

(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2018-523092

(P2018-523092A)

(43) 公表日 平成30年8月16日(2018.8.16)

| (51) Int. Cl.           | F I                | テーマコード (参考) |
|-------------------------|--------------------|-------------|
| GO 1 N 33/68 (2006.01)  | GO 1 N 33/68 Z N A | 2 G O 4 1   |
| GO 1 N 33/573 (2006.01) | GO 1 N 33/573 A    | 2 G O 4 5   |
| GO 1 N 33/53 (2006.01)  | GO 1 N 33/53 W     | 4 B O 6 4   |
| GO 1 N 27/62 (2006.01)  | GO 1 N 27/62 V     | 4 H O 4 5   |
| CO 7 K 16/18 (2006.01)  | CO 7 K 16/18       |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-557192 (P2017-557192)  
 (86) (22) 出願日 平成28年5月5日 (2016.5.5)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月8日 (2017.12.8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/031043  
 (87) 国際公開番号 W02016/179426  
 (87) 国際公開日 平成28年11月10日 (2016.11.10)  
 (31) 優先権主張番号 62/157,389  
 (32) 優先日 平成27年5月5日 (2015.5.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591052398  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 THE REGENTS OF THE  
 UNIVERSITY OF CALIF  
 ORNIA  
 アメリカ合衆国・94607-5200・  
 カリフォルニア州・オークランド・12階  
 ・フランクリン ストリート・1111  
 (74) 代理人 100114775  
 弁理士 高岡 亮一  
 (74) 代理人 100121511  
 弁理士 小田 直  
 (74) 代理人 100202751  
 弁理士 岩堀 明代

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 星状細胞トラウマトーム (traumatome) および神経外傷のバイオマーカー

(57) 【要約】

対象における外傷性脳損傷 (TBI) または脊髄損傷 (SCI) の検出またはその状態をモニターするための方法が提供される。一実施形態において、当該方法は、対象から得た体液の標本を、アルドラーゼ C (ALDOC) および脳脂質結合タンパク質 (BLBP) から選択される TBI のマーカー、または ALDOC もしくは BLBP の外傷特異的分解産物 (BDP) についてアッセイするための試薬と接触させることを含む。当該方法はさらに、標本中に存在するマーカーの量を対照試料と比較して測定すること、および増加した量のマーカーが対照試料と比較して標本中に存在する時、TBI または SCI の存在を判定することを含む。当該方法は、グルタミンシンターゼ (GS)、星状細胞リントタンパク質 PEA-15 (PEA15)、B-クリスタリン (CRYAB/HSP27)、ALDOC、CS、PEA15、もしくは CRYAB の切断産物、またはこれらの2つ以上からなる組み合わせの量を測定することを含むことができる。

【選択図】 図 16

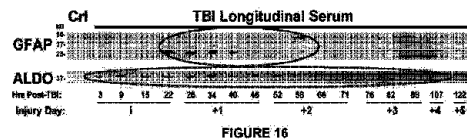


FIGURE 16

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

(a) 対象から得た体液の標本を、アルドラーゼ C (ALDOC) および脳脂質結合タンパク質 (BLBP / FABP7)、または ALDOC もしくは BLBP / FABP7 の外傷特異的分解産物 (BDP) から選択される TBI のマーカーについてアッセイするための試薬と接触させること、

(b) 対照試料と比較して前記標本中に存在するマーカーの量を測定すること、ならびに

(c) 前記対照試料と比較したマーカーの量の増加が前記標本中に存在する時の TBI または SCI の存在を判定すること

を含む、前記対象における外傷性脳損傷 (TBI) および / または脊髄損傷 (SCI) の状態を検出またはモニターするための方法。

## 【請求項 2】

前記 TBI のマーカーは、ALDOC またはその BDP、および BLBP またはその BDP である、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

グルタミンシンターゼ (GS)、星状細胞リンタンパク質 PEA-15 (PEA15)、B-クリスタリン (CRYAB / HSP27)、ALDOC、GS、PEA15、または CRYAB の外傷特異的タンパク質分解性切断産物、あるいはこれらのうちの 2 つ以上からなる任意の組み合わせの量を測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

ALDOC の前記外傷特異的タンパク質分解性切断産物が、38 kDa 断片、35 kDa 断片、30 kDa 断片、および 23 kDa 断片からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

GS の前記外傷特異的タンパク質分解性切断産物は、37 + 35 kDa 二重線、32 kDa 断片、23 kDa 断片、20 kDa 断片、および 18 kDa 断片からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

PEA15 の前記外傷特異的タンパク質分解性切断産物は、12 + 13 kDa 二重線および 8 kDa 断片からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 7】

B-クリスタリンの前記外傷特異的タンパク質分解性切断産物は、18 + 19 kDa 二重線、17 kDa 断片、15 + 14 kDa 二重線および 8 kDa 断片からなる群から選択される、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記対象から得た脳脊髄液 (CSF) 試料中の血液特異的タンパク質の量を測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記血液特異的タンパク質は、アポリポタンパク質 B (APOB) である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記対象から得た脳脊髄液 (CSF) 試料中のプロスタグランジンシンターゼ (PTGDS) の量を測定することをさらに含み、および PTGDS の量が減少した時、TBI の存在が判定される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 11】

グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) の 20 ~ 30 kDa の BDP の量を測定することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

10

20

30

40

50

ステップ ( a ) の前記試薬は、前記 T B I のマーカーを特異的に結合する抗体を含み、および前記測定することはイムノアッセイを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記イムノアッセイは、ウェスタンブロット法、または E L I S A を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記対照試料は、前記対象から得た損傷前試料である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記対照試料は、健常対象者の対照コホートから得た平均値である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 1 6】

追加のマーカーはアッセイされない、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

4 以下のマーカーがアッセイされる、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記体液の標本は、血漿、血清、脳脊髄液 ( C S F )、鼻水、耳垢、尿、唾液、涙、または脳微小透析液を含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記試薬は、タンパク質配列およびタンパク質配列断片特異的ペプチドを含み、ならびに前記測定することにおいて標的指向化定量的質量分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 2 0】

前記測定することは、多重または併行反応モニタリング質量分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 1】

バイオマーカーのセットを特異的に結合する試薬を含むキットであって、前記バイオマーカーは、

( a ) アルドラゼ C ( A L D O C )、および

( b ) 脳脂質結合タンパク質 ( B L B P )

を含み、この中で前記試薬はポリヌクレオチドまたは抗体であり、前記試薬は、検出可能なマーカーで任意に標識され、およびこの中で、前記キットは任意に、前記試薬を収容するための少なくとも 1 つの容器および / または検査試料における外傷性の脳もしくは脊髄損傷の状態を判定するための前記試薬の使用のための説明書からさらになる、前記キット。

30

【請求項 2 2】

( c ) 星状細胞リンタンパク質 P E A - 1 5 ( P E A 1 5 )、および / または

( d ) グリア線維性酸性タンパク質の 2 0 ~ 3 0 k ダルトン断片 ( G F A P - B D P ) を特異的に結合する試薬をさらを含む、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 3】

前記抗体は、モノクローナル抗体である、請求項 2 1 に記載のキット。

【請求項 2 4】

前記バイオマーカーのセットは、最多 4 のバイオマーカーからなる、請求項 2 1 に記載のキット。

40

【請求項 2 5】

( a ) 対象から得た血清試料を請求項 2 1 に記載のキットと接触させること、および

( b ) 前記バイオマーカーに対する前記試薬の結合を測定すること

を含む、前記血清試料におけるバイオマーカー A L D O C および B L B P の発現を判定する方法。

【請求項 2 6】

( a ) 対象から得た血清試料を請求項 2 1 に記載のキットと接触させること、および

( b ) 前記バイオマーカーに対する前記試薬の結合を測定すること、

50

(c) 前記結合を対照試料と比較すること、ならびに

(d) A L D O C および B L B P に対する前記試薬の結合が、前記対照試料に対して前記対象由来の前記血清試料において亢進する場合に存在していることになっている T B I を判定すること

を含む、前記血清試料における外傷性脳損傷の状態を判定する方法。

【請求項 27】

対象由来の体液の標本を、対照試料と比較した A L D O C および B L B P の量の増加についてアッセイすることを含む、前記対象における T B I を検出する方法であって、A L D O C および / または B L B P の量の増加は T B I を示す、前記方法。

【請求項 28】

前記アッセイすることは、推定損傷の 24 時間以内に実施される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記対象は、乳幼児または児童である、請求項 27 または 28 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体の内容が参照により本出願に組み込まれる 2015 年 5 月 5 日出願の米国仮特許出願番号第 62 / 157, 389 号の利益を請求する。

【0002】

E F S ウェブを介して提出される配列表に対する参照

2016 年 5 月 5 日に作成し、本出願とともに E F S ウェブを介して電子的に提出した 3 k b の大きさである「U C L A 2 1 7 \_ S L」という名称の配列表の A S C I I テキストファイルの内容は、その内容が全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

政府の支援に関する謝辞

本発明は、米国国立衛生研究所によって授与された N S 0 7 2 6 0 6 の下での政府の支援によってなされた。当該政府は、本発明におけるある一定の権利を有する。

【0004】

本発明は、国防省 U S A M R M C C D M R P 賞によって授与された研究助成金第 F S E C S T S E M S # 1 2 3 3 9 0 7 9 号に関する政府の支援によってなされた。当該政府は、本発明におけるある一定の権利を有する。

【0005】

本発明の技術分野

本発明は、外傷性脳損傷 ( T B I )、軽度 T B I ( 脳震盪 ) および外傷性脊髄損傷 ( S C I ) ならびに慢性神経変性疾患からのこれらの区別を含む、神経外傷の重症度および転帰の検出、早期推定、進行および治療のモニタリングのための抗体、プローブ、キットおよび関連材料、ならびにこれらの使用を含む、本発明の内容の組成物に関する。

【背景技術】

【0006】

毎年、170 万人が米国において T B I に罹患している。160 万 ~ 380 万人のしばしば報告されていない脳震盪が毎年発生しており、T B I は非常に有意な無症候性流行病となっている。さらに 100 万人の患者が毎年、米国の救急部において脊椎損傷と評価され、その 2 ~ 3 パーセントは、脊髄損傷に罹患している。神経外傷患者に対する救命処置の判断は、脳外傷患者の容態が典型的に T B I 後に日に日に変化するので、発展する損傷進行による迅速な診断および反復される正確な危険評価を必要とする。中等度および重度の外傷性の脳および脊髄損傷患者を評価することは、安全な緊急処置、二次的な有害事象に回答するよう準備するために損傷の進展をモニターすること、および神経外傷患者に対する回復力の早期評価である転帰を推定することによって決定的に重要である。神経外傷患者の評価は、患者間での重症度における広範な異種性によって疑われている。合併症の

10

20

30

40

50

危険にある個々の脳震盪患者を識別すると、これらは、遷延性症候群に罹患しているまたはC A T走査所見が陽性である軽度T B I患者であり、緊急治療応答者ならびにスポーツおよび軍隊の競技場経営に対する優先権がある。乳幼児、児童および若年の脳損傷は、世界規模での子供における死亡および身体障害の主要因を含み、さらに、診断は疑わしく、その理由は、T B Iの徴候および症状が存在しない、または一般的な子供の病気と重なっているからである。発達中の脳は、C A T走査の電離放射線に対してより感度が高いため、客観的なバイオマーカー検査を提供することによって、不必要なC T走査を減らすことが必須である。若年者に加えて、高齢者は、転倒によるT B Iについての共通の標的群であり、T B Iバイオマーカーシグナルを慢性神経変性マーカー特性と区別することが望ましい。

10

#### 【0007】

T B I患者の診断およびモニタリングは、脳の傷害の重症度を評価し危険度を正確に評価して、適切な予防処置で応じるために重要である。重度T B I患者にとって、時宜を得た外科的介入は、救命し得る。軽度T B I患者にとって、慢性疼痛および認知的または心理学的障害を発症させる危険にある脳震盪患者の識別は、治療の選択肢、対処戦略における誘導を提供し、および回復中の脳を第二の衝撃へ曝露するのを予防するのに役立つであろう。現行の重症度評価は主として、グラスゴー昏睡尺度を用いた昏睡の深度および持続期間に依存し、当該グラスゴー昏睡尺度は、患者の進行性障害の経過とともに日々変化し、昏睡を維持するために必要とされ得る服薬へ供される(I a n k o v a , 2 0 0 6 )。軽度T B Iは、主観的で動機の上で影響され得る意識消失、認知的または心理学的症状および疼痛症状の時間によって評価される。神経イメージングツール、特に先進的な治療法は、集中治療患者に対して反復して投与されることが困難であり、標準化を欠いている種々の読み出し値を有しており、どこでも入手可能ではなく、軽度T B I患者および小児患者にとって使用が制限されている。

20

#### 【0008】

代用の化学的バイオマーカーの血中濃度を測定することは、T B I患者に対する危険および需要を分類するための診断開始点として、より単純で客観的およびより容易に標準化されたツールを提供することができる。神経外傷バイオマーカーは、外傷性脳細胞から短時間で放出されるべきであり、脳および機械的外傷に特異的であるべきであり、血液脳関門を容易に通過すべきであり、ならびに健全な対象において存在をまったく示さないまたは一貫して低濃度を示すべきである。

30

#### 【0009】

目下、T B I患者の大部分である脳震盪患者にとっても、T B Iの疑いのある小児患者にとっても、臨床用途において高感度で、客観的な、標準化された診断検査はない。当該患者は、持続性脳損傷に罹患する危険にある易損性の脳が反復性衝突するのを予防するための客観的危険評価の必要が特にある標的集団である。外傷の進行は、告知した介入を必要とし得る損傷後の連続した日数における二次的悪化について公知であるので、集中治療室の頭部外傷患者は、代替りのモニタリング、または時間および経費のかかる補充的なイメージングのために、反復性非侵襲的血液試料分析から利益を得ることのできる別の標的群である。さらに、短期間の急性後重症度評価を判定するための、およびT B I患者へ投与される薬剤または他の治療パラダイムの効能を判定するための脳損傷バイオマーカーの反復性生体液試料分析に対する需要が残っている。

40

#### 【発明の概要】

#### 【0010】

本発明は、これらの需要ならびにその他を、対象における軽度の外傷性脳損傷(T B I)の診断を含む重症度範囲全体に対するT B Iの状態を検出もしくはモニターするための、および/または合併症の危険にある軽度T B I患者を判定するための、および/または脊髄損傷(S C I)の状態を検出もしくはモニターするための方法を提供することによって満たす。一実施形態において、当該方法は、対象から得た体液の標本を、アルドラーゼC(A L D O C)および脳脂質結合タンパク質(B L B P / F A B P 7)、またはA L D

50

OCもしくはBLBP/FABP7の外傷特異的分解産物(BDP)から選択されるTBIのマーカ-についてアッセイするための試薬と接触させることを含む。当該方法はさらに、対照試料と比較して当該標本中に存在するマーカ-の量を測定すること、およびマーカ-の量の増加が当該対照試料と比較して当該標本中に存在する時、TBIまたはSCIの存在を判定することを含む。一実施形態において、TBIのマーカ-は、ALDOCおよび/またはそのBDP、ならびにBLBPおよび/またはそのBDPである。任意に、当該方法はさらに、グルタミンシンターゼ(GS)、星状細胞リントンパク質PEA-15(PEA15)、B-クリスタリン(CRYAB/HSP27)、ALDOC、GS、PEA15、もしくはCRYABの外傷特異的タンパク質分解性切断産物、またはこれらの2つ以上からなる任意の組み合わせの量を測定することを含む。一実施形態において、当該方法はさらに、グリア線維性酸性タンパク質(GFAP)、またはGFAPの20~30kDaのBDPの量を測定することを含む。

10

20

30

40

50

**【0011】**

ALDOCの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の代表例としては、38kDaの主要断片、または35kDa断片、30kDa断片、および25kDa断片が挙げられる。BLBP/FABP7についての外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例は、3kDa分解産物である。GSの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例としては、37+35kDaの二重線、32kDa断片、23kDa断片、20kDa断片、および18kDa断片が挙げられる。PEA15の外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例としては、12+13kDa二重線および8kDa断片が挙げられる。B-クリスタリンの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例は、18+19kDa二重線、17kDa断片、15+14kDa二重線および8kDa断片からなる群から選択される。

**【0012】**

一実施形態において、当該方法はさらに、対象から得た脳脊髄液(CSF)試料中の血液特異的タンパク質の量を測定することを含む。このようなマーカ-の検出およびモニタリングは、損傷後の脳室内脳出血の状態を判定するために使用することができる。一実施形態において、当該血液特異的タンパク質は、アポリポタンパク質B(APOB)である。別の実施形態において、当該方法はさらに、対象から得た脳脊髄液(CSF)試料中のプロスタグランジンシンターゼ(PTGDS)の量を測定することを含む。トレースタンパク質としても公知のPTGDSは、健常CSF組成と正に相関して、対照、非TBI CSFにおいて豊富である。TBIの存在は、PTGDSの量が減少し、回復とともに増加する時に測定される。TBI後に増加した血液特異的タンパク質または減少したCSFタンパク質のようなマーカ-の検出およびモニタリングはそれゆえ、損傷後の対照または正常レベルまでの回復の状態を判定するために使用することができる。

**【0013】**

当該方法の一部の実施形態において、追加のマーカ-は、本明細書に列挙されるもののほかはアッセイされない。他の実施形態において、本明細書に列挙されるマーカ-のみがアッセイされる。一部の実施形態において、当業者に公知の追加のマーカ-は、本明細書に列挙されるマーカ-と併用してアッセイされる。他の実施形態において、考えられるマーカ-の部分セットのみがアッセイされる。例えば、当該方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、または20のマーカ-についてアッセイすることを含むことができる。1つの特定の実施形態において、4以下のマーカ-がアッセイされる。

**【0014】**

本発明の方法における使用のための試薬は、TBIのマーカ-を特異的に結合する抗体または他の分子を含むことができる。一実施形態において、当該測定することは、イムノアッセイを含む。イムノアッセイの例としては、ウェスタンブロット法、免疫蛍光、免疫発光、ラジオイムノアッセイ、および酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)が挙げられる。

**【0015】**

別の実施形態において、当該試薬は、タンパク質配列におよびタンパク質配列断片に特

異的なペプチドを含む。このような試薬は、当該測定することが標的指向化定量的質量分析を含む方法に対して有用である。一実施形態において、当該測定することは、多重または併行反応モニタリング質量分析を用いた、添加された（「スパイクされた」）標識された（例えば、重同位元素で標識された）既知の量の同じタンパク質特異的ペプチド（内部標準物質）と比較される、内在性（当該試料における）プロテオタイプ（*proteo-typic*）ペプチドの定量的シグナル検出を含む。

**【0016】**

一実施形態において、当該対照試料は、当該対象から得た損傷前試料である。別の実施形態において、対照試料は、健常対象者の対照コホートから得た平均値のような、正常な健常対象者を代表する。

**【0017】**

本発明における使用のための体液の標本の代表例としては、血漿、血清、脳脊髄液（CSF）、鼻水、耳垢、尿、唾液、涙、および脳微小透析液が挙げられるが、これらに限定されない。

**【0018】**

本発明は追加的に、バイオマーカーのセットを特異的に結合する試薬を含むキットを提供する。一実施形態において、当該バイオマーカーは、アルドラーゼC（ALDOC）および脳脂質結合タンパク質（BLBP）を含む。当該試薬は典型的には、ポリヌクレオチドまたは抗体であり、検出可能なマーカーで任意に標識されている。当該キットは任意に、当該試薬を収容するための少なくとも1つの容器および/または検査試料における外傷性脳損傷の状態を判定するための試薬の使用のための説明書からさらになる。一部の実施形態において、当該キットは、星状細胞リンタンパク質PEA-15（PEA15）、および/またはグリア線維性酸性タンパク質の20~30kダルトン断片（GFAP-BDP）を特異的に結合する試薬を、単独でまたは本明細書に説明されるもしくは当該技術分野で公知の追加のマーカーとともに含む。一実施形態において、当該抗体は、モノクローナル抗体である。一実施形態において、当該セットのバイオマーカーは、最多3、4、5、6、7、8、9、または10のバイオマーカーからなる。

**【0019】**

本発明はさらに、対象から得た血清の試料中のバイオマーカーALDOCおよびBLBPの発現を判定する方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、当該血清試料を本発明のキットと接触させること、および当該バイオマーカーへの当該試薬の結合を測定することを含む。

**【0020】**

対象から得た血清試料における外傷性脳損傷の状態を判定する方法も提供される。一実施形態において、当該方法は、当該血清試料を本発明のキットと接触させること、および当該バイオマーカーに対する当該試薬の結合を測定すること、ならびに当該結合を対照試料と比較することを含む。TBIは次に、ALDOCおよびBLBPに対する当該試薬の結合が対照試料と比較して対象由来の血清試料中で亢進する場合、存在していると判定される。本発明はさらに、対象におけるTBIを検出する方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、対象由来の体液の標本を、対照試料と比較したALDOCおよびBLBPの量の増加についてアッセイすることを含む。ALDOCおよび/またはBLBPの量の増加は、TBIを示す。一実施形態において、当該アッセイすることは、推定損傷の24時間以内に、および損傷後最長1週間までに実施される。一部の実施形態において、当該アッセイすることは、推定損傷の1~3時間以内に、または15~30分以内と早期に実施される。一部の実施形態において、当該対象は、例えば、揺さぶられっ子症候群を受けた疑いのある対象を含む乳幼児または児童である。この使用に適しているのは、ALDOCまたはBLBPのような、早期の発達中の脳において発現するバイオマーカーである。別の実施形態において、当該対象は、高齢者であり、当該方法は、TBIと慢性神経変性疾患とを、ALDOCの分解産物に対するALDOCの比率を測定することによって識別するために使用される。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 2 1 】

本発明はさらに、対象における S C I 後の T B I の転帰および / または歩行の回復を推定する方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、対象由来の体液の標本を、 P E A 1 5 または G F A P の小さな B D P の量の増加について、対照試料または T B I で生き残った人の試料と比較してアッセイすることを含み、この中で、 P E A 1 5 または G F A P の小さな B D P の量の増加は死亡を確定する。対象における T B I を治療する方法も提供される。一実施形態において、当該方法は、対象から損傷後の複数の時点で得た試料（縦断的な試料シリーズ）を、本明細書で説明するような T B I のマーカーについてアッセイすること、および当該アッセイが T B I の存在を示す場合、 T B I について当該患者を治療することを含む。この方法は、当該患者の状態を経時的にモニターして、薬剤治療 10 効能を、または T B I 患者の介入的治療が必要であろうかどうかを判定するために使用することができる。当業者は、本明細書に説明される方法の各々が、当該マーカーの非常に早期の損傷後放出および長期の検出ウィンドウならびに種々の生体液クリアランス動態によるマーカー、すなわち A L D O C、 B L B P、 G S、 P E A - 1 5、 C R Y A B、上述のうちのいずれかの B D P のうちのいずれか 1 つを単独で、または 1 つ以上の追加のマーカーと併用して実施することができることを認識するであろう。

## 【 0 0 2 2 】

A L D O C および B L B P といったマーカーは、 P E A 1 5 および C R Y A B と同様に、急性損傷したヒト脳細胞でありそれゆえ、損傷後の脳の傷付きやすい状態である脳震盪 20 関連病理生理学的過程を追跡するために使用することのできる損傷から放出される。潜在的に可逆性のある損傷状態に対するこれらのマーカーのこの結合は、軽度 T B I の診断をより高感度なものにする上で支援することができる病理機序情報を提供し、組織喪失を反映する細胞死で放出されるマーカーを追跡すること以外におよび当該追跡することに加えて、 T B I 患者の薬物動態モニタリングに対して役立ち得る。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 3 】

【 図 1 】棒グラフを用いて示された機械的外傷後のヒト新皮質星状細胞の細胞運命、および生細胞、漏出性細胞および死細胞の核を示す染色細胞の実況に関する顕微鏡写真。

【 図 2 】棒グラフ、共焦点顕微鏡を介して温度およびガスを制御したステージ上で撮像した細胞の実況に関するタイムラプスビデオからの一連の顕微鏡写真、ならびにプロトコルの概略図で示すように、機械的に外傷を受けたヒト星状細胞は、マウス星状細胞と比較して、受傷後の損傷した状態における長期の持久性を示す。 30

【 図 3 】ヒト星状細胞の機械的外傷は、イムノプロット（ A ）および損傷後の種々の時点でマーカー量を示す棒グラフ（ B ~ G ）で示すように、アストログリアマーカーの周辺流体への有意な放出を生じる。

【 図 4 A 】神経外傷バイオマーカーが外傷を受けたヒト星状細胞の細胞運命と関係していることを示す二重プロット。

【 図 4 B 】神経外傷バイオマーカーが外傷を受けたヒト星状細胞の細胞運命と関係していることを示す二重プロット。

【 図 5 】星状細胞損傷バイオマーカーの選択戦略に関する概略図。 40

【 図 6 】アストログリア損傷マーカーが、損傷当日および損傷後 5 日間連続で、 T B I 患者対後向き観察コホートにおける対照の C S F において上昇することを示している、イムノプロット（ 図 6 A ~ 6 C ）ならびに損傷当日および損傷後 5 日間連続での 2 0 ~ 2 5 名の T B I 患者ならびに 8 ~ 1 1 名の対照の C S F における目盛り付きデンシトメトリーを用いてイムノプロットシグナルから測定した対数尺度に基づいた光学濃度（ 図 3 を参照されたい）を示す四分位間範囲（ i n t e r q u a r t i l e r a n g e ）（ 9 0 パーセントイルおよび 1 0 パーセントイル）、中央値（線）および幾何平均（破線）を有する箱ひげ図とともにプロットした散布図（ 図 6 D ~ 図 6 K ）（ n : 1 日あたりの被験者数）。

【 図 7 】バイオマーカー C S F 量に関する T B I 患者転帰相関。

【 図 8 】群分けしたアストログリア損傷マーカーの因子を用いた T B I の範囲の評価。 50

【図 9】細胞死における細胞創傷 - G F A P における B L B P の比率は外傷を受けたヒト星状細胞および T B I 患者における外傷重症度を識別する。

【図 10】A L D O C レベルおよび T B I 患者転帰との相関。

【図 11】ブタ脊髄損傷後の組織病理学的重症度の基準、組織喪失および出血と関連した急性アストログリアマーカー放出。

【図 12】ブタ脊髄損傷後の A L D O C および G F A P の一過的な上昇に関する転帰相関。

【図 13】定量的質量分析、多重反応モニタリングは、アストログリア T B I マーカーの濃度を文書記録し、抗体とは無関係のマーカー量の比較を可能にする。

【図 14】既知の量の純粋なタンパク質を用いた、T B I の C S F および血液における A L D O C および B L B P の量および濃度範囲に関する、抗体を基にした定量的評価。

【図 15】イムノプロット ( A ) および損傷後の経時的に測定した量のグラフ ( B ) によって示されるような重度 T B I 患者の血液試料における血液適合性アストログリアバイオマーカー。

【図 16】縦断的な重度 T B I 血清試料のイムノプロットは、A L D O C 対 G F A P の検出ウィンドウの拡大を示す。

【図 17】T B I 後の C S F および血漿における B L B P 分解産物を示すイムノプロット。

【図 18】損傷後の経時的に測定された量に関するイムノプロット ( A ) およびグラフによって示されるような、損傷を受けた血液脳関門を通る直接的な通過によるアストログリア損傷マーカーの急性循環様相についての証拠。

【図 19】最高レベルのアストログリア損傷マーカーおよび P E A 1 5 を示すイムノプロットデータは、合併症に罹患しているまたは罹患していない脳震盪後の軽度 T B I 患者の血清において頑強におよび早期に検出される ( C T + : 合併症あり - 陽性 C A T 走査、C T - : 合併症なし、C A T 走査所見なし ) 。

【図 20】小児 T B I、乳幼児における血清 A L D O C の急性のおよび頑強な検出を示すイムノプロットデータ。

【図 21】全長 A L D O C が急性 T B I における 3 8 k D a の B D P よりも多量に存在するのに対し、2つの大きさの A L D O C はアルツハイマー病の慢性神経変性容態において異なる比で存在する (表 2 に付与) ことを示すイムノプロットデータ。

【図 22】表 3 の閾値の区別の説明。

【図 23】表 4 の閾値の区別の説明。

【図 24】急性膜受傷および細胞死の遅延を有する星状細胞の百分率 ( A )、ならびに伸張後の G F A P および A l d o C の条件培地 ( C M ) レベル ( B ) によって示されるような、ヒト外傷培養モデルにおける反復性軽度損傷後のグリア外傷放出マーカーレベルの上昇。

【図 25】カルパインおよびカスパーゼ活性化が外傷後の G F A P 上位および下位分解産物を生じたことを示す、G F A P の 2 回のフィルム曝露。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、T B I 患者および対照由来の C S F、血漿および血清に関して初めて検査されたいくつかの新たな T B I バイオマーカーを提供する。新たな神経外傷マーカーは、外傷モデルにおけるヒト脳アストログリアの細胞受傷および / または細胞死と関係する当該マーカーの放出機序によって規定される。本明細書に提示されるデータは、選択されたバイオマーカーが体液中での非常に関心のある動態および安定性を示すことを実証する。免疫学的検出能、感度および選択性が示されており、適切なモノクローナル抗体が選択された。T B I 後の最初の数時間および数日の間の C S F および血清におけるマーカーの出現のタイミングは、添付の実施例および付録において提示される。本結果は、本明細書において説明されおよび患者の血清または血漿中で検出可能なマーカーが、中等度および重度 T B I ならびに軽度 T B I、ならびに致死的な T B I を示すパターンを識別するために使

10

20

30

40

50

用することができることを示す。当該マーカ－を表 1 に要約する。

【 0 0 2 5 】

定義

本出願において使用される科学用語および技術用語はすべて、別段の指定がない限り、当該技術分野で通常使用される意味を有する。本出願において使用される場合、以下の語または句は、指定された意味を有する。

【 0 0 2 6 】

本明細書で使用される場合、「主要 B D P 」におけるような「主要」は、最も頻繁におよび一貫して観察される分解産物を指し、例えば、A L D O C の 3 8 k D a の B D P は、A L D O C の主要 B D P である。

10

【 0 0 2 7 】

本明細書で使用される場合、「急性の」は、損傷時間後の早期時間を指し、典型的には、生体液試料を、急性とみなされる損傷当日に収集した。例えば、外傷モデルにおける損傷の 1 5 ~ 3 0 分後、軽度 T B I 患者における損傷の 1 ~ 2 時間後、中等度および重度 T B I 患者における損傷の 3 時間 ~ 2 4 時間後である。

【 0 0 2 8 】

本明細書で使用される場合、合併症のある軽度 T B I は、B u k i ら , 2 0 1 5 を基にして、コンピュータ断層撮影、C T / C A T 走査所見が陽性である、または持続性の症候学的特徴をより広範に有する脳震盪患者について使用される。

20

【 0 0 2 9 】

本明細書で使用される場合、「有意差」は、統計的有意差、または当該状況下で妥当なレベルの信頼性で検出することのできる十分な程度である差など、当業者によって信頼できるとみなされる様式で検出されることのできる差を意味する。本明細書で提供される実施例において、対数変換データはガウス分布に従っており、本発明とは無関係の統計専門家によって統計分析に使用された。当該統計専門家は、非定常分散を用いる反復測定分散分析の混合モデルを使用することができる ( C r o w d e r および H a n d , 1 9 9 0 ) 。対数変換したときデータが線形であるので、有意差は、桁によってでさえ、典型的に多様である。ある例において、8 0 倍 ~ 1 3 0 0 0 倍に及ぶ T B I と対照の間の増減が観察され、有意であることがわかっている。別の例において、6 ~ 3 2 倍の損傷後の異なる日数にわたる変化は有意とみなされる。さらに別の例において、T B I の生き残った者と生き残らなかった者との変化は、4 倍 ~ 1 4 0 0 倍であることが観察され、有意であることがわかっている。さらに別の例において、基準試料または対照試料に対する 2 倍の増加は、有意とみなされる。

30

【 0 0 3 0 】

本明細書で使用される場合、「対照」または「対照試料」は、正常レベルを代表する試料または健常であることが既知の対象から得たものを代表する試料のいずれかを指す。

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用される場合、「 a 」または「 a n 」は、別段の明確な記載がない限り、少なくとも 1 を意味する。

【 0 0 3 2 】

40

【表 1】

表 1 : アストログリア損傷マーカー

| 名称                       | ID, 分子量                   | 分解産物 (BDP)<br>大きさ付記  | 放出機序、マーカークラス<br>バイオマーカー特性  |
|--------------------------|---------------------------|--|--|
| 最高レベルのマーカー               |                           |  |  |
| グリア線維性酸性タンパク質            | GFAP, 50 kDa              | <u>下位GFAPのBDP</u><br>29, 25, (23) kDa<br>19 + 20 二重線、配列は外傷を受けた星状細胞、TBI患者のCSFおよび血清の質量分析によって定義 | 細胞死マーカー。ヒトアストログリア死滅と強い相関があるが細胞受傷とはない。小さな断片はカルパインおよびカスパーゼ活性依存的である。<br>TBI血中に遅延して存在し、生体液 (CSF、血液) から迅速に除去。<br>脳特異的で多量。<br>TBIおよびSCI転帰と関係し、SCIの重症度を予測。  |
| フルクトース-1,6-二リン酸アルドラーゼC   | ALDOC, 40 kDa             | <u>ALDOCのBDP</u><br>38 + 37 kDa 二重線 35 + 30 kDa<br>25 kDa                                    | 細胞漏出性マーカー。ヒトアストログリア細胞受傷と強い相関、細胞死と中等度の相関。<br>TBI血中で迅速に放出および存在。<br>生体液 (CSF、血液) 中で長く生存。<br>受傷当日後にCSFおよび血液中でGFAPよりも高レベルを有する。<br>脳に非常に多く分布し、多量。<br>SCIの重症度および転帰と強い予測的関係。TBIの転帰と相関する傾向。<br>ALDOCのBDPはAD患者に存在。<br>TBI乳幼児および軽度TBI患者においてGFAPよりも頑強。 |
| 脂質結合タンパク質<br>脂肪酸結合タンパク質7 | BLBP, 15 kDa<br><br>FABP7 | <u>BLBPのBDP</u><br>3 kDa   | 細胞漏出性および細胞死のマーカー<br>外傷を受けたヒト星状細胞において両方とも中程度に相関。<br>TBI血中で迅速に放出および存在。<br>生体液 (CSF、血液) 中で短命。<br>脳に多く分布。TBI進行モニタリングに適している。<br>BLBP/GFAP比はTBI重症度を区別する。SCIの重症度と中等度の相関。  |
| 次点レベルのマーカー               |                           |  |  |

10

20

30

40

|  |                        |  |  |
|--|------------------------|--|--|
| 星状細胞<br>リンタンパク質<br>15                            | PEA15, 15 kDa          | PEA15のBDP<br>13 + 12 kDa 二重線<br>8 kDa                      | 細胞漏出性マーカー。ヒト星状細胞受傷と強い相関。<br>TBI 血中で迅速に放出および存在<br>生体液 (CSF、血液) 中で短命<br>TBI 進行モニタリングに適している<br>TBI 死亡率と関連する傾向 |
| グルタミン<br>シンテターゼ                                  | GS, 45 kDa             | GSのBDP<br>37, 35, 32 kDa<br>23, 20, 18 kDa 三重線             | BLBP および PEA15 として生体液中で比較的安定だが、ALDOC よりも不安定<br>SCI 重症度を予測  |
| $\alpha$ クリスタリンB<br>鎖<br>=熱ショック<br>タンパク質27       | CRYAB, 21 kDa<br>HSP27 | CRYABのBDP<br>19+18, 17 kDa 三重線<br>15 + 14 kDa 二重線<br>8 kDa | 細胞漏出性マーカー。ヒトアストログリア細胞受傷と強い相関、細胞死と中等度の相関。<br>生体液 (CSF、血液) 中で短命<br>CRYAB は、外傷重症度を区別する                        |
| CSF 試料のための標準物質、指示薬                               |                        |  |  |
| アポリポ<br>タンパク質B                                   | APOB, 120-130<br>kDa   | 分析せず   | 出血指示薬<br>腸および肝臓から血中へ分泌、健全CSF からは分泌されない<br>TBI のCSF における出血と関係   |
| プロスタグラン<br>ジン(D2)シタ<br>ターゼ $\beta$ トレース<br>タンパク質 | PTGDS, 22 kDa          | 分析せず   | 健全CSF 標準物質<br>最も多量なCSF タンパク質。分泌酵素。生き残った者のTBI 後と関係  |

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 3 】

## 本発明の方法

本発明は、対象における外傷性脳損傷 (TBI)、軽度TBI、および/または脊髄損傷 (SCI) の状態を検出またはモニターするための方法を提供する。当該方法は、対象におけるTBIまたはSCIの存在、進行、予測、および重症度の区別を判定するために使用することができる。一実施形態において、当該方法は、対象から得た体液の標本をアルドラーゼC (ALDOC) および脳脂質結合タンパク質 (BLBP / FABP7)、またはALDOCもしくはBLBP / FABP7の外傷特異的な分解産物 (BDP) から選択されるTBIのマーカーについてアッセイするための試薬と接触させることを含む。当該方法はさらに、対照試料と比較して、当該標本中に存在するマーカーの量を測定すること、およびマーカー量の増加が対照試料と比較して標本中に存在する時、TBIまたはSCIの存在を判定することを含む。一実施形態において、TBIのマーカーは、ALDOCおよび/またはそのBDP、ならびにBLBPおよび/またはそのBDPである。任意に、当該方法はさらに、グルタミンシンテターゼ (GS)、星状細胞リンタンパク質PEA-15 (PEA15)、B-クリスタリン (CRYAB / HSP27)、ALDOC、GS、PEA15、またはCRYABの外傷特異的なタンパク質分解性切断産物、あるいはこれらのうちの2つ以上からなる任意の組み合わせの量を測定することを含む。一実施形態において、当該方法はさらに、グリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) またはGFAPの20~30kDaのBDPの量を測定することを含む。

## 【 0 0 3 4 】

T B I後の日々におけるB L B Pおよび/またはP E A 1 5の上昇のモニタリングは、損傷後の二次的な有害事象に関して知らせる。例えば、A L D O C、B L B P、G SおよびP E A 1 5のレベルの上昇の検出は、A因子を算出するために使用することができ、G F A P、S 1 0 0ベータおよびA P O Bのレベルは、B因子を算出するために使用することができ、当該算出は各因子に対するマーカー負荷を基にする。組み合わせられたA因子およびB因子は、重症度によって患者を区別するために使用することができる。A因子およびB因子の閾値は、T B Iを生き残った者、生き残らなかった者および対照の間の境界を提供する。臨床試験または研究内での患者の評価は、因子分析を読み取りおよび実行する複数のバイオマーカーを提供するキットを用いることによって、より頑強であることができる。このことは、財政的におよびさもなれば実行できないかもしれない非常に大きなコホートサイズを必要とすることとは対照的に、非常に可変性のあるコホート内で個々の患者を追跡するための簡素化されたアプローチを提供する。各臨床試験または研究コホートのバイオマーカーパネルデータは、データベースへと入力することができ、標準化することができ、各患者は、組織死滅/出血対組織損傷/受傷因子を基に評価される。これら2つのクラスを代表する因子を用いることは、1つの0の読み取りによって、因子分析全体が任意の所与の患者についての相対的な状態出力を提供するのを防止しないであろうから、評価をより頑強にする。境界は、各患者が損傷後の所与の時間において独特な状態を有するであろう各コホートの重症度範囲を定める(p i n o u t)。

10

#### 【0035】

一実施形態において、当該方法はさらに、細胞漏出性マーカーの例であるB L B Pの量と細胞死のマーカーであるG F A Pの量の比を算出することを含む。量は、光学濃度を用いて測定し得る。外傷モデルにおけるB L B PおよびG F A Pの量の比は、0.6~1.2に及び、軽度/中等度外傷に相当するのに対し、0.1~0.4の比は重度外傷に相当する。このことは、重度外傷において軽度外傷後よりも比例してより多量のG F A Pが認められるヒト培養外傷モデルにおける知見を反映している。中等度T B I患者におけるB L B P / G F A P比は0.4~0.3に及ぶのに対し、重度T B I患者における範囲は0.01と0.05の間であり、重度対中等度T B I患者におけるG F A P対B L B Pの比例した比較的多量を再度表す。このようなものとして、この比を用いることは、より頑強な患者重症度分類を提供する。2つのマーカーを含むことによって、有意性に到達するのに対し、1つのマーカー単独は、非常により大きなコホートサイズを必要とするであろう。これによりマーカーの併用は、臨床研究または臨床試験における評価ツールとして使用する時、最低限の所要患者登録サイズを減少させることによって、T B I状態を評価しT B I進行をモニターする上で役に立つことができる。

20

30

#### 【0036】

対象におけるT B Iの状態を検出およびモニターするための方法は、軽度T B Iまたは脳震盪後の合併症についての危険にある対象を識別するために使用することができる。この識別は、血清試料中のA L D O Cに加えて、B L B Pおよび/またはP E A 1 5の損傷後1~2時間以内におよび損傷後最長17時間に得られた試料を使用することなど、急性の存在を使用することによって行われる。A L D O Cの上昇のみは、脳震盪を識別することができ、A L D O CならびにB L B Pおよび/またはP E A 1 5の損傷当日の上昇は、合併症についての危険と関係する。

40

#### 【0037】

A L D O Cの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の代表例としては、最も一貫して認められた主要な38kDa断片、35kDa断片、30kDa断片、および23kDa断片が挙げられる。G Sの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例としては、37+35kDa二重線、32kDa断片、23kDa断片、20kDa断片、および18kDa断片が挙げられる。P E A 1 5の外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例としては、12+13kDa二重線および8kDa断片が挙げられる。B-クリスタリンの外傷特異的タンパク質分解性切断産物の例は、18+19kDa二重線、17kDa断片、15+14kDa二重線および8kDa断片からなる群から選択される。

50

## 【0038】

全長のALDOC(40kDa)の量とALDOC切断産物(38kDa)の量の比は、損傷後時間、および急性対亜急性対慢性の脳損傷またはアルツハイマー病(AD)を含む神経変性脳疾患の識別を示す。したがって、一実施形態において、TBIまたはSCIを検出および/またはモニターする方法は、当該対象から得た標本中の40kDaのALDOCレベルと38kDaのALDOCレベルの比を決定することを含む。全長のALDOCが38kDaのALDOCのBDPよりも非常に多量にあるので、3.6~8.6に及ぶ1よりも大きな比はTBIを示す(急性および亜急性、損傷後1~5日にわたる)。38kDaのALDOCのBDPは、全長のALDOCの光学シグナル密度と類似しておりまたは当該密度よりも大きかったので、0.4~0.6に及ぶ1未満の比はアルツハイマー病を示し、その理由は、慢性変性容態によって急性損傷容態よりも断片の長期の部分的分解および蓄積が可能となるからである。

10

## 【0039】

一実施形態において、当該方法はさらに、対象から得た脳脊髄液(CSF)試料中の血液特異的タンパク質の量を測定することを含む。このようなマーカーの検出およびモニタリングは、損傷後の脳室内脳出血の状態を判断するために使用することができる。一実施形態において、血液特異的タンパク質は、アポリポタンパク質B(APOB)である。別の実施形態において、当該方法はさらに、当該対象から得た脳脊髄液(CSF)試料中のプロスタグランジンシンターゼ(PTGDS)の量を測定することを含む。ベータトラスタンパク質としても公知のPTGDSは、健常CSF組成と正に相関している。TBIの存在は、PTGDSの量が減少しおよび回復とともに上昇する時に測定される。このようなマーカーの検出およびモニタリングはそれゆえ、損傷後の健常レベルまでの回復状態を判断するために使用することができる。一部の実施形態において、急性外傷により減少したPTGDSレベルの回復は、その後の損傷後の日々においてモニターされ、生き残りを予測するのに対し、PTGDSレベルの持続的な低下は死亡を予測する。

20

## 【0040】

当該方法の一部の実施形態において、本明細書で列挙されたもの以外の追加のマーカーはアッセイされない。他の実施形態において、本明細書で列挙されたマーカーのみがアッセイされる。一部の実施形態において、当業者に公知の追加のマーカーは、本明細書で列挙されたマーカーと併用してアッセイされる。他の実施形態において、考えられ得るマーカーの部分セットのみがアッセイされる。例えば、当該方法は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、または20のマーカーについてアッセイすることを含むことができる。1つの特定の実施形態において、4以下のマーカーがアッセイされる。

30

## 【0041】

本発明の方法における使用のための試薬は、TBIマーカーを特異的に結合する抗体または他の分子を含むことができる。一実施形態において、当該測定することはイムノアッセイを含む。イムノアッセイの例としては、ウェスタンブロット法、免疫蛍光、免疫発光、ラジオイムノアッセイ、およびELISAが挙げられる。ALDOCアイソフォーム特異的抗体は、EnCor Biotechnology社(フロリダ州ゲインズビル市)製のモノクローナル抗体クローン4A9、1A1、5C9およびE9として入手可能である。BLBP特異的モノクローナル抗体もEnCor Biotech社から入手可能である。

40

## 【0042】

別の実施形態において、当該試薬は、タンパク質配列およびタンパク質配列断片に特異的なペプチドを含む。このような試薬は、当該測定することが標的指向化定量的質量分析を含む方法にとって有用である。一実施形態において、当該測定することは、多重または併行反応モニタリング質量分析を用いる、添加された(「スパイクされた」)標識された(例えば、標識された重同位元素)既知の量の同じタンパク質特異的ペプチド(内部標準物質)と比較される内在性(当該試料における)プロテオタイプ(proteo-typic)ペプチドの定量的シグナル検出を含む。

50

## 【 0 0 4 3 】

一実施形態において、対照試料は、対象から得た損傷前試料である。別の実施形態において、対照試料は、健常対象の対照コホートから得られた平均値など、正常な健常被験者を代表する。

## 【 0 0 4 4 】

本発明における使用のための体液の標本の代表例としては、血漿、血清、脳脊髄液（CSF）、鼻水、耳垢、尿、唾液、涙、および脳微小透析液が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 0 4 5 】

本発明はさらに、対象から得た血清または血漿の試料中のバイオマーカーALDOCおよびBLBPの存在を判定する方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、当該血清または血漿の試料を本発明のキットと接触させること、および当該バイオマーカーへの当該試薬の結合を測定することを含む。

10

## 【 0 0 4 6 】

対象から得た血清または血漿の試料における外傷性脳損傷の状態を判定する方法も提供される。一実施形態において、当該方法は、当該血清/血漿試料を本発明のキットと接触させること、および当該バイオマーカーへの当該試薬の結合を測定すること、および当該結合を対照試料と比較することを含む。TBIは次に、ALDOCおよびBLBPへの当該試薬の結合が、対照試料と比較して当該対象由来の血清試料中で増加する場合に存在することが判定される。中等度から重度までのTBI患者について、ALDOCおよびBLBPの量および濃度は図14および実施例13に付与され、バイオマーカーの比較は図13および実施例12における濃度で付与される。本発明はさらに、対象におけるTBIを検出する方法を提供する。特に、当該方法は、診断がさもなくば明白ではない軽度TBIを検出するために使用することができる。一実施形態において、当該方法は、対象由来の体液の標本を、対照試料と比較したALDOCおよびBLBPの量の増加についてアッセイすることを含む。ALDOCおよび/またはBLBPの量の増加は、TBIを示す。一実施形態において、当該アッセイすることは、疑われる損傷の24時間以内に実施される。一部の実施形態において、当該アッセイすることは、疑われる損傷の1~3時間以内に、または15~30分以内と早期に実施される。一実施形態において、当該アッセイすることは、疑われる損傷後の最長7日間実施される。一部の実施形態において、当該対象は、例えば揺さぶられっ子症候群を受けた疑いのある対象を含む乳幼児または児童である。当該方法によって、脊髄損傷後すぐに対象において損傷の重症度が評価でき、転帰が予測できる。

20

30

## 【 0 0 4 7 】

本発明はさらに、対象におけるTBIの転帰および/またはSCI後の回復を予測する方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、対象由来の体液の標本を、対照試料と比較したPEA15および/または20~30kDa（小分子）GFAP断片の量の増加についてアッセイすることを含み、この中で、PEA15および/または小分子（すなわち、下位）GFAP断片の量の増加は、死亡を確定する。対象におけるTBIを治療する方法も提供される。一実施形態において、当該方法は、対象から得た試料を、本明細書に説明するTBIのマーカについてアッセイすること、および当該アッセイがTBIの存在を示す場合、当該患者をTBIについて治療することを含む。本発明はさらに、TBIについて治療中の対象における治療指針についてモニターする方法を提供する。一実施形態において、当該方法は、対象から得た試料を本明細書に説明するTBIのマーカについてアッセイすること、および当該アッセイが損傷後の日々の中で患者の状態の悪化に関することを示す場合、すなわち、本明細書に説明するマーカのいずれかの二次的なレベル上昇を示す場合、当該患者のTBIについての治療を開始することを含む。本発明の方法はさらに、薬剤または他の患者治療を治療効果の早期評価についてモニターする上で使用する、および損傷後のTBIの進行をモニターするための薬物動態（診断・治療）適用を提供する。当業者は、本明細書に説明するマーカの異なる放出およびクリアランス

40

50

の動態を考慮して、パネルとして本明細書に説明する複数のマーカーを使用する利点を認識するであろう。したがって、患者の評価には、複数のマーカー、すなわちALDOC、BLBP、GS、PEA-15、CRYAB、上述のうちのいずれかのBDPのうちのいずれか1つを、単独でまたは1つ以上の追加のマーカーと併用して含むことができる。

#### 【0048】

本発明によって熟慮される一部の実施形態には、アルドラーゼC (ALDOC)、グルタミンシンターゼ (GS)、星状細胞リントンパク質PEA-15 (PEA15)、B-クリスタリン (CRYAB)、もしくは脳脂質結合タンパク質 (BLBP / FABP7)、ALDOC、GS、PEA15、CRYAB、もしくはBLBP / FABP7の外傷特異的タンパク質分解性切断産物、またはこれらのうちの2つ以上からなる何らかの組み合わせを含む複数のTBIマーカーの併用が含まれる。例えば、複数の実施形態には、TBIのマーカーがGSおよびアルドラーゼCである、TBIのマーカーがGSおよびPEA15である、TBIのマーカーがGSおよびB-クリスタリンである、TBIのマーカーがGSおよびBLBPである、TBIのマーカーがアルドラーゼCおよびPEA15である、TBIのマーカーがアルドラーゼCおよびB-クリスタリンである、TBIのマーカーがアルドラーゼCおよびBLBPである、TBIのマーカーがPEA15およびB-クリスタリンである、TBIのマーカーがPEA15およびBLBPである、TBIのマーカーがB-クリスタリンおよびBLBPである、TBIのマーカーがGS、アルドラーゼC、およびPEA15である、TBIのマーカーがGS、BLBP、およびPEA15である、TBIのマーカーがGS、B-クリスタリン、およびPEA15である、TBIのマーカーがGS、B-クリスタリン、およびBLBPである、TBIのマーカーがGS、B-クリスタリン、およびアルドラーゼCである、TBIのマーカーがGS、BLBP、およびアルドラーゼCである、TBIのマーカーがアルドラーゼC、PEA15、およびB-クリスタリンである、TBIのマーカーがアルドラーゼC、PEA15、およびBLBPである、TBIのマーカーがアルドラーゼC、B-クリスタリン、およびBLBPである、ならびにTBIのマーカーがPEA15、B-クリスタリン、およびBLBPであるものを含む。先の複数の例において、TBIは、列挙されたタンパク質、その分解産物、またはそれらの両方であり得る。

#### 【0049】

##### キット

本発明はさらに、バイオマーカーのセットを特異的に結合する試薬を含むキットを提供する。一実施形態において、当該バイオマーカーは、アルドラーゼC (ALDOC) および脳脂質結合タンパク質 (BLBP) を含む。当該複数の試薬は典型的には、ポリヌクレオチドまたは抗体であり、検出可能なマーカーで任意に標識されている。キットは任意に、当該試薬を収容するための少なくとも1つの容器および/または検査試料における外傷性脳損傷の状態を判定するための試薬の使用についての説明書からさらになる。一部の実施形態において、キットはさらに、星状細胞リントンパク質PEA-15 (PEA15) および/またはグリア線維性酸性タンパク質の20~30kダルトン断片 (GFAP-BDP) を特異的に結合する試薬を含む。一実施形態において、当該抗体は、モノクローナル抗体である。一実施形態において、バイオマーカーのセットは、最多3、4、5、6、7、8、9、または10のバイオマーカーからなる。

#### 【0050】

##### 実施例

以下の実施例は、本発明を説明するために、ならびに本発明品を作製および使用する上で当業者を支援するために呈されている。実施例は、いかなる方法においても、さもなければ本発明の範囲を制限するよう意図するものではない。

#### 【0051】

##### 実施例1：機械的外傷後のヒト新皮質星状細胞の細胞運命

本実施例は、異なる重症度を用いた急性圧力-パルス外傷性伸張の30分後および48時間後のヒト星状細胞の母集団スコアを示す(図1、PSIは比較的軽度な損傷について

は 2.6 ~ 4.0 に、および重度な損傷については 4.4 ~ 5.3 に及ぶ)。ヒト星状細胞を 16 ~ 18 週の寄贈された胎児新皮質脳標本から分離し、精製し、次に変形可能な膜上で分化させた (Wanner, 2012)。細胞膜の受傷/損壊、機械的穿孔 (Barbee, 2005) は、核形状評価 (真ん中の図、染色された核、固定後にヘキスト染色、ややピンク色の点あり、ヨウ化プロビジウム (PI) で染色した核小体) を伴う、生培養物における PI の取り込みを用いて判定した。細胞死は、核濃縮 (コンパクトになった染色質ならびに明るいヘキストおよび PI 染色を有する核濃縮した核) を伴う PI 取り込みによって判定した。細胞統合性損壊の有意な百分率は損傷 30 分後に示される (左のグラフ) のに対し、有意な細胞死は損傷 2 日後に存在した (右の棒)。

#### 【0052】

実施例 2 : 機械的に外傷を受けたヒト星状細胞は、損壊した状態における長期の持久性を示す

本実施例は、機械的に外傷を受けたヒト星状細胞が、受傷後の損壊した状態においてマウス星状細胞に対して長期の持久性を示すことを実証する (図 2)。伸張中の色素の取り込み (0.05 mM の 10 kDa デキストランローダミン)、ならびにアポトーシスによる細胞死 (10  $\mu$ M のカスパーゼ 3 基質を用いたカスパーゼの活性化) を、温度および湿度を制御された回転ディスク共焦点顕微鏡上でのタイムラプス撮影を用いてモニターした (Levine ら, 2016)。ヒトの外傷を受けて損傷しおよび再密封したヒトアストログリアは、統合性の損壊後の長期の持久性を示す。

#### 【0053】

図 3 に示すように、ヒト星状細胞の機械的外傷は、周辺流体へのアストログリアマーカーの有意な放出を生じさせる。図 3 A は、外傷を受けた星状細胞由来の濃縮した、変性した条件培地のイムノプロット (Levine ら, 2016、Sondelj ら, 2011) がグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP) ならびにその公知のおよび新たに識別された分解産物 (BDP) 対アルドラーゼ C (ALDOC)、脳脂質結合タンパク質 (BLBP)、星状細胞リントタンパク質 (PEA15) ならびに クリスタリン (CRYAB) の異なる放出特性を示すことを示す。完全な範囲のシグナル強度を捕捉するために、イムノプロットの複数の曝露からのシグナルをデンシトメトリーで測定し (光学濃度)、単回曝露と符合させるために尺度を合わせた。示される数のドナーからのシグナルの尺度を合わせた密度を、図 3 B ~ 図 3 G において示すグラフにおいて対数空間軸上にプロットする。公知の上位の GFAP の BDP (37 ~ 50 kDa) は、時間 (三角) および重症度 (損傷 5 時間後の円) とともに放出の増大を示した。下位の新たな GFAP の BDP は、損傷 1 日後および 2 日後にのみ有意に増加し、これらを細胞死と関係付けた (図 1 を参照されたい)。ALDOC、BLBP および PEA15 は既に、損傷 30 分後に 2 桁を上回って有意に増加し、このようなレベルの上昇は、測定した損傷後のすべての時点において流体においてとどまっていた。CRYAB レベルは、損傷 5 時間後および 2 日後に重症度の違いを示した。

#### 【0054】

実施例 3 : 外傷を受けたヒト星状細胞の細胞運命と関係する神経外傷バイオマーカー

% 膜透過性細胞 (% 受傷、赤色データ、左) に対する、ならびに PI 色素取り込みアッセイおよび核の形態 (図 1 および図 2 を参照されたい) を用いた外傷を受けたヒト死星状細胞の百分率と相関した、ALDOC、BLBP、PEA15 および CRYAB についての外傷放出性アストログリアマーカーレベル (図 3 を参照されたい) の二重プロットを図 4 A に示す。回帰線 (R<sup>2</sup> 値) および p 値は、相関有意性を示す。ALDOC、PEA15 および CRYAB は、ヒトアストログリア細胞受傷と最も良い相関を示す。CRYAB、BLBP および ALDOC はまた、外傷後の細胞死を伸ばすことと相関していた。

#### 【0055】

図 4 B は、GFAP 外傷 - 放出の二重プロットを示し、これは、GFAP が機械的外傷によって負わせられる細胞死と相関していること、および細胞受傷と弱い/まったくない相関を示している。プロットは、群分けした GFAP 断片の大きさによって分離される (

10

20

30

40

50

上位バンド：50～37 kD、下位バンド：25～19 kD)。

【0056】

実施例4：星状細胞損傷バイオマーカー選択戦略

候補となる星状細胞損傷バイオマーカーを次の戦略によって選択した(図5)。TBIのCSFプロテオームを、19名の重度TBI患者からのCSF試料を用いたボトムアップ質量分析によって編集し、9名の対照被験者からのCSFプロテオーム(Cr1)と比較した。このTBIのCSFプロテオーム(483のタンパク質)は、対照CSFのプロテオーム(402のタンパク質)由来の252のタンパク質と重複しており、残りは231の独特なTBIのCSFタンパク質であった。このTBIのCSFタンパク質の60%は、公開された血漿プロテオームにおいても存在し(Omennら, 2005、Schenkら, 2008)、多量な場合、TBIバイオマーカーとして適切ではないかもしれない。候補となる脳損傷マーカーを選択するために、本発明者らは、単純な外傷モデルにおけるプロテオームアプローチを用いた、外傷を受けた星状細胞から放出されるタンパク質を判定し、79の差次的に放出されるタンパク質を、圧力-パルス伸張後にマウス星状細胞を伸張して識別した(Levineら, 2015、Sondejら, 2011)。

10

20

30

40

50

【0057】

この「トラウマトーム」から、48のタンパク質(62%)がTBIのCSFにおいて存在した。非常に星状細胞に豊富なタンパク質(他の細胞タイプよりも5倍以上多い; Cahoyら, 2008)を選択することで、11の損傷バイオマーカータンパク質の小さな候補プールが得られた(黒色で囲んだ3つのフィールド)。これらには、3つのタンパク質GFAPおよびペルオキシレドキシニン6(Prdx6、両方とも血漿中に存在)ならびにN,N-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ(DDAH1、3の中央のフィールド)が含まれていた。追加の3つのタンパク質は星状細胞に豊富であり、「トラウマトーム」タンパク質は、TBIのCSFに存在し、および対照CSFにも存在し、当該タンパク質は、アルドラーゼC(ALDOC)、クラスタリン(CLUS)およびアポリポタンパク質E(APOE、3の下位のフィールド)であった。クラスタリンおよびAPOEは星状細胞によって分泌し、それらのレベルは、外傷後に流体中で減少した(矢印)。星状細胞に非常に豊富である追加の5つの外傷放出性タンパク質は、ショットガン質量分析を基にしたTBIのCSFプロテオームリストにおいて列挙されなかった。これら5つは、エズリン(Ezr)、Fボックスオンリータンパク質2(FBX2)、グルタミンシンターゼ(GS)、星状細胞リンタンパク質15(PEA15)および脳脂質結合タンパク質(BLBP、5の上位フィールド、破線の輪郭)であった。GFAP、ALDOC、GS、BLBP、PEA15およびCRYABは、その後の免疫学的検査および質量分析検査において含まれていた。

【0058】

実施例5 . アストログリア損傷マーカーは、損傷当日および損傷後5日間連続でTBI患者のCSFにおいて上昇する

本実施例は、アストログリア損傷マーカーが、損傷当日および損傷後5日間連続で、TBI患者対後向き観察コホートにおける対照のCSFにおいて上昇することを実証する。図6Aは、30 $\mu$ lの対照CSF(Cr1)とともに54歳男性重度TBI患者(1a~1f)の損傷当日(i)および損傷後の5日間(i+1~i+5)からの30 $\mu$ lのCSF試料の縦断的セットのGFAP(BDP37、25、20および18 kDaとともにある50 kDa)およびS100 およびALDOC(40 kDa)、GS(45 kDa)、BLBP(15 kDa)およびPEA15(15 kDa)のイムノプロットを示す。BLBPおよびPEA15は、損傷当日に最強のシグナルを、および損傷3日後に第二の上昇を示し、このことは、患者の二次的な虚血性エピソードと関係していた。出血指標のAPOB(130および250 kDa)は、損傷後経時的に変化する強度を有しており、健常CSFからはなく、CSFマーカーであるPTGDS(22 kDa)は、Cr1のCSFにおいて頑強なシグナルを有していたが、TBI後および損傷翌日の急性期にはなく、その損傷後の日々においてシグナルを徐々に回復した。

## 【0059】

図6Bは、4名のTBI患者(2.~5.)由来の6個のCSF試料(30 $\mu$ l/レーン)を示し、損傷当日(患者2、3、4a)および損傷翌日(4b、5)に健常な43歳男性由来の対照CSFとともに、GFAPおよび「上位の」BDPのシグナル強度が50~37kDaで変化すること、ならびに25/23kDa二重線、20kDaおよび18kDaの小分子BDPを含む「下位/新たな」GFAPのBDPを示す。上位のGFAPのBDP内にある個々のバンドは、たがいに対して類似の強度を有するのに対し、下位のGFAPのBDP間での相対的な量は、患者間で特徴的に異なっていた。

## 【0060】

図6Cは、CSFイムノプロットを示し(30 $\mu$ l/レーン)、5名のTBI患者(6.~10.)における全長のALDOC(40kDa)および3名のTBI患者(8~10)における損傷4日後の変化する強度の38kDaのALDOCのBDPを実証している。健常な対照被験者は、ALDOCを示さなかった。

10

## 【0061】

散布図(図6D~図6K)(同日および患者の平均化した複製物)を、損傷当日および損傷5日後の20~25名のTBI患者ならびに8~11名の対照のCSFにおける目盛り付きデンストメトリーを用いてイムノプロットシグナルから測定した対数尺度光学濃度(図3を参照されたい)を示す四分位間範囲(interquartile range)(90パーセントイルおよび10パーセントイル)、中央値(線)および幾何平均(破線)を有する箱ひげ図とともにプロットする(n:1日当たりの被験者数)。(図6D)上位GFAPシグナル(50~37kDa)は、TBI全日でCr1に対して高く( $P < 0.06$ )、示すように経時的に低かった( $P < 0.05$ 、反復測定ANOVA、方法を参照されたい)。(図6E)下位GFAPのBDP(25~18kDa)は、Cr1に対してTBIにおいて高く( $P < 0.03$ )、損傷翌日と損傷後のその後の日々の中で低かった( $P < 0.05$ )。(図6F)ALDOC( $P < 0.004$ )および(図6G)GS( $P < 0.001$ )は、Cr1に対して低くなることなくTBIのCSFにおいて各日が高かった。(図6H)BLBP( $P < 0.03$ )および(図6I)PEA15( $P < 0.004$ )は、より大きなシグナル範囲で示す日にCr1に対してTBIにおいて高いレベルを有していた。血清タンパク質APOB(図6J)は、Cr1のCSFに対してTBIにおいて高かった( $P < 0.005$ )のに対し、CSF標準物質PTGDSは、TBIに対してCr1において強く( $P < 0.004$ )、レベルは、種々の伸びへと一過性に枯渇した後、転帰依存性回復をした(図7を参照されたい)。

20

30

## 【0062】

## 実施例6:バイオマーカーCSF量のTBI患者転帰相関

本実施例は、新たな、細胞死と関係する下位のGFAP分解産物のCSFレベルが、TBIの生き残った者に対して生き残らなかった者において2桁ほどより高かったことを実証する(図7)。PEA15レベルは、TBI後の生き残った者に対して、生き残らなかった者において2~3桁高く、損傷3日後のp値は、 $p = 0.07$ であった。損傷後に一過性に低下する健常マーカーPTGDSのレベルは、TBIの生き残った者において損傷3日後までに有意な回復を示したのに対し、生き残らなかった者においては、レベルは低いままであった。

40

## 【0063】

## 実施例7:群分けしたアストログリアマーカーの因子を用いたTBIの範囲の評価

本実施例は、損傷の範囲にわたるTBIの評価において有用な因子を創出するためのアストログリア外傷マーカーの群分けを実証する。マーカーパネルによって包含される多様なデータを組み合わせるために、スピアマン相関係数を基にした教師なし学習アルゴリズムを採用した多変量分散分析を使用した(因子分析、FabrigarおよびWegenier, 2012、Tucker, 1997)。このアプローチは、神経外傷バイオマーカーの分野にとって新しく、当該マーカーのTBIのCSFシグナルを基にして本実施例においてマーカーを群分けすることによって潜在的な神経外傷容態を明らかにする。公知の

50

アストログリアマーカー S 1 0 0 、公知のおよび新たな B D P を有する細胞死マーカー G F A P、ならびに出血指標 A P O B を A 因子へと群分けした ( 図 8 A、灰色、C r o n b a c h 係数 = 0 . 9 2 1 を用いて組み合わせられた負荷を用いる)。新たな「細胞漏出性」の、B D P を有する細胞受傷マーカー A L D O C、B L B P、G S および P E A 1 5 を B 因子へと群分けした ( = 0 . 8 7 9 )。図 8 B において示されるように、A 因子の一時的な特性は、損傷後の日々わたって有意に低下したのに対し、B 因子の軌跡は低下しなかった。A 因子のデータは、損傷後の数日間における生き残った者と生き残らなかった者の間の有意差を示した ( 図 8 C )。B 因子のデータは生き残りの差を示さなかった ( 図 8 D )。マーカー全部に対してシグナルが存在する 1 2 名の T B I 患者からの標準化されたマーカー密度読み取りを、図 8 A において示される負荷を用いて A 因子および B 因子へと変換した後、たがいに対してプロットした ( 図 8 E )。T B I の範囲における不均一性は、この二重プロットにおける組み合わせられたパネルデータの広がりにおいて反映されている。分類ツリー分析 ( 図 8 F ) は、所与の因子閾値 ( B r e i m a n , 1 9 8 4 ) による T B I の対照、生き残った者および生き残らなかった者を区別する境界を決定した。複数の因子へと群分けしたバイオマーカーレベルを用いた患者区別閾値を図 8 E における複数の線によって示す。

10

#### 【 0 0 6 4 】

この算術的な多変量教師なし学習アプローチは、このパネルのマーカーを、相関係数から得られた重み ( 負荷 ) を与えられた各マーカーと組み合わせ、患者コホートにおける分散が、このマーカーの寄与によってどれだけ多く捕捉されているかを表す。列挙されたマーカーの全体的な高い負荷 ( 0 . 8 ~ 0 . 9 5 ) は、この 2 つの因子への頑強な分類を提供する。A 因子は、細胞死、出血および組織喪失と関係したマーカーを反映する。B 因子は、細胞漏出、受傷および組織損壊と関係したマーカーを反映する ( 図 8 A を参照されたい )。結果として生じる値は、所与のコホート内での各患者のバイオマーカーパネルの読み取りを基にした当該患者の独特な位置を提供する。このアプローチは、この T B I コホートにおいて観察される患者の多様性の大部分を確実に網羅している。因子分析は、たった数個のバイオマーカーの読み取り ( 多くの異なる入力を用いたより複雑な主成分分析と比較される ) を用いて T B I において観察される大きな患者の不均一性を捕捉するための簡素化されたフレームワークを提供する。臨床試験において、検査キットからのこれらのバイオマーカーパネルの読み取りは、他の患者と比較して個々の T B I 患者の価値のあるモニタリング情報を提供することができる成長性データベースへと入力することができる。このツールは、患者の評価を簡素化して、組織損壊および組織死滅の生体液徴候を用いた進行中の患者の評価の頑強性を強化することができる。

20

30

#### 【 0 0 6 5 】

実施例 8 : 外傷を受けたヒト星状細胞および T B I 患者における外傷重症度の区別

本実施例は、対象の標本における B L B P レベルと G F A P レベルの比が、外傷を受けたヒト星状細胞および T B I 患者における外傷重症度を区別するために使用することができることを実証する。「細胞死」マーカー G F A P における「細胞漏出性」マーカー B L B P の流体レベル比における有意差は、インビトロ ( 図 9、C M、条件培地、左 ) でおよび T B I 患者 ( C S F、図 9 の右側パネル ) で示される。6 名のドナー由来のヒト星状細胞は異なる重症度で、示される P S I 圧力 - パルスによって外傷を受けた。中等度対重度 T B I 患者を、C S F における 1 4 倍の異なる B L B P / G F A P 比によって識別する ( n = 9 )。中等度の T B I 患者を、8 を超える蘇生後グラスゴー昏睡尺度 ( G C S ) によって定義するのに対し、重度 T B I 患者は 8 未満の G C S を有していた。

40

#### 【 0 0 6 6 】

実施例 9 : A L D O C レベルと T B I 患者の転帰との相関

図 1 0 に提示されるデータは、T B I 6 か月後の拡張グラスゴー転帰尺度 ( G O S e ) を用いて評価される重度 T B I 患者の転帰に対してプロットされた A L D O C および G F A P のレベルを示す。1 2 ( 1 1 ) 名の T B I 患者からのデータは、A L D O C の上昇を早期に ( 白色、i、i + 1、+ 2 )、および好ましくない転帰を有する患者における損傷

50

後後期に（黒色、 $i + 3$ 、 $+ 4$  および  $+ 5$  の損傷後の経過日）示すのに対し、GFAPレベルは、損傷後の経過日において高いレベルを同様に維持することはなかった。

【0067】

実施例10：TBIマーカーと脊髄損傷の重症度および転帰との相関

本実施例は、ブタ動物モデルにおけるアストログリア外傷マーカーと脊髄損傷の重症度との相関を実証する。図11：急性UCLAアストログリアマーカーの放出は、ブタ脊髄損傷後の組織病理学的重症度の基準、組織喪失および出血と相関した。A)急性（損傷15～30分後）UCLAアストログリア損傷マーカーALDOC、BLBPおよびグルタミンシンターゼ（GS）ならびにGFAPのCSFシグナル密度を、確立した損傷重り落下モデル（Leeら，2013）を用いた脊髄挫傷損傷の1週間後のユカタンブタ脊髄における体軸方向の腔径に対してプロットする。スピアマン相関は、組織喪失の増大と有意に関係したこれらのアストログリアCSFマーカーレベルの急性上昇を示す。組織病理学：当該腔の体軸方向の伸展は、ズダンブラック染色した水平方向の脊髄切片における尺度である（所与のp値および $R^2$ 値、 $n = 10$ 個体）。B)ALDOCおよびGSの急性（損傷15～30分後）のCSFシグナル密度は、損傷した水平方向の脊髄切片におけるブタ免疫グロブリン（IgG）蛍光を用いて測定され併行染色した非損傷の水平方向の脊髄切片によって標準化された、損傷1週間後の白質間質性組織出血と有意に関係していた。体軸方向の連続画像に関するこのような標準化された白質蛍光シグナルを各動物についてプロットし（ $n = 8$ 個体）、曲線下面積（AUC）を先的非損傷シグナルレベルとの距離にわたって測定した。

10

20

【0068】

図12は、ブタ脊髄損傷後のALDOCおよびGFAPの急性上昇と転帰との相関を示す。歩行の回復は、ブタ脊髄損傷後のALDOCおよびGFAPの急性CSFレベルと関係している。ユカタンブタにおける脊髄損傷後の歩行回復のレベルを示すブタにおける歩行運動の回復について確立された検査であるブタ胸部損傷行動尺度（PTIBS）（Leeら，2013）を用いた損傷1週間後の歩行の回復を予測するALDOC（黒色の点）およびGFAP（白色の点）の急性損傷後CSFレベル（損傷15～30分後）をプロットする。有意な逆相関は、ほとんど歩行運動していない動物における比較的高いALDOC（ $R^2 - 0.88$ ）およびGFAP（ $R^2 - 0.89$ ）のレベルで存在し、当該動物は、後肢を引き摺り、せいぜいゆっくり歩行し、損傷1週間後まで歩行した動物における低い急性ALDOCおよびGFAPレベルであった。予備的なバイオマーカー閾値は、背景色によって示されており、回復中の動物の非常に早期の区別の実現可能性を示している。

30

【0069】

実施例11：アストログリアのTBIマーカーの定量的質量分析

本実施例は、定量的質量分析が損傷後のアストログリアのTBIマーカーのレベルの上昇を確認して、免疫学的方法が標準化されていない場合の免疫学的方法を用いるときに制限される客観的マーカー量比較を提供することを実証する。抗体非依存性の同時および定量的質量分析アプローチである多重反応モニタリングを、神経外傷バイオマーカー分野において最初に用いて、TBI患者のCSFにおける公知のおよび新たなアストログリアマーカーの量を比較した。マーカー特異的ペプチドを定義した量の添加した同位体標識ペプチドと併行して測定する（表6を参照されたい）。図13Aは、ALDOCおよびGFAPが損傷当日にTBIのCSFにおける最高濃度を有していたことを示し、両方とも示される他のマーカーのレベルとは有意に異なっていた。さらに、BLBPレベルは損傷当日、GSレベルよりも有意に高かった。図13Bに示されるように、TBIの3日後までに、ALDOCレベルは、GFAP濃度よりもある規模だけ異なって、有意に優れていた。

40

【0070】

実施例12：TBIのCSFおよび血液におけるALDOCおよびBLBPの定量的免疫アッセイ

本実施例は、標準曲線を用いたTBI標本のCSFおよび血液におけるALDOCおよびBLBPのレベルの抗体を基にした定量的評価を提供する。図14における箱プロット

50

は、ALDOC（左側）およびBLBP（右側）ならびにこれらのCSFおよび血液（血清および血漿）における量の中央値ならびに四分位間濃度範囲を示す。挿入図は、2つの濃度範囲およびイムノプロット検出条件を用いたアイソフォーム特異的組換えタンパク質ALDOCおよびBLBPの既知の量を用いた用量応答を示す（表7を参照されたい）。

#### 【0071】

実施例13：重度TBI患者の血液試料におけるアストログリアバイオマーカーの検出  
本実施例は、アストログリア外傷マーカーが重度TBIに罹患している患者から得た試料を用いた血液検査と適合性があることを実証する。図15Aは、1つの対照血漿試料（Cr1）とともに3名の異なる重度TBI患者からの縦断的血漿試料を示す。多量のタンパク質がイムノアフィニティアルブミンおよび免疫グロブリン枯渴カラム（Sigma, ProteoPrep）を用いて回収される。25kDaの新たなGFAP分解産物は、損傷当日一度も検出されなかった（i）が、損傷後のその後の日々において出現した。ALDOCは一貫して、3名の患者全員におけるすべての時点において存在していた。短命マーカーのPEA15およびBLBPは、損傷当日に頑強に存在しており、各患者におけるその後の損傷後の日々において異なる時間特性を示した。最多11の対照血液試料（Cr1）と比較される22名の重度TBI患者から得た26の血清試料および24の血漿試料由来のALDOC（B1）、BLBP（B2）、GFAP/25kDaのBDP（B3）およびPEA15（B4）についての目盛り付きデンストメトリーシグナルを図15Bにプロットする。縦断的な同一患者のデータを灰色の線によって結ぶ。ALDOCは、損傷当日および損傷後の毎日で有意に上昇したのに対し、GFAPは損傷翌日に有意に高い開始となった。BLBPおよびPEA15は、対照レベルに対して損傷当日は有意に高かった。

10

20

#### 【0072】

実施例14：ALDOC対GFAPの拡張した検出ウィンドウ

本実施例は、縦断的な重度TBI血清試料を用いて、ALDOC対GFAPの拡張した検出ウィンドウを実証する。ALDOCは、GFAPの25kDaのBDPの最初の検出の19時間前に検出され、ALDOCシグナルは、37kDaの公知のGFAPのBDPである特異的GFAPシグナルの最後のものよりも2日間以上長く存在していた（図17）。

30

#### 【0073】

実施例15：BLBP分解産物

全長の15kDaのBLBPに加えて、3kDaのBLBP特異的断片を、損傷当日および種々の損傷後の日々におけるTBIのCSFおよび血漿における2つの抗体を用いて検出した。結果を図17に示す。

#### 【0074】

実施例16：TBIマーカーの急性循環様相

図18は、損傷した血液脳関門を通る直接的な通過による新たなアストログリア損傷マーカーの急性循環様相についての証拠を提示する。図18のパネルAは、TBI直後（損傷3時間後）および損傷翌日の同じ重度TBI患者のCSFおよび血清中のALDOC、BLBPおよびPEA15とともにGFAPの25kDaのBDPについてのイムノプロットを示す。GFAPは、CSFにおいて最初に、および血清中で1日遅れて現れるのに対し、ALDOCは、両時点で両方の生体液中に存在していた。BLBPおよびPEA15は、血清中に最初に存在し、CSFに遅れて出現した。4つのアストログリアマーカー全部の対数空間軸におけるトレースは、CSFから血清へのGFAPの25kDaのBDPについての切り替え、生体液中で安定したALDOCのより定常の存在、ならびに血清中の短命のBLBPおよびPEA15の存在の後のCSFにおける出現および遅延した上昇を提供する（図18B）。

40

#### 【0075】

これらの観察は、損傷部位から循環中へのALDOC、BLBPおよびPEA15の直接的な通過を示唆する。3つのマーカーは全部、アストログリア突起に局在し、細部末端

50

は、毛細管および血管を完全に巻くことが公知である (Mathiisenら, 2010)。外傷性損傷は軽度TBIでさえ、血管周辺のアストログリア線維の破損を生じ、これらのマーカーが血液中へ直接通過することを可能にする (Barzoら, 1996、Hicksら, 1993、Kornら, 2005)。GFAPは、アストログリア末端には局在しておらず、図3に示すように、25kDaのGFAPのBDPは、生じるのに時間がかかり、CSFにおいてまず蓄積することをもたらす、および血清中でその後出現することをもたらす細胞死の間に遅延した放出があることを示唆している。血液脳関門の開放を介したアストログリア終足に関する直接的な通過の利点は、非常に急性の損傷後血液検査を可能にすることにある。

#### 【0076】

実施例17：軽度TBI患者の血清におけるアストログリア損傷マーカーの早期検出  
本実施例は、軽度TBI患者の血清における最高レベルのアストログリア損傷マーカーの頑強なおよび早期の検出を実証する。損傷後早期の7名の軽度TBI (mTBI) 患者由来の10個の血清試料を1個の対照血清 (Cr1) とともに図19に示す。試料を、GFAP、ALDOC、BLBPおよびPEA15についてプローブ付けした。特異的GFAPシグナルはかすかであり、1名の患者が損傷31時間後までにGFAP/25kDaのBDPを示す (患者番号II) 4名のmTBI患者に制限された。ALDOCの38kDaのBDPは、対照に対してmTBI患者全員において一貫しておよび強く高かった。BLBPおよびPEA15は、変化し得る強度を示し、5名のmTBI患者において存在していた。ALDOC、BLBPおよびPEA15は、損傷1時間後にすでに検出された。脳震盪患者はコンピュータ断層撮影 (CT) 走査を受け、病変/出血に関して陽性の所見を有するものはCT+、おそらくmTBI合併症患者であり、可視的な創傷を有さない患者はCT陰性であり、または合併症がないものとして分類された (Bukira, 2015)。ALDOCの頑強な存在ならびにBLBPおよびPEA15についての差次的なシグナルは、脳震盪患者における危険の識別を補強するのに適している。

#### 【0077】

実施例18：小児TBIにおける血清ALDOCの急性のおよび頑強な検出  
図20は、小児TBI患者の血清試料におけるALDOCの急性のおよび頑強な検出を示す。TBIに罹患している5名の乳児 (1~4か月齢) 由来の損傷当日の血清試料を、22か月齢の子供由来の対照血清の隣に示す。頑強なALDOCシグナルは、対照症例に対して乳児TBI全員において検出されるが、2名の乳児のみが弱いGFAPシグナル (34kDaのBDP、未説明、症例番号I、III) を示した。

#### 【0078】

実施例19：アルツハイマー病についてのCSFマーカーとしてのALDOC  
本実施例は、アルツハイマー病の慢性神経変性容態に罹患している患者に由来するCSF試料が全長 (40kDa) および38kDaのBDPのALDOCの等しく異なるレベルを呈することを実証する。対照的に、急性TBI患者のCSFにおいて検出されたALDOCは、38kDaのBDPに対して全長 (40kDa) の明確な優勢を示す。1名の重度TBI患者 (症例番号I) および2名の年齢を一致させた対照 (症例番号VIおよびVII) および負荷のためのタンパク質染色 (ボンソーS) と比較した5名のアルツハイマー病患者 (AD、病期0.5、症例番号IIおよびIII; 病期1、症例番号IVおよびV、Faganら, Science Transl. Med. 2014を基にしている) 由来の7個のCSF試料を図21に示す。TBI患者は、損傷4日後に主として全長のALDOCおよびわずかな38kDa断片を有していたのに対し、慢性変性AD試料は、全長および38kDaのALDOCのBDPの等しい存在を示していた。本データは、急性および慢性の脳損傷が、ALDOC/ALDOCのBDPの比を基にして識別することができることを示唆する。

#### 【0079】

10

20

30

40

## 【表 2】

表2：患者のCSFにおける全長のALDOCとその38kDaタンパク質分解性断片との比を用いた、TBIとアルツハイマー病との識別

|        | ALDOC 40kD/38kD<br>使用される抗体全部 | ALDOC 40kD/38kD<br>使用される同じ抗体 (E9) |
|--------|------------------------------|-----------------------------------|
| AD     | 0.61 ± 0.25                  | 0.42 ± 0.14                       |
| TBI    | 3.63 ± 3.26                  | 8.56 ± 0.85                       |
| AD対TBI | p = 0.0001                   | p = 0.00002                       |

10

## 【0080】

本表は、アルツハイマー病（AD）患者および中等度～重度TBI患者のCSFにおける全長のALDOC（40kDa）とその分解産物（38kDa）の平均比を示す。当該タンパク質に関する異なるエピトープに対する異なるALDOC抗体は結果的に、40対38kDaのバンドのシグナル強度の強調を変化させた。組み合わせられた平均した20個のAD試料および25個のTBI試料は、ALDOC抗体全部の左側のデータにあった。平均AD比は、両側T検定によって有意である平均TBI比よりも6倍小さかった。右側には、10個のADのCSF試料および5個のTBI患者の試料を、ALDOC検出のための同じ抗体（E9）を用いて分析した。また、より多量の全長シグナルを示すTBIとより多量のBDPのALDOCシグナルを示すADの間には有意な20倍の差があった。データ例を図21に示す。このことは、TBIと慢性神経変性疾患との違いを提供する。両データ選択は結果的に、慢性神経変性容態を意味するALDOCの主要な38kDaのBDPの量の増加を基にした有意に異なる比を生じる。急性TBIは、全長の40kDaのALDOCのより多くの量によって、急性におよびTBI後最長5日間、容易に識別することができる。

20

## 【0081】

## 実施例20：多変量判別解析

多変量分類ツリー分析（Breiman, 1984）を用いて、損傷に関する対照および生き残るまたは生き残らないTBI患者へと被験者コホートを最も正確に分割するマーカーを判定し、各々30μlのCSF試料のイムノプロット法によって分析した。AlldocおよびPTGDSの2つのマーカーのみを用いて100%の正確性を得る際に、（表3）、当該マーカーのみが将来の非侵襲性アッセイのために血中で検出可能であることを知るために本解析を反復した（表4）。表3に提示されるデータに使用するマーカーは、AlldocおよびPTGDSであったのに対し、考慮されたが使用されなかったマーカーは、GFAP、PEA15、GFAP下位、S100B、BLBP、GS、APOB、PTGDS、およびAlldocの38kDであった。表3はしたがって、TBIの検出および生き残る者の転帰の予測を、分類ツリー解析におけるマーカー全部を用いて要約する。この解析は、ALDOCおよびPTGDSを最良の区別マーカーとして選択した。検査されるマーカー全部のうち、当該マーカーを算術的な教師なし学習アプローチによって利用した。複数の群、n = 21、対照全部、および30TBI試料の損傷全日のTBIとした。示される7ng/30μlのCSFは、イムノプロット法を用いると、233ng/mlのCSFの濃度と等しい。群分けおよび予測された転帰は100%正確に符合するので、正確性は優れていた。図22は、表3の閾値の区別の説明を提供する。

30

40

## 【0082】

## 【表 3】

表3：TBIおよび生き残った者の転帰の予測の検出

| 群 | n  | Aldo C<br>[OD] (ng/30ul CSF) | PTGDS<br>[OD] | 予測             |
|---|----|------------------------------|---------------|----------------|
| A | 8  | $\geq 0.078$ (7ng)           | $< 0.174$ または | TBIを生き残る者(重度)  |
| C |    | $\geq 0.078$ (7ng)           | $\geq 0.202$  | TBIを生き残る者(中等度) |
| B | 2  | $\geq 0.078$ (7ng)           | 0.174~0.202   | TBIを生き残らない者    |
| D | 11 | $< 0.078$ (7ng)              | $> 0.202$     | 対照 (健常被験者)     |

10

## 【0083】

表4は、新たな血液適合性グリアマーカーを用いたTBIの検出および生き残る者の転帰の予測を示す。表4(1)について使用したマーカーは、総Aldo Cとした。考慮されたが使用されなかったマーカーは、GFAP下位、BLBP、PEA 15、Aldo Cの38kD分解産物(BDP)であった。考慮されなかった(省略された)マーカーは、総GFAP、S100B、GS、APOB、およびPTGDSであった。群は、n=21の対照全部、およびコホート全体における合計30名の損傷当日のTBI患者であった。正確性は95%であり、重みのない確率補正は、 $20/21$ または $0.952$ であった。96%の等しい優先性確率の正確性 $= 0.96 = (1.0 + 1.0 + 0.875)$ があった。図23は、表4の閾値の区別の説明を提供する。

20

## 【0084】

## 【表4】

表4：TBIマーカーを用いたTBIの検出および生き残る者の転帰の予測

| 群 | n  | 総Aldo C [OD] | 予測          |
|---|----|--------------|-------------|
| A | 4  | 0.078~0.22   | TBIを生き残る者   |
| B | 3  | 0.22~0.4     | TBIを生き残らない者 |
| C | 3  | $\geq 0.4$   | TBIを生き残る者   |
| D | 11 | $< 0.078$    | 対照 (健常被験者)  |

30

## 【0085】

## 【表5】

表4におけるデータの分類マトリックス

|         | 予測される対照 | 予測される死亡 | 予測される生き残る者 | 合計 |
|---------|---------|---------|------------|----|
| 真-対照    | 11      | 0       | 0          | 11 |
| 真-死亡    | 0       | 2       | 0          | 2  |
| 真-生き残る者 | 0       | 1       | 7          | 8  |

40

## 【0086】

## 【表 6】

受信者操作特性 (より多数のnで適用可能)

| 群      | 面積     | N  | N 補正 | 正確性の確率 |
|--------|--------|----|------|--------|
| 対照     | 1.0000 | 11 | 11   | 1.0    |
| 死亡     | 0.9737 | 2  | 2    | 1.0    |
| 生き残った者 | 0.9904 | 8  | 7    | 0.875  |

10

## 【0087】

実施例 21 : マーカーシグナル密度 [OD] と CAT 走査撮影データとのスピアマン相関

二次的な TBI 進行は、二次損傷としばしば関係する頭蓋内圧 (ICP) の上昇を生じる可能性がある。細胞死滅マーカー GFAP 下位 BDP (19、20、25 kDa 二重線) のレベルと ICP との有意な相関が観察される。出血マーカー APOB は、実質外 + 実質内病変体積および正中線偏位と有意に相関する。これらの CT 所見は両方とも、硬膜外血腫、硬膜下血腫、くも膜下出血および実質内病変を含む脳の出血と関係する。グリア損傷マーカー BLBP および PEA15 は、細胞死グリアマーカー GFAP 下位 BDP と同様に、脳組織挫傷、頭蓋内出血およびびまん性軸索損傷を含む実質内病変と相関する。

20

## 【0088】

## 【表 7】

表5 : マーカーシグナル密度と CAT 走査データとのスピアマン相関

| 新たな TBI マーカーパ<br>ネル | ICP, 頭蓋内圧 |        | 正中線偏位<br>(浮腫徴候) |        | 実質外+実質内<br>病変体積 |        | 実質内<br>病変体積 |       |
|---------------------|-----------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|-------------|-------|
|                     | 相関        | p 値    | 相関              | p 値    | 相関              | p 値    | 相関          | p 値   |
| 下位 GFAP             |           | 0.0005 |                 |        |                 |        |             |       |
| BDP                 | 0.834     | 9      | 0.121           | 0.733  | 0.676           | 0.136  | 0.775       | 0.333 |
| ALDOC               | -0.165    | 0.614  | -0.0872         | 0.776  | -0.126          | 0.72   | -0.4        | 0.517 |
| BLBP                | 0.204     | 0.559  | -0.194          | 0.58   | 0.116           | 0.803  | 0.6         | 0.417 |
| PEA15               | 0.21      | 0.55   | 0.373           | 0.321  | 0.667           | 0.233  | 0.738       | 0.333 |
| APOB                | -0.258    | 0.446  | 0.684           | 0.0361 | 0.986           | 0.0028 | 0.667       | 0.233 |

30

## 【0089】

実施例 22 : ヒト外傷培養モデルにおける反復性軽度損傷後のグリア外傷放出マーカーのレベル上昇

40

図 24 は、反復性軽度損傷についてのモデルを用いて得られた結果を示す。ヒト星状細胞は、30 分間隔 (30') または 1 日間隔 (1D) の単回 ( ) または二重の ( - ) 軽度圧力パルスを受けた。急性漏出性および遅延性の死滅した細胞集団は、反復性外傷によってほとんど変化しなかった (図 24 A)。また、外傷放出マーカー GFAP および Aldoc の条件培地 (CM) 流体レベルは、単回軽度伸張と比較して、直ちに追隨する反復性軽度損傷の後に上昇し、2 回の損傷が 1 日間隔である時、わずかに上昇するのみであった。Aldoc レベルは、直ちに追隨する軽度伸張の後に単回の重度損傷 ( ) のものにほぼ到達し、反復性損傷に対する Aldoc レベルの感度を示した。

## 【0090】

実施例 23 : 外傷後のカルパインおよびカスパーゼ活性化で生じる GFAP 上位および

50

## 下位分解産物

D A K O 抗 G F A P ポリクローナル抗体を用いた条件培地試料における損傷 4 8 時間後の G F A P、上位および下位分解産物の 2 回のフィルム曝露を図 2 5 に示す。重度に伸張したおよび未伸張の培養物は、薬剤、カルパイン阻害薬 P D 1 5 0 6 0 6 ( 1 0 0  $\mu$  M、 「 C a l i 」 ) またはパンカスパーゼ阻害薬 Z - V A D F M K ( 8 . 8  $\mu$  M、 「 C a s i 」 ) のいずれも受容しなかった。外傷放出性 G F A P 上位および下位 B D P は、カルパインおよびカスパーゼの両方の阻害によって減少し、損傷後の G F A P を分解する両酵素の外傷誘発性活性化を示唆した。同じ実験の細胞可溶化物画分の類似の分析によって示唆されるように、この酵素分解の一部は細胞において生じ、一部は細胞外で生じる。未伸張培養物における下位 G F A P の B D P の微量放出は、少数の非外傷性細胞死によるものであった。

## 【 0 0 9 1 】

実施例 2 4 : アストログリア損傷マーカーのウェスタンブロット法に使用される抗体およびタンパク質

【表 8】

表6：マーカーのウェスタンブロット法に使用される抗体およびタンパク質

| 名称                          | 抗体、組換えタンパク質   | エピトープ   | コメント  |
|-----------------------------|---|---|---|
| GFAP                        | ウサギポリクローナル抗 GFAP (DAKO, Z0334)<br>ニワトリポリクローナル抗 GFAP (ThermoFisher Scientific, PA1-10004)  | 全長ウシGFAP<br>全長ウシGFAP  | ポリクローナル抗体は、全長のGFAP、上位および下位のBDPセットを認識する      |
| ALDOC                       | ウサギアフィニティ精製ポリクローナル抗ALDOC (Genetex, GTX102284)<br>ウサギ血清 88, 89 (EnCor, Biotech)<br>いくつかのモノクローナル ALDOC 抗体 (EnCor): IgG1 mab 1A1 (MCA-1A1), IgG1 mab E9 (MCA-E9), IgG1 mab 4A9 (MCA-4A9), IgG1 mab 5C9 (いまだに開発中)<br>標準物質:<br>His タグ付きヒト ALDOC 組換えタンパク質 (EnCor Biotech. Inc.) | 組換えALDOC断片アミノ酸10~163 (P09972)<br>組換え全長ALDOC, 複数のBDP<br>Mab 1A1 : C 末端ペプチド、ALDOC のBDP を検出せず、血中にシグナルはない。Mab E9 : 組換え全長ALDOC、ALDOC のBDP を検出し、ヒト血液 (血清、血漿) 中にシグナルがある。Mab 4A9 : N 末端ペプチド配列 : MPHSYPALSAEQKKELS (配列番号1)、ヒトおよびブタの血液にシグナルがある。Mab 5C9 : N 末端、ヒト血液 (血清および血漿) 中にシグナルがある。 | 純粋な組換え ALDOC (EnCor) を用いた標準曲線 図 1 4 を参照されたい |
| GS                          | ウサギ IgG 画分ポリクローナル抗 GS (Sigma, G2781)<br>GS クローン 6 に対するマウス mab IgG2A (BD Transduction, 610517)   | GS ペプチドアミノ酸 357~373、BDP が見られ、より感度が高い<br>全長のGS、より感度が低く、BDPはない  |   |
| PEA15                       | ウサギポリクローナルアフィニティ精製抗PEA15 (Cell Signaling)<br>標準物質: 組換えPEA15 (EnCor)   | Leu60 周辺のヒトPEA15 ペプチド   |   |
| BLBP<br>= FABP7<br>= B-FABP | アフィニティ精製したウサギポリクローナル抗FABP7 (Millipore)<br>アフィニティ精製ウサギポリクローナル抗FABP7 クローンRB22973 (Abgent)<br>マウスモノクローナル IgG2b 抗 FABP7 (Hycult, HM2299)  | GST タグ付き組換え全長ヒト FABP7、脳特異的 (Millipore)<br>C 末端ヒト FABP7 ペプチド アミノ酸 104~132、脳特異的 (Abgent)  | 純粋な組換え BLBP (EnCor) を用いた標準曲線 図 1 4 を参       |

10

20

30

40

|                   |  |  |       |
|-------------------|--|--|-------|
|                   | 標準物質:His タグ付き組換え BLBP タンパク質(EnCor Biotech, Inc.)   | ヒト B-FABP 配列由来のペプチド (Hycult)                           | 照されたい |
| CRYAB<br>= HSP 27 | マウスモノクローナル IgG1 抗 CRYAB (Enzo, 1B61-3G4)<br>ウサギアフィニティ精製ポリクローナル抗CRYAB (EMD Millipore, ABN185) | 全長ウシCRYABは、全長およびBDPを認識する<br>N末端                        |       |
| APOB              | ウサギアフィニティ精製ポリクローナル IgG 抗APOB (PTGlab, 20578-1-AP)  | 非特異的APOB ペプチド<br>APOB 120~130 kDa で観察されるバンド, 全長516 kDa |       |
| PTGDS             | ウサギアフィニティ精製 IgG 抗 PTGDS (USBiological, P9053-24D)  | 合成ヒト PTGDS ペプチド アミノ酸 120~190                           |       |

10

## 【 0 0 9 2 】

## 実施例 25 : 多重反応モニタリング質量分析

20

T B I 損傷バイオマーカータンパク質の生体液濃度を、標的指向化多重反応モニタリング ( M R M ) 質量分析によって測定した。生体液試料をまずエンドプロテイナーゼであるトリプシンを用いて消化し、タンパク質全部をそれらの個々のトリプシン処理ペプチドへと切断した。タンパク質特異的ペプチドシグナルを、それらの個々のタンパク質に対する代用基準として使用した。M R M - M S において、ペプチドシグナルを、以下の表 7 に示すような前駆体 生成物イオン遷移として公知のものによって測定する (例えば、5 5 4 . 8 2 1 ( 2 + ) 9 2 4 . 5 1 4 ( 1 + , y 8 ) ) 。 関心対象の特異的前駆体イオンの選択は、増感を可能にする。選択された前駆体由来の特異的生成物イオンからシグナルを測定することによって、M R M は、高度の分析物特異性を可能にする。定量化のため、重リジン [ K ( 標識 : 1 3 C ( 6 ) 1 5 N ( 2 ) ) ] または重アルギニン [ R ( 標識 : 1 3 C ( 6 ) 1 5 N ( 4 ) ) ] のいずれかを含有する定義した量の安定同位体標識した標準物質 ( S I S ) ペプチドを生体液試料中へとスパイクする。これらの重標準物質ペプチドは、それらの内在性 ( 軽 ) 対応物と化学的に同一であるが、内在性生体液ペプチドとの識別のために、+ 8 および + 1 0 D a ( それぞれ K および R ) の質量移行を示す。軽および重 M R M 移行間のピーク面積比の比較は、バイオマーカー濃度の絶対的な定量化を可能にする。本発明者らのアッセイのために、トリプシン消化した生体液をまず、0 . 1 % ギ酸水溶液および 0 . 1 % ギ酸アセトニトリル溶液の溶出系を用いる逆相液体クロマトグラフィーによって分離し、試料の複雑性をさらに低下させ、シグナル感度を改善した。

30

## 【 0 0 9 3 】

【表 9】

表 7 : 多重反応モニタリング質量分析ペプチドTBIバイオマーカー

| 名称                   | ペプチド配列                    | 測定されたMRM移行   |   |   |  |
|----------------------|---------------------------|--|---|---|--|
| GFAP<br>すべて中心断片<br>内 | ALAAELNQLR (重)<br>配列番号 2  | 554.821 (2+) → 924.514 (1+, y8)<br>554.821 (2+) → 853.477 (1+, y7)<br>554.821 (2+) → 782.439 (1+, y6)  |   |   |  |
|                      | ALAAELNQLR (軽)<br>配列番号 2  | 549.816 (2+) → 914.505 (1+, y8)<br>549.816 (2+) → 843.468 (1+, y8)<br>549.816 (2+) → 722.431 (1+, y8)  |   |   |  |
|                      | LADVYQAE LR (重)<br>配列番号 3 | 594.758 (2+) → 1003.508 (1+, y8)<br>594.758 (2+) → 789.413 (1+, y6)<br>594.758 (2+) → 626.350 (1+, y5) |   |   |  |
|                      | LADVYQAE LR (軽)<br>配列番号 3 | 589.314 (2+) → 993.500 (1+, y8)<br>589.314 (2+) → 779.405 (1+, y6)<br>589.314 (2+) → 616.341 (1+, y5)  |   |   |  |
|                      | ALDOC                     | TPSALAILLENANVLAR (重)<br>配列番号 4  | 831.974 (2+) → 1193.688 (1+ y11)<br>831.974 (2+) → 1122.651 (1+ y10)<br>831.974 (2+) → 1009.566 (1+ y9) |   |  |
|                      |                           |  | TPSALAILLENANVLAR (軽)<br>配列番号 4   | 826.970 (2+) → 1183.679 (1+, y11)<br>826.970 (2+) → 1112.642 (1+, y10)<br>826.970 (2+) → 999.558 (1+, y9) |  |
|                      |                           |  |   | LSQIGVENTEENR (重)<br>配列番号 5   | 749.872 (2+) → 1170.563 (1+, y10)<br>749.872 (2+) → 1057.478 (1+, y9)<br>749.872 (2+) → 901.389 (1+, y7) |
|                      |                           | LSQIGVENTEENR (軽)<br>配列番号 5  |   |   | 744.868 (2+) → 1160.554 (1+, y10)<br>744.868 (2+) → 1047.470 (1+, y9)<br>744.868 (2+) → 891.380 (1+, y7) |
|                      |                           |  | GS  | DIVEAHYR (重)<br>配列番号 6  | 506.758 (2+) → 784.398 (1+, y6)<br>506.758 (2+) → 685.329 (1+, y5)<br>506.758 (2+) → 556.287 (1+, y4)    |
|                      |                           | DIVEAHYR (軽)<br>配列番号 6   |   |   | 501.753 (2+) → 774.389 (1+, y6)<br>501.753 (2+) → 675.321 (1+, y5)<br>501.753 (2+) → 546.278 (1+, y4)    |
|                      | PEA15                     |  |   |   | DNLSYIEHIFEISR (重)<br>配列番号 7   |

10

20

30

40

|                   |  |  |    |
|-------------------|--|--|----|
|                   | DNLSYIEHIFEISR (軽)<br>配列番号7  | 582.629 (3+) → 658.847 (2+, y10)<br>579.293 (3+) → 651.346 (1+, y5)<br>579.293 (3+) → 697.359 (2+, y11)<br>579.293 (3+) → 653.843 (2+, y10)  |    |
| BLBP<br>= FABP7   | ALGVGFATR (重)<br>配列番号8<br><br>ALGVGFATR (軽)<br>配列番号8                 | 451.260 (2+) → 717.392 (1+, y7)<br>451.260 (2+) → 660.370 (1+, y6)<br>451.260 (2+) → 561.302 (1+, y5)<br>446.256 (2+) → 707.384 (1+, y7)<br>446.256 (2+) → 650.362 (1+, y6)<br>446.256 (2+) → 551.294 (1+, y5)         | 10 |
| CRYAB<br>= HSP 27 | HFSPEELK (重)<br>配列番号9<br><br>HFSPEELK (軽)<br>配列番号9                   | 497.758 (2+) → 857.450 (1+, y7)<br>497.758 (2+) → 710.381 (1+, y6)<br>497.758 (2+) → 623.349 (1+, y5)<br>493.751 (2+) → 849.435 (1+, y7)<br>493.751 (2+) → 702.367 (1+, y6)<br>493.751 (2+) → 615.335 (1+, y5)         | 20 |
| APOB              | SPAFTDLHLR (重)<br>配列番号10<br><br>SPAFTDLHLR (軽)<br>配列番号10             | 389.545 (3+) → 764.429 (1+, y6)<br>389.545 (3+) → 663.381 (1+, y5)<br>389.545 (3+) → 491.771 (2+, y8)<br>386.208 (3+) → 754.421 (1+, y6)<br>386.208 (3+) → 653.373 (1+, y5)<br>386.208 (3+) → 486.767 (2+, y8)         |    |
| PTGDS             | APEAQVSVQPNFQQDK<br>(重) 配列番号11<br><br>APEAQVSVQPNFQQDK<br>(軽) 配列番号11 | 897.449 (2+) → 1297.663 (1+, y11)<br>897.449 (2+) → 1198.594 (1+, y10)<br>897.449 (2+) → 884.435 (1+, y7)<br>893.442 (2+) → 1289.648 (1+, y11)<br>893.442 (2+) → 1190.580 (1+, y10)<br>893.442 (2+) → 876.421 (1+, y7) | 30 |

## 【0094】

## 参考文献

Barbee, K. A. 2005. Mechanical cell injury. Ann N Y Acad Sci. 1066: 67 - 84. 40

## 【0095】

Barzo, P. S., 1996. Magnetic resonance imaging-monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. Journal of neurosurgery. 85: 1113 - 1121.

## 【0096】

Breiman, L. 1984. Classification and regression trees. Wadsworth International Group 50

p , カリフォルニア州ベルモント市 . x , 358 p . pp .

【0097】

Buki , A . 5 , 2015 . Minor and repetitive head injury . Advances and technical standards in neurosurgery . 42 : 147 - 192 .

【0098】

Cahoy , J . D . 5 , A transcriptome database for astrocytes , neurons , and oligodendrocytes : a new resource for understanding brain development and function . The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience . 28 : 264 - 278 .

10

【0099】

Crowder , M . J . , および D . J . Hand . 1990 . Analysis of repeated measures . Monographs on statistics and applied probability における . Chapman and Hall , ロンドン市 ; ニューヨーク市 . 1 - 59 .

【0100】

Fabrigar , L . R . , および D . T . Wegener . 2012 . Exploratory factor analysis . Oxford University Press , オックスフォード市 ; ニューヨーク市 . viii , 159 p . pp .

20

【0101】

Hicks , R . R . 5 , 1993 . Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus . Journal of neurotrauma . 10 : 405 - 414 .

【0102】

Korn , A . 5 , 2005 . Focal cortical dysfunction and blood-brain barrier disruption in patients with Postconcussion syndrome . J Clin Neurophysiol . 22 : 1 - 9 .

30

【0103】

Lee , J . H . 5 , 2013 . A novel porcine model of traumatic thoracic spinal cord injury . Journal of neurotrauma . 30 : 142 - 159 .

【0104】

Levine , J . 5 , 2016 . Traumatologically injured astrocytes release a proteomic signature modulated by STAT3-dependent cell survival . Glia . 64 : 668 - 694 .

40

【0105】

Levine , J . 5 , 2015 . Traumatologically injured astrocytes release a proteomic signature modulated by STAT3 dependent cell survival . Glia . オンライン .

【0106】

Mathiisen , T . M . 5 , 2010 . The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels : an elect

50

ron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 58:1094-1103.

【0107】

Omenn, G. S. 5, 2005. Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. 5:3226-3245.

10

【0108】

Schenk, S. 5, 2008. A high confidence, manually validated human blood plasma protein reference set. *BMC Med Genomics*. 1:41.

【0109】

Sondej, M. 5, 2011. Sample preparation of primary astrocyte cellular and released proteins for 2-D gel electrophoresis and protein identification by mass spectrometry. Sample preparation in biological mass spectrometry. 第39巻. A. IvanovおよびA. Lazarev 編, Springer, ドルトレヒト市における829-849.

20

【0110】

Tucker, L. M., RC. 1997. Exploratory Factor Analysis. University of Illinois; Ohio State University.

【0111】

Wanner, I. B. 2012. An in vitro trauma model to study rodent and human astrocyte reactivity. *Methods in molecular biology*. 814:189-219.

30

【0112】

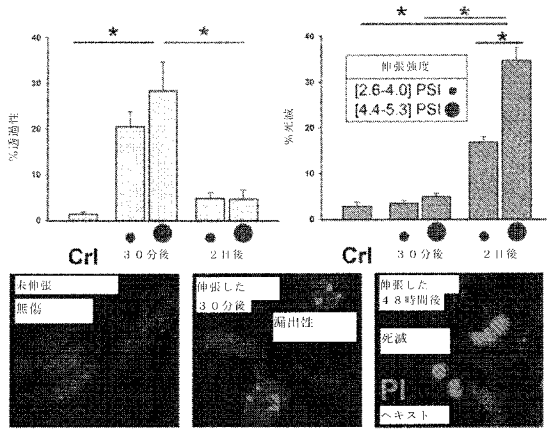
本出願のいたるところで種々の公開物が参照されている。これらの公開物の開示はそれらの全体において、本発明が属する技術分野の状態をより完全に説明するために、本明細書により本出願へと参照により組み込まれる。

【0113】

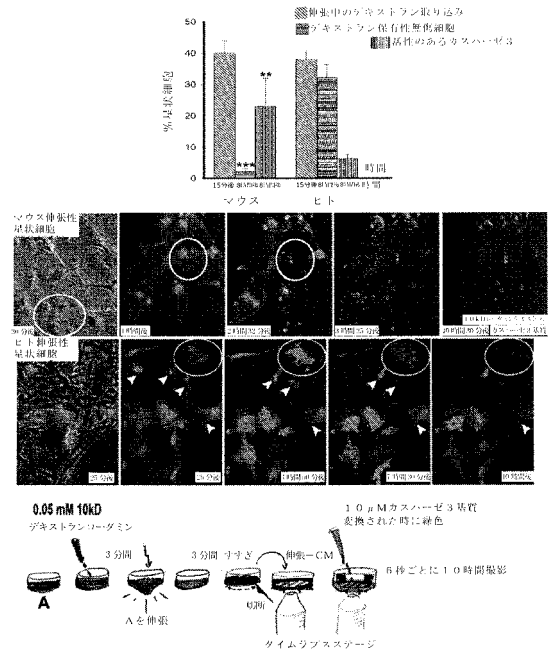
当業者は、上述の説明において開示された概念および具体的な実施形態が、本発明の同じ目的を実施するための他の実施形態を変更または設計するための基礎として容易に利用され得ることを認識するであろう。当業者は、このような等価の実施形態が添付の特許請求に示すような本発明の精神および範囲から逸脱しないことも認識するであろう。

40

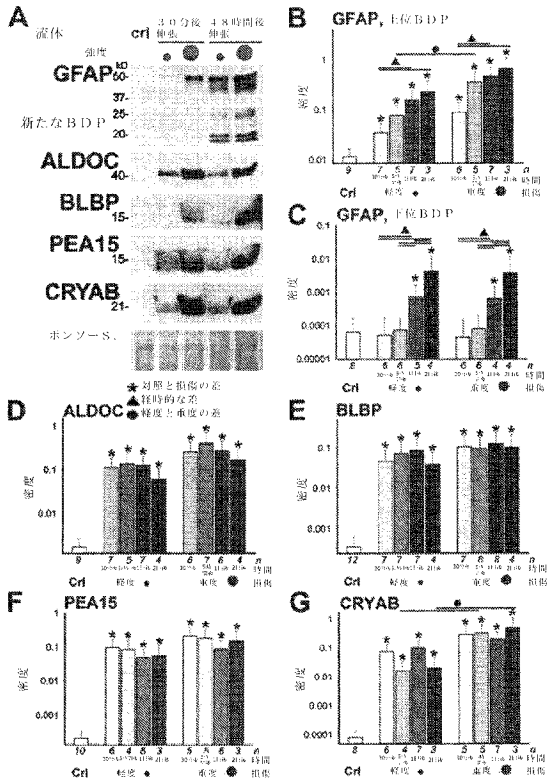
【図 1】



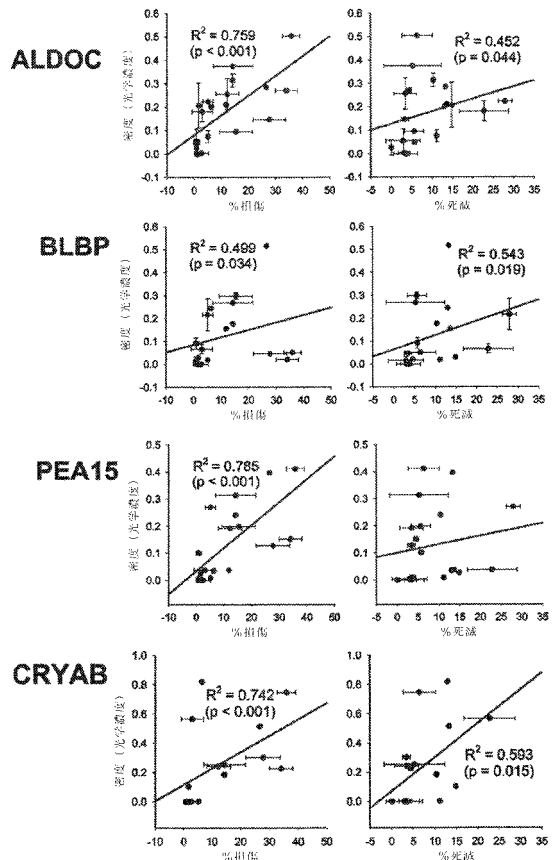
【図 2】



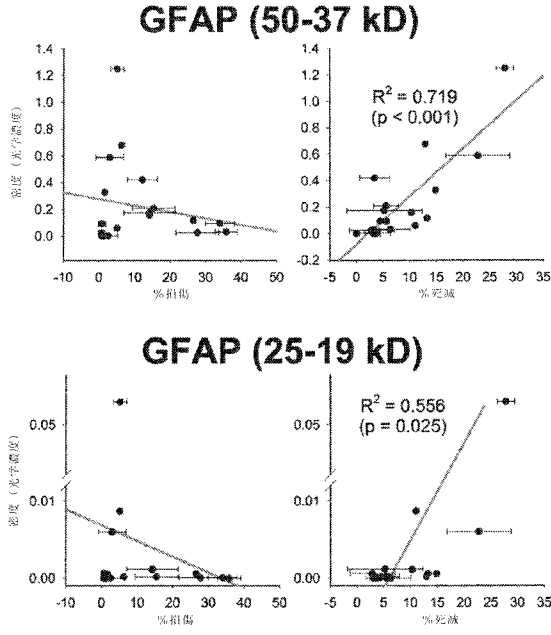
【図 3】



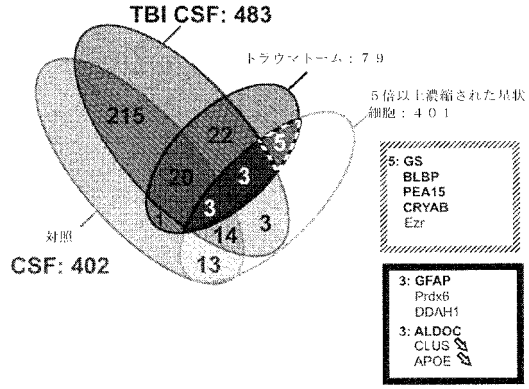
【図 4 A】



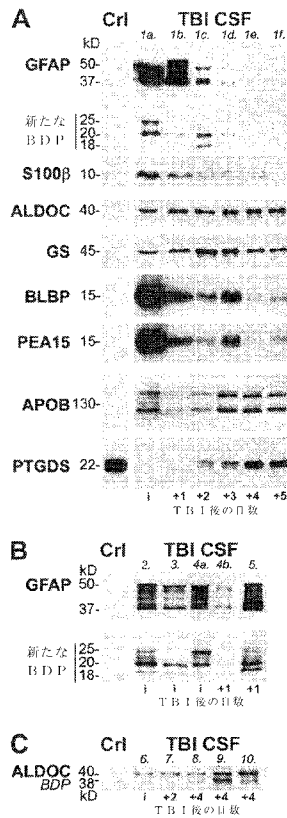
【 図 4 B 】



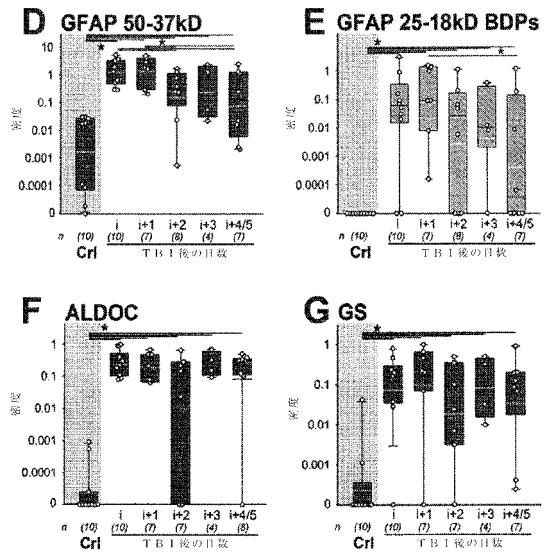
【 図 5 】



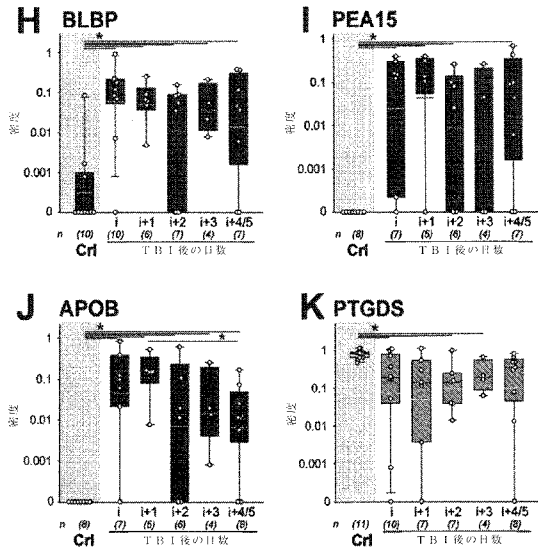
【 図 6 - 1 】



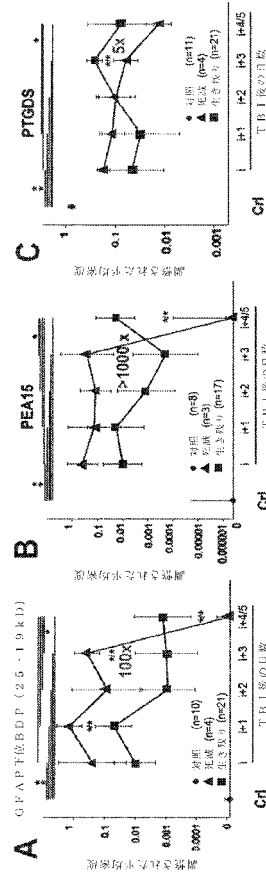
【 図 6 - 2 】



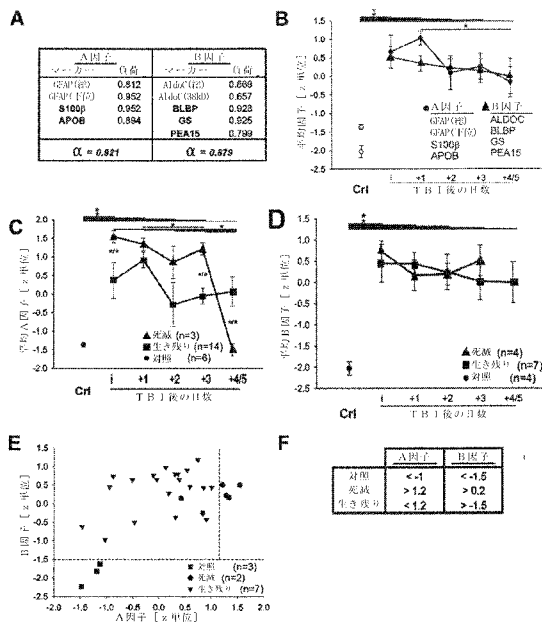
【図 6 - 3】



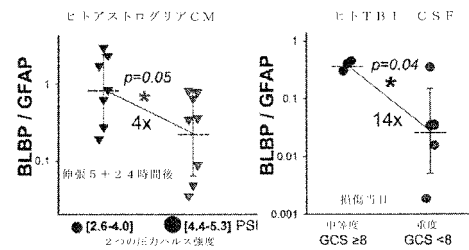
【図 7】



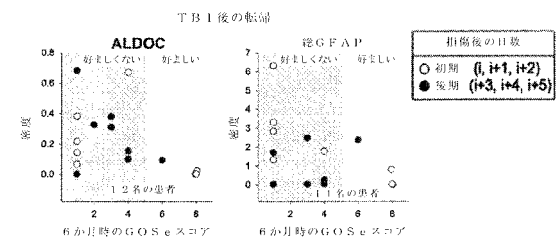
【図 8】



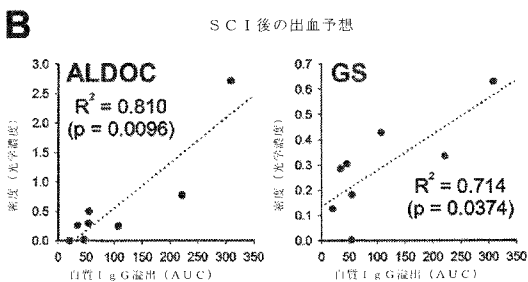
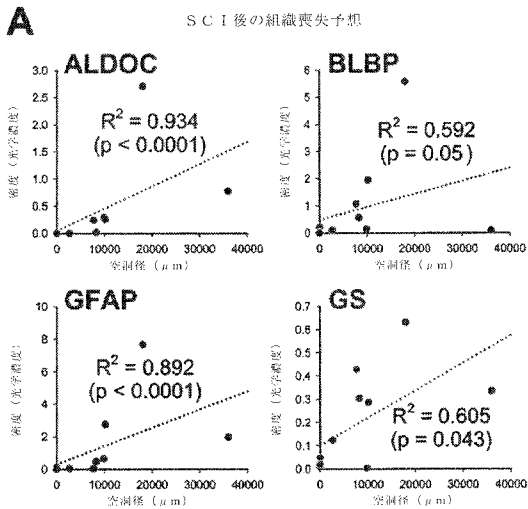
【図 9】



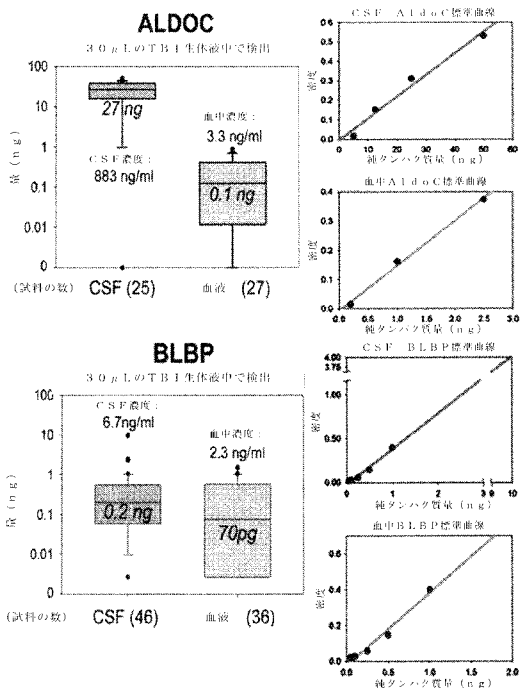
【図 10】



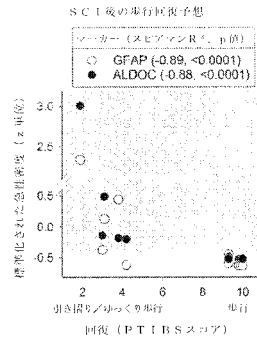
【 図 1 1 】



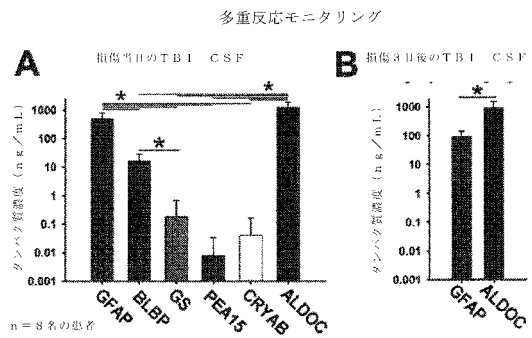
【 図 1 4 】



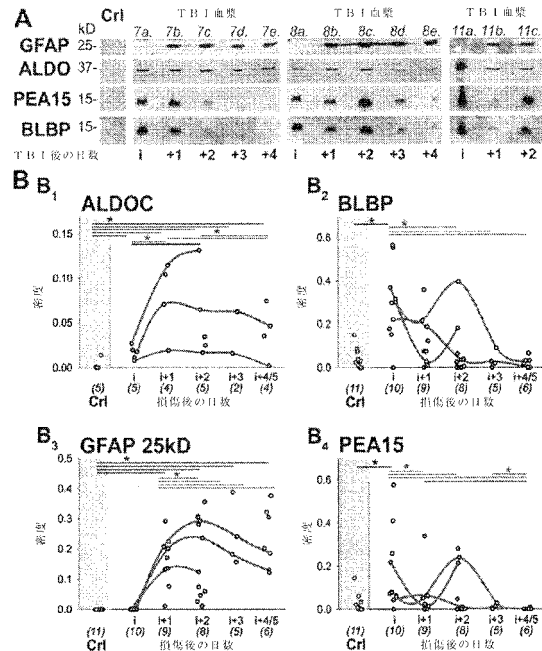
【 図 1 2 】



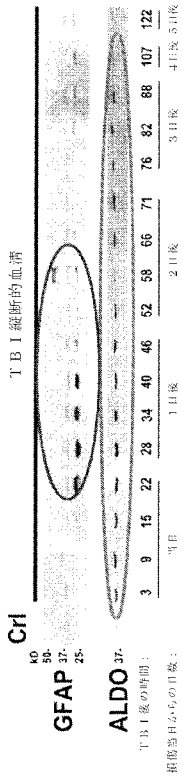
【 図 1 3 】



【 図 1 5 】



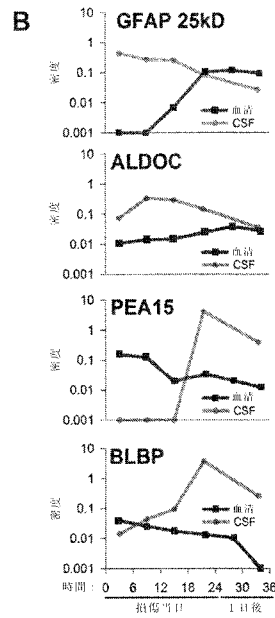
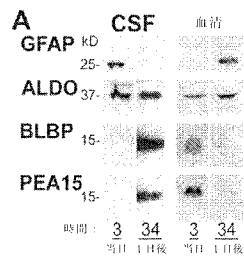
【図 16】



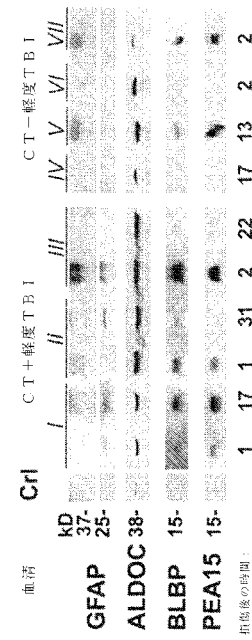
【図 17】



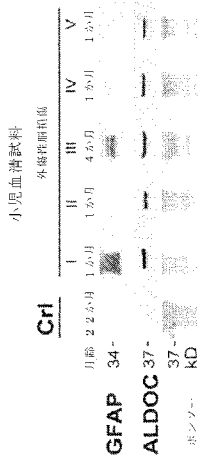
【図 18】



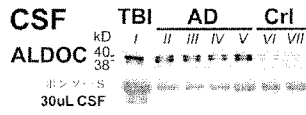
【図 19】



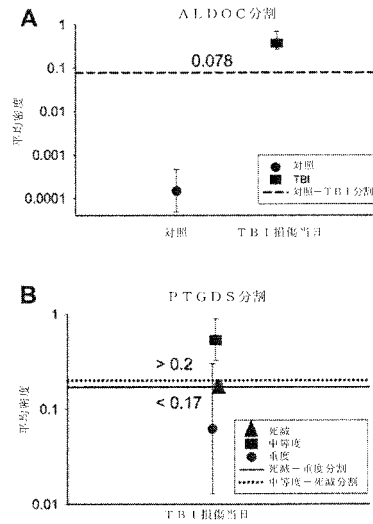
【 図 2 0 】



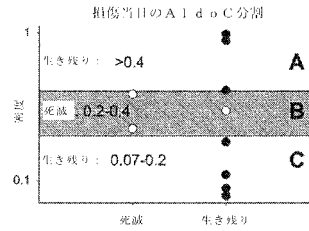
【 図 2 1 】



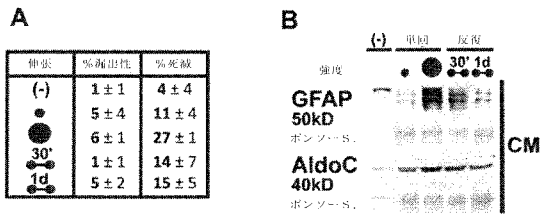
【 図 2 2 】



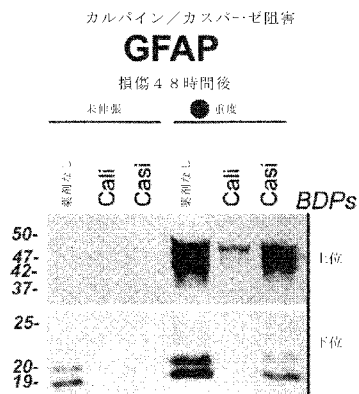
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【 図 2 5 】



【配列表】

2018523092000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年1月9日(2018.1.9)

【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】

2018523092000001.app

## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International application No.<br><b>PCT/US2016/031043</b>                                |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br><b>G01N 33/68(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 27/64(2006.01)i, G01N 33/577(2006.01)i</b>   |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>G01N 33/68; C12Q 1/44; G01N 33/53; C40B 30/10; A61K 31/215; G01N 27/64; G01N 33/577   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Korean utility models and applications for utility models<br>Japanese utility models and applications for utility models  |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: traumatic brain injury, spinal cord injury, ALDOC, BLBP/FABP7, PEA15, GFAP-BDP   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X  | US 2011-0082203 A1 (WANG et al.) 07 April 2011<br>See abstract; paragraphs [0041]-[0070]; claims 1-6.  | 1-2, 12-16, 19-20  |
| Y  |  | 3-9, 21-29   |
| A  |  | 10-11  |
| Y  | US 2011-0177974 A1 (WANG et al.) 21 July 2011<br>See abstract; paragraphs [0012]-[0015].   | 3-7  |
| Y  | US 2014-0045713 A1 (EVERETT et al.) 13 February 2014<br>See abstract; paragraph [0062]; Table 1.   | 8-9  |
| Y  | FEALA et al., 'Systems biology approaches for discovering biomarkers for traumatic brain injury'<br>Journal of Neurotrauma, Vol.30, pages 1101-1116 (2013)<br>See abstract; Table 1; pages 1103, 1110. | 21-29  |
| Y  | KOH, 'Melatonin prevents down-regulation of astrocytic phosphoprotein PEA-15 in ischemic brain injury'<br>Journal of Pineal Research, Vol.51, pages 381-386 (2011)<br>See abstract; pages 383-385.     | 22   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |  |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>28 July 2016 (28.07.2016)   |  | Date of mailing of the international search report<br><b>02 August 2016 (02.08.2016)</b> |
| Name and mailing address of the ISA/KR<br>International Application Division<br>Korean Intellectual Property Office<br>189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea<br>Facsimile No. +82-42-481-8578   |  | Authorized officer<br>KIM, Seung Beom<br>Telephone No. +82-42-481-3371                   |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/US2016/031043**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| A   | ZHANG et al., 'Human traumatic brain injury induces autoantibody response against glial fibrillary acidic protein and its breakdown products' PLoS One, Vol.9, Issue 3, e92698 (internal pages 1-16) (2014)<br>See the whole document. | 1-16, 19-29           |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No.<br><b>PCT/US2016/031043</b> |
|---|

**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.: 17,18  
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:

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 an additional fees, this Authority did not invite payment of any 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.:

- 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/US2016/031043**

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 2011-0082203 A1                     | 07/04/2011       | AU 2009-212463 A1       | 13/08/2009       |
|  |                  | CA 2715248 A1           | 13/08/2009       |
|  |                  | CN 101983337 A          | 02/03/2011       |
|  |                  | EP 2245466 A2           | 03/11/2010       |
|  |                  | JP 2011-511301 A        | 07/04/2011       |
|  |                  | WO 2009-100131 A2       | 13/08/2009       |
|  |                  | WO 2009-100131 A3       | 19/11/2009       |
| US 2011-0177974 A1                     | 21/07/2011       | AU 2005-238446 A1       | 10/11/2005       |
|  |                  | AU 2005-238446 B2       | 30/07/2009       |
|  |                  | CA 2578670 A1           | 10/11/2005       |
|  |                  | EP 1745149 A2           | 24/01/2007       |
|  |                  | EP 2207033 A2           | 14/07/2010       |
|  |                  | EP 2207033 A3           | 03/11/2010       |
|  |                  | EP 2207033 B1           | 18/06/2014       |
|  |                  | JP 2007-532915 A        | 15/11/2007       |
|  |                  | JP 4659025 B2           | 30/03/2011       |
|  |                  | US 2005-0260654 A1      | 24/11/2005       |
|  |                  | US 2009-0087868 A1      | 02/04/2009       |
|  |                  | US 2010-0317041 A1      | 16/12/2010       |
|  |                  | US 7396654 B2           | 08/07/2008       |
| US 8492107 B2                          | 23/07/2013       |                         |                  |
| WO 2005-106038 A2                      | 10/11/2005       |                         |                  |
| US 2014-0045713 A1                     | 13/02/2014       | EP 2628013 A2           | 21/08/2013       |
|  |                  | EP 2628013 A4           | 12/03/2014       |
|  |                  | JP 2013-545087 A        | 19/12/2013       |
|  |                  | US 2015-0051115 A1      | 19/02/2015       |
|  |                  | WO 2012-051519 A2       | 19/04/2012       |
|  |                  | WO 2012-051519 A3       | 20/09/2012       |

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)  
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08

(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 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 ワンナー, イナ - ペアテ

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 9 5 - 1 4 0 6 , ロサンゼルス, スイート 2 0 0 ,  
 1 1 0 0 0 キンロス アベニュー

(72)発明者 ルー, ジョセフ エー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 0 0 9 5 - 1 4 0 6 , ロサンゼルス, スイート 2 0 0 ,  
 1 1 0 0 0 キンロス アベニュー

F ターム(参考) 2G041 CA01 EA03 FA12 FA22 FA24 JA02 JA04 JA05 LA07 LA08  
 2G045 AA25 CA25 CA26 CB03 CB07 CB11 DA20 DA66  
 4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CC24 DA13  
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA50 FA74

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 星形胶质细胞创伤和神经元创伤的生物标志物   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2018523092A</a>  | 公开(公告)日 | 2018-08-16 |
| 申请号            | JP2017557192   | 申请日     | 2016-05-05 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 加利福尼亚大学董事会   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 加州大学董事会  |         |            |
| [标]发明人         | ワンナーイナベアテ<br>ルージョセフエー  |         |            |
| 发明人            | ワンナー,イナベアテ<br>ルー,ジョセフ エー.  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/68 G01N33/573 G01N33/53 G01N27/62 C07K16/18 C12P21/08   |         |            |
| CPC分类号         | G01N33/6896 C12Y201/01259 G01N33/577 G01N33/6848 G01N2800/2871 G01N2800/40 G01N2800/52   |         |            |
| FI分类号          | G01N33/68.ZNA G01N33/573.A G01N33/53.W G01N27/62.V C07K16/18 C12P21/08   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G041/CA01 2G041/EA03 2G041/FA12 2G041/FA22 2G041/FA24 2G041/JA02 2G041/JA04 2G041/JA05 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB03 2G045/CB07 2G045/CB11 2G045/DA20 2G045/DA66 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74 |         |            |
| 代理人(译)         | Iwahori明代  |         |            |
| 优先权            | 62/157389 2015-05-05 US  |         |            |
| 其他公开文献         | JP2018523092A5   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

提供了用于检测或监测受试者中的创伤性脑损伤 ( TBI ) 或脊髓损伤 ( SCI ) 的方法。在一个实施方案中,该方法包括制备获自受试者的体液样品,选自醛缩酶C ( ALDOC ) 和脑脂质结合蛋白 ( BLBP ) 的TBI标记或ALDOC或BLBP的创伤特异性降解产物 ( 与试剂接触以测定BDP )。该方法还包括确定样品中相对于对照样品存在的标志物的量,以及当样品中相对于对照样品存在增加量的标志物时确定TBI或SCI的存在。包括判断力。方法,谷氨酰胺合成酶 ( GS ), 星形胶质细胞磷蛋白PEA-15 ( PEA15 ),  $\alpha$ B-晶状蛋白 ( CRYAB / HSP27 ), ALDOC, CS, PEA15或CRYAB裂解产物,或来自这两种或多种的裂解产物 可以包括测量组合的数量。[选择图]图16

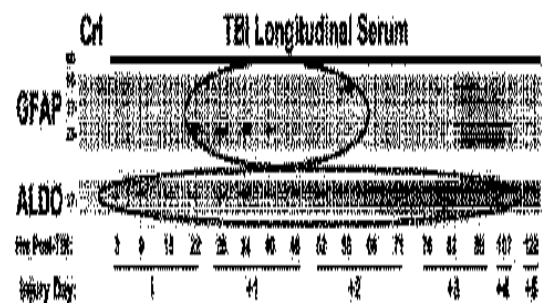


FIGURE 16