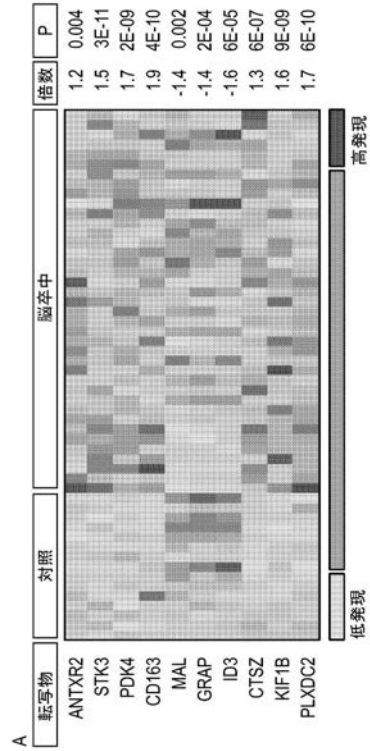
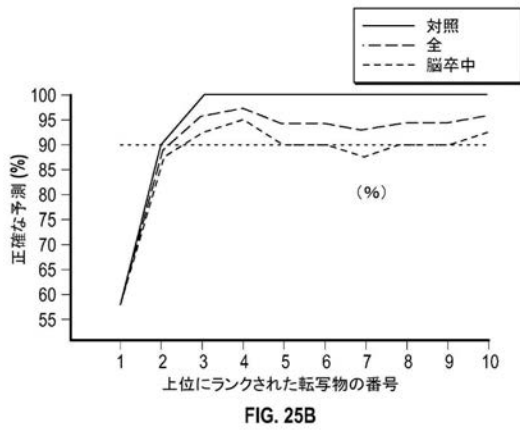


FIG. 25A

【 図 2 5 B 】



【 図 2 5 C 】

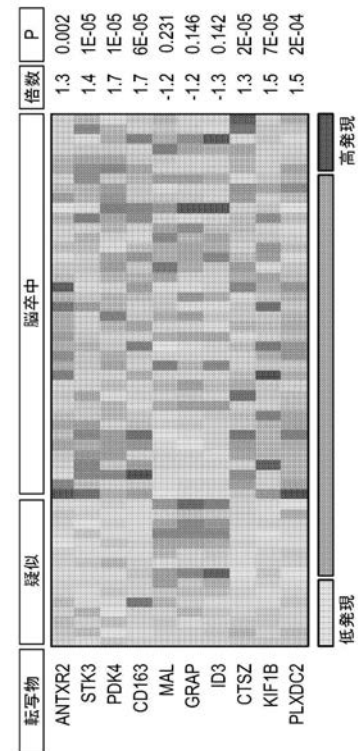


FIG. 25C

【 図 2 5 D 】

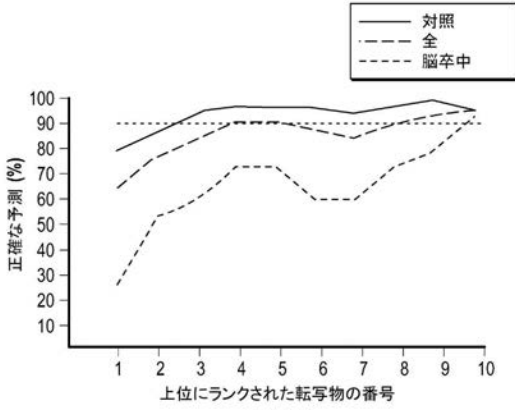
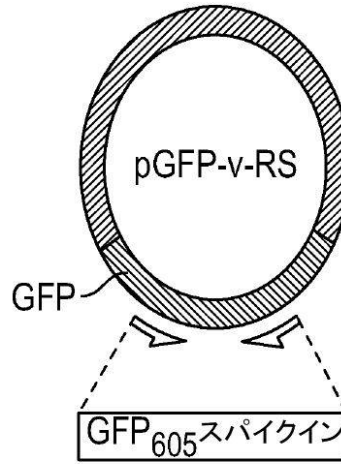


FIG. 25D

【 図 2 6 A 】



GFP₆₀₅ (605 bp)

FOR 5' GTTGCTGTGATCCTCCTCCA

REV 5' CCGCCATGGAGATCGAGTG

FIG. 26A

【 図 2 6 B C D 】

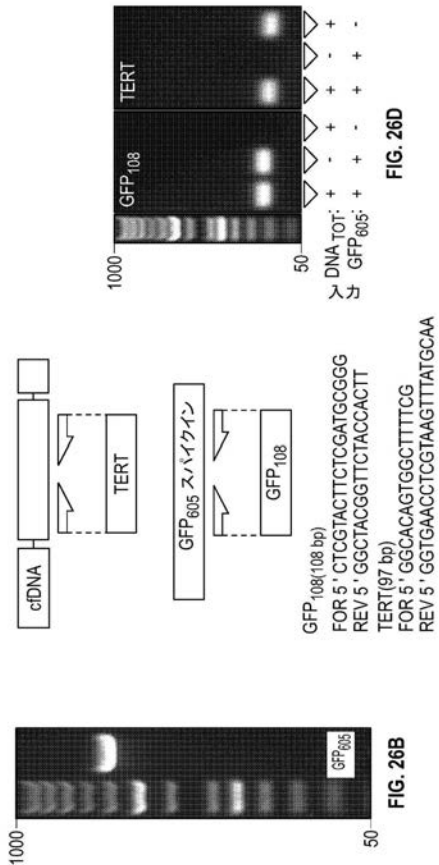


FIG. 26B

FIG. 26C

FIG. 26D

【 図 2 7 】

	疑似 (n=20)	脳卒中 (n=43)	STAT (df)	P
年齢 (平均 ± SD)	58.0 ± 17.0	72.5 ± 15.5	t = -3.35 (6)	0.001*
男性 n (%)	11 (55.0)	18 (41.9)	χ ² = 0.95 (1)	0.330
女性 n (%)	9 (55.0)	22 (58.1)	χ ² = 0.95 (1)	0.330
NHSS (平均 ± SD)	4.7 ± 4.9	8.8 ± 7.2	t = -2.30 (6)	0.024*
脳卒中の家族歴 n (%)	5 (25.0)	15 (34.9)	χ ² = 0.61 (1)	0.432
高血圧 n (%)	17 (85.0)	34 (79.1)	χ ² = 0.31 (1)	0.576
脂質異常症 n (%)	13 (65.0)	21 (48.8)	χ ² = 1.43 (1)	0.230
糖尿病 n (%)	7 (35.0)	8 (18.6)	χ ² = 2.02 (1)	0.155
以前の脳卒中 n (%)	5 (25.0)	10 (23.3)	χ ² = 0.02 (1)	0.879
心房細動 n (%)	3 (15.0)	13 (30.2)	χ ² = 1.67 (1)	0.196
心筋梗塞 n (%)	6 (30.0)	10 (23.3)	χ ² = 0.32 (1)	0.567
高血圧薬 n (%)	16 (80.0)	28 (65.1)	χ ² = 1.43 (1)	0.230
糖尿病薬 n (%)	6 (30.0)	8 (18.6)	χ ² = 1.02 (1)	0.311
コレステロール薬 n (%)	12 (60.0)	16 (37.2)	χ ² = 2.87 (1)	0.090
抗凝固薬または抗血小板薬 n (%)	12 (60.0)	25 (58.1)	χ ² = 0.01 (1)	0.889
rPAn n (%)	0 (0.00)	14 (32.6)	χ ² = 8.37 (1)	0.003*
現在喫煙者 n (%)	2 (10.0)	11 (25.6)	χ ² = 2.02 (1)	0.155

FIG. 27

【 図 2 8 】

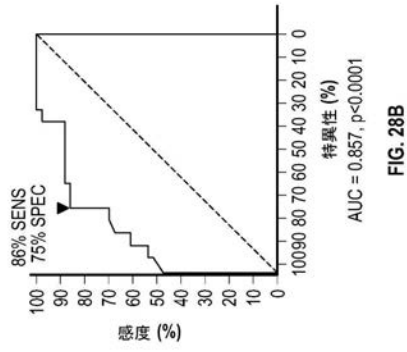


FIG. 28B

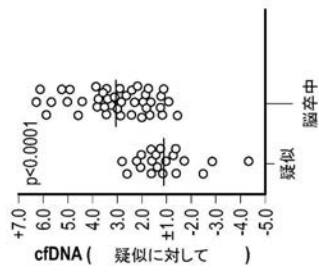


FIG. 28A

【 図 2 9 】

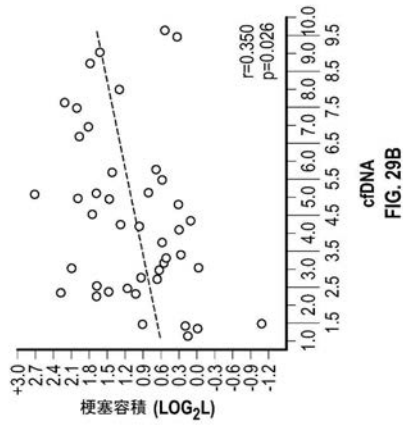


FIG. 29B

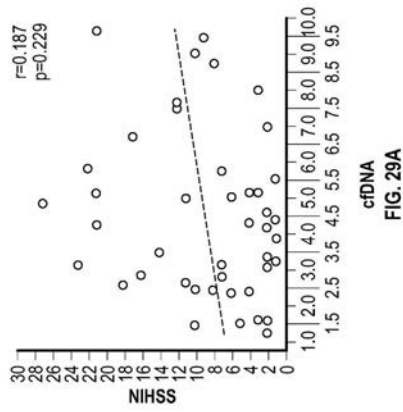


FIG. 29A

【 図 3 0 】

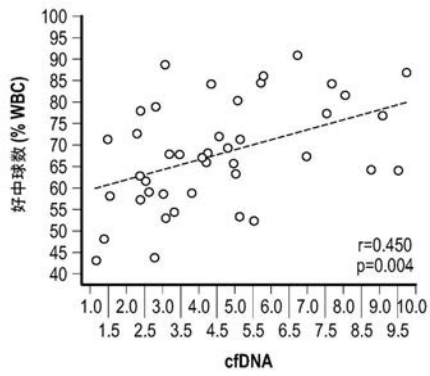


FIG. 30

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月26日(2018.6.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2018523469000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年6月27日(2018.6.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2018523469000001.app

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図26BCD

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 図 2 6 B C D 】

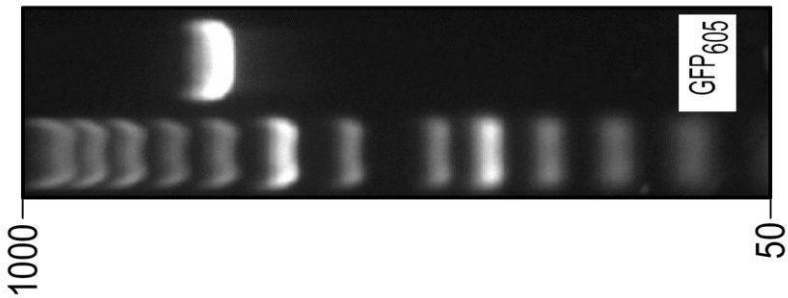
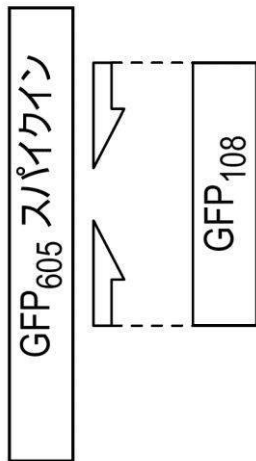
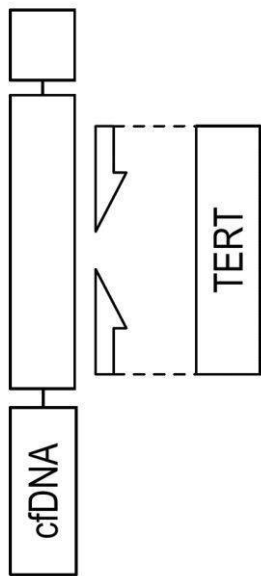


FIG. 26B



GFP₁₀₈(108 bp)
 FOR 5' CTCGTACTTCTCGATGCGGG
 REV 5' GGCTACGGCTTCTACCACTT
 TERT(97 bp)
 FOR 5' GGCACACGTGGCTTTTCG
 REV 5' GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA

FIG. 26C

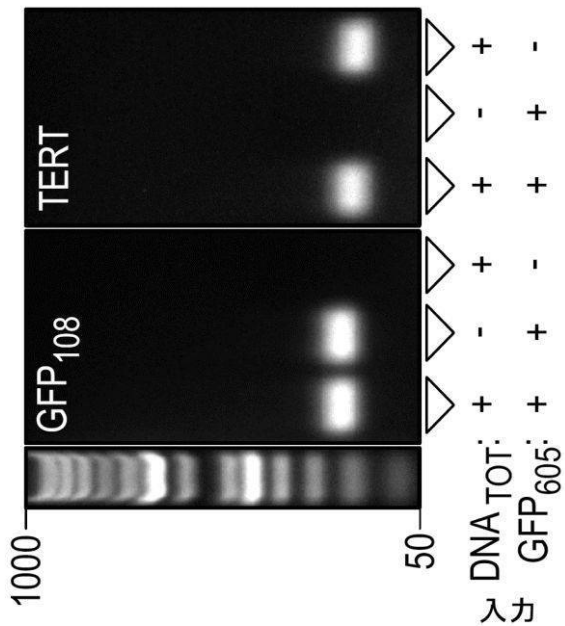


FIG. 26D

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/41585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - C40B 30/04; C12Q 1/68; G01N 33/50 (2016.01) CPC - C40B 30/04; C12Q 1/68; 1/6837; G01N 33/50 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(B) Classifications: C40B 30/04; C12Q 1/68; A61B 5/00; G01N 33/50, 33/53, 33/536, 33/566 (2016.01) CPC Classifications: C40B 30/04; C12Q 1/68, 1/6811, 1/6837; A61B 5/00; G01N 33/50, 33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatSeer (US, EP, WO, JP, DE, GB, CN, FR, KR, ES, AU, IN, CA, INPADOC Data); Google; Google Scholar; PubMed; EBSCO; cell*, free*, nucle*, acid*, DNA, RNA, marker*, biomark*, strok*, sampl*, blood*, urin*, referenc*, control*, mimic*, ischemic*, epigenetic*, ratio*, subgroup*, comput*, acetyl*, methyl*, ubiquitylat*, phosphorylat*, sumoylat*, ribosylat*, citrullinat*, kit*, prob*, reagent*, detect*		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/0189243 A1 (BARR, TL et al.) 25 July 2013; abstract; paragraphs [0030], [0033], [0038]-[0041], [0044]-[0047], [0051], [0052], [0081] [0138]-[0139], [0155], [0199], [0200], [0211]-[0213], [0252], [0298], [0306]; claim 16.	1-5, 7/5, 8/7/5, 9/1-4, 13/3-4, 13/8/7/5, 32, 34-36, 63/4, 77/1-4
A	US 2011/0294690 A1 (MONTANER VILALLONGA, J) 1 December 2011; paragraphs [0003], [0025], [0028], [0191].	6, 7/6, 8/7/6, 13/8/7/6, 16, 29, 33
A	US 2012/0135874 A1 (WANG, JTH et al.) 31 May 2012; abstract; paragraphs [0038], [0112], [0114]-[0117], [0125], [0143].	6, 7/6, 8/7/6, 13/8/7/6, 16, 29, 33
A	WO 2014/201516 A2 (IMMUNEXPRESS PTY LTD) 24 December 2014; paragraphs [0002], [0038], [0040], [0041].	6, 7/6, 8/7/6, 13/8/7/6, 16, 29, 33
<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		Date of mailing of the international search report
03 November 2016 (03.11.2016)		29 NOV 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Shane Thomas PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US16/41585

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. 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. Claims Nos.: 10-12, 14, 15, 17-28, 30, 31, 41-52, 58-62, 64-76, 104, 105, 134, 135
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

-***Please See Supplemental Page-***

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. 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. 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.:
1-9, 13, 16, 29, 32-36, 63 (in-part), 77 (in-part)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/US16/41585

***-Continued from Box No. 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 1-9, 13, 16, 29, 32-36, 63 (in-part), 77 (in-part) are directed toward methods comprising measuring a level of cell-free nucleic acids in a sample, optionally carrying an epigenetic marker; and kits therefor.

Group II, Claims 37-40, 53-57, 63 (in-part), 77 (in-part) and 78-88 are directed toward measuring expression of a group of biomarkers in a sample, wherein the group of biomarkers comprises two or more of: i. an anthrax toxin receptor, ii. a serine/threonine-protein kinase, iii. a pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase, and iv. a cluster of differentiation family member; and kits therefor.

Group III, Claims 89-95, 106 (in-part), 107 (in-part), 108 (in-part), 109 (in-part), 110 (in-part), 111-118, 119 (in-part), 120 (in-part), 121 (in-part), 122 (in-part), 123 (in-part), 124 (in-part), 125 (in-part) and 126-133 are directed toward a method of detecting ischemic stroke in a subject, comprising a. measuring a profile of polynucleotides in a first ischemic stroke sample; and b. measuring a profile of polypeptides in a second ischemic stroke sample; and kits therefor.

Group IV, Claims 96-103, 106 (in-part), 107 (in-part), 108 (in-part), 109 (in-part), 110 (in-part), 119 (in-part), 120 (in-part), 121 (in-part), 122 (in-part), 123 (in-part), 124 (in-part) and 125 (in-part) are directed toward a method of detecting ischemic stroke in a subject, comprising measuring a profile of blood cells in a sample from the subject.

The inventions listed as Groups I-IV 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: the special technical features of Group I include cell free nucleic acids, not present in any other Group; the special technical features of Group II include anthrax toxin receptor 2, not present in any other Group; the special technical features of Group III include measuring a profile of a second class of biomolecules that is different from a first class of biomolecules, not present in any other Group; the special technical features of Group IV include a profile of blood cells, not present in any other Group.

Groups I-IV share the technical features including: detecting or assessing ischemic stroke in a subject; a sample from a subject; measuring; at least one marker; and analyzing with a computer system. Groups I-III share the technical features including: a kit for detecting or assessing ischemic stroke in a subject, the kit comprising a probe for measuring. Groups I and II share the technical features including: a detecting reagent for examining binding of the probes with targets; wherein assessing has a sensitivity of at least 80% and a specificity of at least 75%; comparing to a reference; a non-ischemic stroke subject; a stroke mimic subject. Groups I and III share the technical features including: a nucleic acid. Groups II-IV share the technical features including: a group of biomarkers. Groups II and III share the technical features including: a panel of probes.

However, these shared technical features are previously disclosed by US 2013/0189243 A1 to Barr et al. (hereinafter 'Barr').

Barr discloses detecting or assessing ischemic stroke in a subject (detecting or assessing ischemic stroke in a subject; abstract; paragraphs [0026], [0035]); a sample from a subject (a sample from a subject; paragraph [0032], [0035]); measuring; at least one marker (measuring; at least one marker; paragraphs [0032], [0035]); analyzing with a computer system (analyzing with a computer system; paragraph [0240]); a kit for detecting or assessing ischemic stroke in a subject (a kit for detecting or assessing ischemic stroke in a subject; paragraph [0041]), the kit comprising a probe for measuring (the kit comprising a probe for measuring; paragraphs [0033], [0041]); a detecting reagent (a detecting means (reagent); paragraphs [0040], [0047]) for examining binding of the probes with targets (for detecting the presence of a biomarker, including a probe (for examining binding of the probes with targets); paragraphs [0033], [0040], [0047]); wherein assessing has a sensitivity of at least 80% (wherein assessing has a sensitivity of at least 80%; paragraph [0185]) and a specificity of at least 75% (and a specificity of at least 75%; paragraph [0185]); comparing to a reference (comparing to a non-stroke subject (reference); paragraph [0051]); a non-ischemic stroke subject (a subject having a hemorrhagic stroke (a non-ischemic stroke subject); paragraph [0040]); a stroke mimic subject (a stroke mimic subject; paragraph [0040]); a nucleic acid (a nucleic acid; paragraph [0034]); a group of biomarkers (a group of biomarkers; paragraph [0035]); and a panel of probes (a panel of probes; paragraph [0033]).

Since none of the special technical features of the Groups I-IV inventions is found in more than one of the inventions, and since all of the shared technical features are previously disclosed by the Barr reference, unity of invention is lacking.

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 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	P
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	C 1 2 M 1/00	A
	C 1 2 N 15/09	Z

(81)指定国 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, 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, 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

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 バー , タウラ エル .
アメリカ合衆国 ペンシルベニア 1 5 3 7 0 , ウェインズバーグ , ノース リバティー ス
トリート 9 5 0

(72)発明者 ギエルシュ , リチャード
アメリカ合衆国 ウェストバージニア 2 6 5 0 1 , モーガンタウン , アリソン ストリート
2 6 0

(72)発明者 オコンネル , グラント
アメリカ合衆国 ウェストバージニア 2 6 5 0 5 , モーガンタウン , ハイランド アベニュー
- 3 0 4

Fターム(参考) 2G045 AA25 CA25 DA13 DA14
4B029 AA07 BB20 FA12
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR55
QR62 QR66 QS10 QS14 QS25 QS39 QX02
4C084 AA02 AA17 DC21 ZA361
5L099 AA04

专利名称(译)	中风和中风严重程度标志物		
公开(公告)号	JP2018523469A	公开(公告)日	2018-08-23
申请号	JP2018500637	申请日	2016-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	西弗吉尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	西弗吉尼亚大学		
[标]发明人	バータウラエル ギエルシュリチャード オコンネルgrant		
发明人	バー, タウラ エル. ギエルシュ, リチャード オコンネル, grant		
IPC分类号	C12Q1/686 A61K38/49 A61K45/00 A61P9/10 G06Q50/22 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 C12M1/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q1/686 C12Q2600/158 G01N2800/32 G01N2800/52 G16B25/00 G16H50/20		
FI分类号	C12Q1/686.Z A61K38/49 A61K45/00 A61P9/10 G06Q50/22 G01N33/50.P G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12M1/00.A C12N15/09.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/DA14 4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QS10 4B063/QS14 4B063/QS25 4B063/QS39 4B063/QX02 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/DC21 4C084/ZA361 5L099/AA04		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/191096 2015-07-10 US 62/300342 2016-02-26 US 62/352680 2016-06-21 US		
其他公开文献	JP2018523469A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了用于检测缺血性中风和用于鉴定缺血性中风的生物标志物的方法，试剂盒和装置。评估生物样品中缺血性中风生物标志物的表达模式可以允许以时间敏感的床边方式诊断中风。本发明涉及测定样品中无细胞核酸水平的方法，包括：a。测量来自受试者的样品中的无细胞核酸水平；b。比较所述无细胞核酸水平与参照样品中无细胞核酸的参考水平其中参考样品来自假性中风受试者；和c。确定样品或参考样品是否具有更高层次的无细胞核酸。

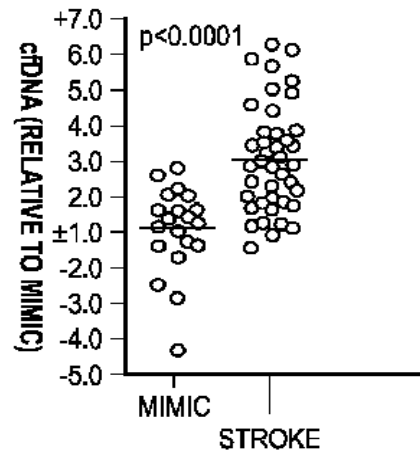


FIG. 28A