(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2013-501919
(P2013-501919A)
(43)公表日 平成25年1月17日(2013.1.17)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
G01N 33/543		***(2006.01)***	G01N	33/543	501D	4H045
G01N 33/53		***(2006.01)***	G01N	33/543	521	
C07K 14/47		*(2006.01)*	G01N	33/53	D	
			G01N	33/543	541Z	
			C07K	14/47	ZNA	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 28 頁）

(21)出願番号　特願2012-523974 (P2012-523974)
(86)(22)出願日　平成22年8月6日(2010.8.6)
(85)翻訳文提出日　平成24年4月5日(2012.4.5)
(86)国際出願番号　PCT/US2010/044690
(87)国際公開番号　WO2011/017605
(87)国際公開日　平成23年2月10日(2011.2.10)
(31)優先権主張番号　61/232,033
(32)優先日　平成21年8月7日(2009.8.7)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　512030360
アフィニマーク　テクノロジーズ，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，コネチカット州　０６０２９，エリントン，ジャスティン　ドライブ　１０
(74)代理人　100080621
弁理士　矢野　寿一郎
(72)発明者　ピエリボン，ヴィンセント
アメリカ合衆国，コネチカット州　０６５１５－２７３５，ニュー　ヘブン，オリバー　ロード　１３１

Ｆターム(参考)　4H045 AA30　BA10　CA40　DA86　EA50

最終頁に続く

(54)【発明の名称】脳脊髄液の免疫的識別のための装置および方法

(57)【要約】
本開示は、他の体液内でのレベルに比してＣＳＦ中で豊富な１つ以上の抗原の検出による、試料中の脳脊髄液（ＣＳＦ）の存在または不在の検出に関する。この装置および方法は、民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い人口からの混合された体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出に適している。

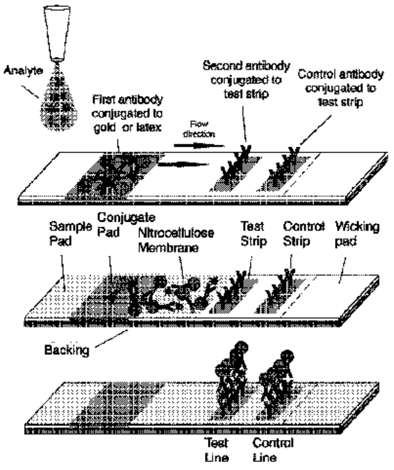


Figure 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
試料中の脳脊髄液の存在または不在を検出するための装置であって、
試料添加領域、
移動粒子と共役の、ＣＳＦ富化タンパク質への第一抗体からなる試料標識領域、および
ＣＳＦ富化タンパク質への第二抗体からなる試料検出領域であって、該第二抗体は該試料検出領域に固定されるものとする領域からなり、
第二領域の検出可能バンドの存在が、試料中の脳脊髄液の存在を示すものとし、
ＣＳＦ富化タンパク質は、神経細胞付着分子様（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１；　登録番号　ｇｉ：６２０８８２３８）タンパク質のアイソフォーム１、鎖Ａ、ウシ膵臓トリプシン阻害剤（Ｂｐｔｉ）と複合したヒトメソトリプシン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２；　登録番号　ｇｉ：　１６２３３００９５）；ＣＮＴＮ２コンタクチンー２前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　３；　登録番号　ｇｉ｜４８２７０２２）、コンタクチンー１のＣＮＴＮ１アイソフォーム２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　４；　登録番号　ｇｉ：２８３７３１１９）、ＳＰＡＲＣ様タンパク質１（無名タンパク質産物）に高度に類似したｃＤＮＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　５；　登録番号：　ｇｉ｜１９４３８８０５０）、ＮＲＣＡＭ（神経細胞付着分子）タンパク質［ホモ・サピエンス］のあるいはわずかに長い切片（～９６ｋＤａ）（登録番号：　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　６；　ｇｉ｜６８５３４６５２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　７；　ｇｉ｜１０９７３１５０１）、ＮＣＡＭ２神経細胞付着分子２、アイソフォームＣＲＡ＿ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　８；　登録番号　ｇｉ｜１１９６３０４０９）、ＳＥＲＰＩＮＡ３　セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ、アルファー１ーアンチキモトリプシン／生育阻害タンパク質２５［ホモ・サピエンス］のメンバー３前駆体／アイソフォーム１、あるいはアルファー１ーアンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　９；　登録番号　ｇｉ｜４６９８１９６１）、ＡＧＴ　アンギオテンシノーゲン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１０；　登録番号　ｇｉ｜５５３１８１）、アンギオテンシノーゲン前駆体（セルピンＡ８）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１１；　登録番号　ｇｉ｜４５５７２８７）、免疫クロブリン上科とも呼ばれる無名タンパク質産物、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれるメンバー４Ｂ、（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１２；　登録番号　ｇｉ｜１８７６０８３６３）、ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５９８９３、ディックコップフ（ｄｉｃｋｋｏｐｆ）同族体３前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１３；　登録番号　ｇｉ｜４０５４８３８９）、ＳＥＲＰＩＮＦ１セリン（またはシステイン）プロテイナーゼ阻害剤、クレードＦ（アルファー２　アンチプラスミン、色素上皮由来因子、Ｐｅｄｆ）、メンバー１アイソフォーム４因子（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１４；　登録番号　ｇｉ｜１５９８８０２４）、ＧＣビタミンＤー結合タンパク質ＰＲＥＤＩＣＴＥＤ類似のヒトタンパク質、ビタミンＤー結合タンパク質［チンパンジー］（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１５；　登録番号　１８１４８２）、ＣＤ１４ヒト単核細胞抗原ＣＤ１４（ＣＤ１４）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６；　登録番号　ｇｉ｜１１７６４６２１２）、ＣＡＤＭ３ホモ・サピエンス細胞付着分子３（ＣＡＤＭ３）、転写変異体１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１７；　登録番号　ｇｉ｜９００８０５０３；　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１８；　ｇｉ｜１８７６０８３６３　（ヒト））、神経細胞付着分子変異体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１９；　登録番号　ｇｉ：６２０８８２３８）、ＣＬＵ　ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５７６２２に類似、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２０；　登録番号　ｇｉ｜１８９０５４０９１）、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２１；　登録番号　ｇｉ｜１９３７８７５０２）、ＬＭＡＮ２小胞性統合膜タンパク質ＶＩＰ３６（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２２；　登録番号　ｇｉ｜１５７８３４８００）、クラステリンアイソフォーム１［ホモ・サピエンス］（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２３；　登録番号　ＮＭ＿００１８３１．２）、超酸化物ジスムターゼ３、細胞外前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２４；　登録番号　ｇｉ｜１１８５８２２７５）、フィブリン　アルファＣターム切片（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２５；　登録番号　ｇｉ｜２２３０５７）、鎖Ａ、ヒトカリクレイン６（Ｈｋ６）活性形またはカリクレ

イン－６のＫＬＫ６アイソフォーム１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２６；　登録番号　ｇｉ｜２１４６５９７０）、ＡＰＣＳ血清アミロイドＰ－成分／鎖Ａまたは五量体ヒト血清アミロイドＰ成分（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２７；　登録番号　ｇｉ｜５７６２５９）、ＦＡＭ３Ｃタンパク質　ＦＡＭ３Ｃ／配列類似３の族、メンバーＣ前駆体［ホモ・サピエンス］記＝予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様ＥＭＴ誘導物質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２８；　登録番号　ｇｉ｜５５６２９２７２）、免疫グロブリン上科、メンバー４Ｂとも呼ばれる、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれる無名タンパク質産物［カニクイザル］類似のタンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２９；　登録番号　ｇｉ｜１８７６０８３６３）、前記ＣＳＦ抗原のＣＳＦ富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記ＣＳＦ抗原のうち２つ以上の組み合わせであるものとする装置。

【請求項２】

前記装置は、それぞれ異なるＣＳＦ富化タンパク質と特異的に結合する２～１０の異なる抗体を含む、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記装置は１つに組み合わされた結果を提供するか、または個々の抗体について個別の結果を提供する、請求項２に記載の方法。

【請求項４】

個々の抗体をしきい値のレベルで用いる、請求項２に記載の方法。

【請求項５】

前記装置は、それぞれ異なるＣＳＦ富化タンパク質と特異的に結合する４～１０の異なる抗体を含むとともに、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としないものとする、請求項２に記載の方法。

【請求項６】

試料中のＣＳＦ富化タンパク質のレベルの定量をさらに含む、請求項１に記載の方法。

【請求項７】

前記ＣＳＦ富化タンパク質への第一抗体は、ＣＳＦ富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合する、請求項１に記載の方法。

【請求項８】

試料中のＣＳＦの存在または不在を検出するための方法であって、

試料と、ＣＳＦ富化タンパク質に特異的な結合パートナーとの接触、および

結合パートナー－ＣＳＦ富化タンパク質複合体が存在する場合のその検出からなり、

検出可能複合体の存在が試料中のＣＳＦの存在を示すものとし、

ＣＳＦ富化タンパク質は、神経細胞付着分子様（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１；　登録番号　ｇｉ：６２０８８２３８）タンパク質のアイソフォーム１、鎖Ａ、ウシ膵臓トリプシン阻害剤（Ｂｐｔｉ）と複合したヒトメソトリプシン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２；　登録番号　ｇｉ：　１６２３３００９５）；ＣＮＴＮ２コンタクチン－２前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　３；　登録番号　ｇｉ｜４８２７０２２）、コンタクチン－１のＣＮＴＮ１アイソフォーム２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　４；　登録番号　ｇｉ：２８３７３１１９）、ＳＰＡＲＣ様タンパク質１（無名タンパク質産物）に高度に類似したｃＤＮＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　５；　登録番号：　ｇｉ｜１９４３８８０５０）、ＮＲＣＡＭ（神経細胞付着分子）タンパク質［ホモ・サピエンス］のあるいはわずかに長い切片（～９６ｋＤａ）（登録番号：　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　６；　ｇｉ｜６８５３４６５２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　７；　ｇｉ｜１０９７３１５０１）、ＮＣＡＭ２神経細胞付着分子２、アイソフォームＣＲＡ＿ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　８；　登録番号　ｇｉ｜１１９６３０４０９）、ＳＥＲＰＩＮＡ３　セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ、アルファー１－アンチキモトリプシン／生育阻害タンパク質２５［ホモ・サピエンス］のメンバー３前駆体／アイソフォーム１、あるいはアルファー１－アンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　９；　登録番号　ｇｉ｜４６９８１９６１）、ＡＧＴ　アンギオテンシノーゲン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１０；　登録番号　ｇｉ｜５５３１８１）、アンギオテンシノーゲン前駆体（セルピンＡ８）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：

１１； 登録番号 ｇｉ｜４５５７２８７）、免疫クロブリン上科とも呼ばれる無名タンパク質産物、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれるメンバー４Ｂ、（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １２； 登録番号 ｇｉ｜１８７６０８３６３）、ｃＤＮＡ ＦＬＪ５９８９３、ディックコップフ（ｄｉｃｋｋｏｐｆ）同族体３前駆体（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １３； 登録番号 ｇｉ｜４０５４８３８９）、ＳＥＲＰＩＮＦ１セリン（またはシステイン）プロテイナーゼ阻害剤、クレードＦ（アルファー２ アンチプラスミン、色素上皮由来因子、Ｐｅｄｆ）、メンバー１アイソフォーム４因子（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １４； 登録番号 ｇｉ｜１５９８８０２４）、ＧＣビタミンＤ－結合タンパク質ＰＲＥＤＩＣＴＥＤ類似のヒトタンパク質、ビタミンＤ－結合タンパク質［チンパンジー］（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １５； 登録番号 １８１４８２）、ＣＤ１４ヒト単核細胞抗原ＣＤ１４（ＣＤ１４）（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １６； 登録番号 ｇｉ｜１１７６４６２１２）、ＣＡＤＭ３ホモ・サピエンス細胞付着分子３（ＣＡＤＭ３）、転写変異体１（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １７； 登録番号 ｇｉ｜９００８０５０３； ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １８； ｇｉ｜１８７６０８３６３ （ヒト））、神経細胞付着分子変異体（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： １９； 登録番号 ｇｉ：６２０８８２３８）、ＣＬＵ ｃＤＮＡ ＦＬＪ５７６２２に類似、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２０； 登録番号 ｇｉ｜１８９０５４０９１）、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２１； 登録番号 ｇｉ｜１９３７８７５０２）、ＬＭＡＮ２小胞性統合膜タンパク質ＶＩＰ３６（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２２； 登録番号 ｇｉ｜１５７８３４８００）、クラステリンアイソフォーム１［ホモ・サピエンス］（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２３； 登録番号 ＮＭ＿００１８３１．２）、超酸化物ジスムターゼ３、細胞外前駆体（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２４； 登録番号 ｇｉ｜１１８５８２２７５）、フィブリン アルファＣターム切片（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２５； 登録番号 ｇｉ｜２２３０５７）、鎖Ａ、ヒトカリクレイン６（Ｈｋ６）活性形またはカリクレイン－６のＫＬＫ６アイソフォーム１（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２６； 登録番号 ｇｉ｜２１４６５９７０）、ＡＰＣＳ血清アミロイドＰ－成分／鎖Ａまたは五量体ヒト血清アミロイドＰ成分（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２７； 登録番号 ｇｉ｜５７６２５９）、ＦＡＭ３Ｃタンパク質 ＦＡＭ３Ｃ／配列類似３の族、メンバーＣ前駆体［ホモ・サピエンス］記＝予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様ＥＭＴ誘導物質（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２８； 登録番号 ｇｉ｜５５６２９２７２）、免疫グロブリン上科、メンバー４Ｂとも呼ばれる、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれる無名タンパク質産物［カニクイザル］類似のタンパク質（ＳＥＱ ＩＤ ＮＯ： ２９； 登録番号 ｇｉ｜１８７６０８３６３）、前記ＣＳＦ抗原のＣＳＦ富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記ＣＳＦ抗原のうち２つ以上の組み合わせであるものとする方法。

【請求項９】

前記結合パートナーは検出可能標識からなる、請求項８に記載の方法。

【請求項１０】

試料中の結合パートナー－ＣＳＦ富化タンパク質複合体の定量をさらに含む、請求項９に記載の方法。

【請求項１１】

前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出は較差抗体結合からなるものとする、請求項８に記載の方法。

【請求項１２】

前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出は生体内免疫検定からなるものとする、請求項８に記載の方法。

【請求項１３】

前記試料は組織、血液、血清、血漿、尿、鼻および耳排出物、唾液、汗または涙である、請求項８に記載の方法。

【請求項１４】

前記試料は脳傷害を持つと考えられる個人からのものとする、請求項８に記載の方法。

【請求項１５】
試料と、それぞれ異なるＣＳＦ富化タンパク質と特異的に結合する２～１０の異なる抗体との接触を含む、請求項８に記載の方法。
【請求項１６】
個々の抗体をしきい値のレベルにおいて用いる、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記結合パートナーは抗体であるとし、検定は試料と、それぞれ異なるＣＳＦ富化タンパク質と特異的に結合する４～１０の異なる抗体との接触を含むとともに、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としない、請求項８に記載の方法。
【請求項１８】
前記結合パートナーはＣＳＦ富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合する、請求項８に記載の方法。
【請求項１９】
体液、組織または微生物中の反応物を検出する方法であって、
それぞれ反応物中の抗原と特異的に反応する２種類以上の抗体と、体液、組織または微生物との接触からなり、
個々の単独の抗体との反応は反応物の陽性試験を示さないとともに、
２つ以上の抗体との反応は反応物の陽性試験を示すものとする方法。
【請求項２０】
前記２つ以上の抗体はＣＳＦ富化タンパク質と結合するとともに、試験は試料中のＣＳＦの存在を示すのに適するものとする、請求項１９に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、他の体液中での濃度に比してＣＳＦ中で豊富な１つ以上のタンパク質の検出による、試料中の脳脊髄液（ＣＳＦ）の存在または不在の検出に関する。民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い母集団の混合体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出のための装置および方法をここで述べる。
【背景技術】
【０００２】
脳脊髄液（ＣＳＦ）または脳脊髄水剤は、クモ膜下腔、および中枢神経系（ＣＮＳ）を囲い貫通する脳室に存する。ＣＳＦは脳および脊髄を浴するとともに、水和、栄養、代謝廃物除去、および流体静力学的衝撃緩衝剤をニューロンおよびグリアに提供する。ＣＳＦは、側脳室および第四脳室の脈絡叢によって、拡散、飲作用および能動輸送を組み合わせた手順により、動脈血から生成される。ＣＳＦはまた、ニューロンおよびグリアに生成される成分を含む。脳室系を経てのクモ膜下腔への拡散の後で、ＣＳＦの大半はクモ膜の粒状化によって再吸収され、硬膜静脈叢を経て血流に再入する。およそ５００ｍｌの水剤が毎日生成され、成人で全体積１４０～１５０ｍｌのＣＳＦが６～８時間毎に更新される。ＣＳＦは、あまねくＣＮＳで硬膜によって包まれる。さらなる液体が吻ＣＮＳによって生成され、最終的に尾側脊髄へ排出され網嘴板を尾側の液流へ提供する。ＣＳＦは、主に塩、グルコース、タンパク質および水の、等浸透圧性の混合物である。腰部からのＣＳＦは、１５～４５ｍｇ／ｄｌのタンパク質（０．３～１％の血清タンパク質濃度）および５０～８０ｍｇ／ｄｌのグルコース（６０％の血糖）を含む。槽および脳室のＣＳＦのタンパク質濃度は低い。
【０００３】
ＣＳＦのタンパク質景観は２つのグループに分けられる。健康な個人のＣＳＦ中の主分画を構成する血液誘導タンパク質、および脳誘導タンパク質である。ＣＳＦ中のタンパク質のおよそ２０％が脳柔組織から生じるが、その部分集合のみが実際に脳特異的である。
【０００４】

液タンパク質の大部分が血清中に発見されているにも関わらず、ＣＳＦ独自のタンパク質の複合的な出所が存する。

【０００５】

ニューロンおよびグリア細胞から放出されるタンパク質、例えばタウタンパク質、Ｓ－１００およびニューロン特異的エノラーゼ（ＮＳＥ）。

【０００６】

軟髄膜から放出されるタンパク質、例えばβ－トレースタンパク質およびシスタチンＣ。

【０００７】

脈絡叢での合成の間のグリコシル化またはリン酸化によって特異に修飾されるタンパク質、例えばトランスチレチン（ＴＴＲ）、アンギオテンシンＩＩおよびインスリン様成長因子ＩＩ。

【０００８】

ＣＳＦと血漿との間にタンパク質分布の実質的な重複が存在し、多数のタンパク質がＣＳＦ独自であるか、あるいはＣＳＦ中でのリン酸化またはグリコシル化によって特異に修飾される。

【０００９】

側方流動検査、側方流動イムノクロマトートモグラフィック検定または銅板腐食検査が、所定の分析物の異種マトリクス中での存在または不在を素早く検出するためにデザインされる。現在、側方流動検査の変種が、在宅検査、ポイント・オブ・ケア検査、または実験室での使用、例えば妊娠検査（例えば、ファーストレスポンス（商標）、クリアブルー（商標））、ＨＩＶ検査（例えば、オラクイック　アドバンス（商標）、クリアビュー（商標）コンプリート）、またはクラミジア検査（例えば、クリアビュー（商標）クラミジア、インスティチェック（商標）クラミジア）のために購入可能である。

【００１０】

オラクイック　アドバンスまたはクリアビュー　コンプリート等のＨＩＶ検査に類似の、ＣＳＦの検出に適した検査が必要とされる。これはポイント・オブ・ケア検査である。検査はただ定性的である。検査を用いるのには最低限の訓練のみを要する。検査はストリップに内部制御を有し、正確なサンプリングを実証する。

【発明の開示】

【００１１】

実施形態の１つにおいて、試料中の脳脊髄液の存在または不在を検出するための装置は、試料添加領域、移動粒子と共役のＣＳＦ富化タンパク質への第一抗体からなる試料標識領域、およびＣＳＦ富化タンパク質への第二抗体からなる試料検出領域であって、該第二抗体は該試料検出領域に固定されるものとする領域からなり、第二領域の検出可能バンドの存在が、試料中の脳脊髄液の存在を示すものとする。

【００１２】

別の実施形態において、試料中のＣＳＦの存在または不在を検出するための方法は、試料の、ＣＳＦ富化タンパク質に特異的な結合パートナーとの接触、および結合パートナー－ＣＳＦ富化タンパク質複合体が存する場合のその検出からなり、検出可能複合体の存在が、試料中のＣＳＦの存在を示すものとする。

【００１３】

前記の実施形態において、ＣＳＦ抗原は、神経細胞付着分子様（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１；　登録番号　ｇｉ：６２０８８２３８）タンパク質のアイソフォーム１、鎖Ａ、ウシ膵臓トリプシン阻害剤（Ｂｐｔｉ）と複合したヒトメソトリプシン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：２；　登録番号　ｇｉ：　１６２３３００９５）；ＣＮＴＮ２コンタクチン－２前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　３；　登録番号　ｇｉ｜４８２７０２２）、コンタクチン－１のＣＮＴＮ１アイソフォーム２（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　４；　登録番号　ｇｉ：２８３７３１１９）、ＳＰＡＲＣ様タンパク質１（無名タンパク質産物）に高度に類似したｃＤＮＡ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　５；　登録番号：　ｇｉ｜１９４３８８０５０）、ＮＲ

ＣＡＭ（神経細胞付着分子）タンパク質［ホモ・サピエンス］のあるいはわずかに長い切片（～９６ｋＤａ）（登録番号：　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　６；　ｇｉ｜６８５３４６５２およびＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　７；　ｇｉｌ１０９７３１５０１）、ＮＣＡＭ２神経細胞付着分子２、アイソフォームＣＲＡ＿ａ（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　８；　登録番号　ｇｉ｜ｌ１１９６３０４０９）、ＳＥＲＰＩＮＡ３　セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ、アルファー１ーアンチキモトリプシン／生育阻害タンパク質２５［ホモ・サピエンス］のメンバー３前駆体／アイソフォーム１、あるいはアルファー１ーアンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　９；　登録番号　ｇｉ｜４６９８１９６１）、ＡＧＴ　アンギオテンシノーゲン（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１０；　登録番号　ｇｉ｜５５３１８１）、アンギオテンシノーゲン前駆体（セルピンＡ８）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１１；　登録番号　ｇｉ｜４５５７２８７）、免疫クロブリン上科とも呼ばれる無名タンパク質産物、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれるメンバー４Ｂ、（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１２；　登録番号　ｇｉ｜ｌ８７６０８３６３）、ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５９８９３、ディックコップフ（ｄｉｃｋｋｏｐｆ）同族体３前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１３；　登録番号　ｇｉｌ４０５４８３８９）、ＳＥＲＰＩＮＦ１セリン（またはシステイン）プロテイナーゼ阻害剤、クレードＦ（アルファー２　アンチプラスミン、色素上皮由来因子、Ｐｅｄｆ）、メンバー１アイソフォーム４因子（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１４；　登録番号　ｇｉ｜ｌ５９８８０２４）、ＧＣビタミンＤー結合タンパク質ＰＲＥＤＩＣＴＥＤ類似のヒトタンパク質、ビタミンＤー結合タンパク質［チンパンジー］（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１５；　登録番号　１８１４８２）、ＣＤ１４ヒト単核細胞抗原ＣＤ１４（ＣＤ１４）（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１６；　登録番号　ｇｉ｜ｌ１７６４６２１２）、ＣＡＤＭ３ホモ・サピエンス細胞付着分子３（ＣＡＤＭ３）、転写変異体１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１７；　登録番号　ｇｉ｜９００８０５０３；　ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１８；　ｇｉ｜ｌ８７６０８３６３　（ヒト））、神経細胞付着分子変異体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　１９；　登録番号　ｇｉ：６２０８８２３８）、ＣＬＵ　ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５７６２２に類似、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２０；　登録番号　ｇｉ｜ｌ８９０５４０９１）、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２１；　登録番号　ｇｉ｜ｌ９３７８７５０２）、ＬＭＡＮ２小胞性統合膜タンパク質ＶＩＰ３６（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２２；　登録番号　ｇｉ｜１５７８３４８００）、クラステリンアイソフォーム１［ホモ・サピエンス］（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２３；　登録番号　ＮＭ＿００１８３１．２）、超酸化物ジスムターゼ３、細胞外前駆体（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２４；　登録番号　ｇｉ｜ｌ１８５８２２７５）、フィブリン　アルファＣターム切片（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２５；　登録番号　ｇｉ｜２２３０５７）、鎖Ａ、ヒトカリクレイン６（Ｈｋ６）活性形またはカリクレインー６のＫＬＫ６アイソフォーム１（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２６；　登録番号　ｇｉ｜２１４６５９７０）、ＡＰＣＳ血清アミロイドＰー成分／鎖Ａまたは五量体ヒト血清アミロイドＰ成分（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２７；　登録番号　ｇｉ｜５７６２５９）、ＦＡＭ３Ｃタンパク質　ＦＡＭ３Ｃ／配列類似３の族、メンバーＣ前駆体［ホモ・サピエンス］記＝予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様ＥＭＴ誘導物質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２８；　登録番号　ｇｉ｜５５６２９２７２）、免疫グロブリン上科、メンバー４Ｂとも呼ばれる、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれる無名タンパク質産物［カニクイザル］類似のタンパク質（ＳＥＱ　ＩＤ　ＮＯ：　２９；　登録番号　ｇｉ｜１８７６０８３６３）、前記ＣＳＦ抗原のＣＳＦ富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記ＣＳＦ抗原のうち２つ以上の組み合わせである。

【００１４】

別の実施形態において、体液、組織または微生物中の反応物の検出方法は、体液、組織または微生物と２つ以上の抗体との接触からなり、個々の抗体は反応物中の抗原と特異的に反応し、個々の抗体との反応は反応物の陽性試験を指さないとともに、２つ以上の抗体との反応は反応物の陽性試験を指すものとする。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１５】
　他の体液に比してＣＳＦ富化されたタンパク質、および該タンパクの検出による質試料中の脳脊髄液（ＣＳＦ）の存在または不在の検出のための方法をここで述べる。民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い母集団の混合体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出のための装置および方法もここで述べる。抗体、リガンド、レセプター等の特異的タンパク質結合パートナーによってＣＳＦ富化タンパク質を検出する。結合パートナーは天然または合成結合パートナーでありうる。
　結合は直接または間接的に、例えば結合パートナーに結合された蛍光標識等によって検出される。抗体を結合パートナーとして用いるいくつかの実施形態が含まれるが、他の結合パートナーを抗体の代わりに用いうることは理解されるべきである。
【００１６】
　特定の実施形態において、ＣＳＦ富化タンパク質のレベルが定量される。このような定量は脳の傷害の識別に特に有用である。定量は結合パートナーによって検出可能標識を用いて行うことができる。“検出可能成分”または“標識”は、分光器、光化学作用、生化学、免疫化学または化学的手段によって検出可能な組成を指す。有用な標識には、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、蛍光染料、電子密試薬、酵素（例えばＥＬＩＳＡで一般に用いられるもの）、ビオチン－ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、および抗血清または単クローン抗体を用いることができるタンパク質が含まれる。検出可能成分はしばしば、試料中の結合した検出可能成分の定量に用いることができる放射性、色素、あるいは蛍光性の信号等の可測信号を生成する。検出可能成分は結合パートナーに、電子対の共有によって、またはイオン、ファンデルワールスあるいは水素結合を介して、組み込むかあるいは結合させることができる。検出可能成分は直接または間接的に検出可能でありうる。間接的検出は、第二の直接または間接的検出可能成分の検出可能成分への結合を含みうる。
【００１７】
　いくつかの実施形態において、ＣＳＦ検出は、例えば目的のＣＳＦに特異的な抗体を用いる側方流動検定によって行われる。側方流動検定は単抗原検定または複数抗原検定でありうる。実施形態の１つにおいて、複数抗原試験に、読むのが容易な単一の解答を生じる全ての抗原を用いる。別の実施形態において、複数抗原試験によって、存する抗原のより複雑な分布を複数の抗原のそれぞれに生ずる定性または定量がなされる。このような分布は頭部傷害の苛酷性の識別に有用でありうる。すなわち、特定のＣＳＦ特異性タンパク質が存する場合は頭部傷害は比較的苛酷でなく、他のＣＳＦ特異性タンパク質が存するかあるいは個々のタンパク質のレベルが傷害の度合いである場合は傷害はより苛酷である。
［単抗原検定］
【００１８】
　側方流動技術は多くの臨床検定で成功裡に用いられているが、ここで述べる特異で革新的なアプローチは技術を拡張し、ｉ）単独または複数のＣＳＦ富化タンパク質を結合し試験への反応性および特異性を向上するとともに／あるいは、ｉｉ）ＣＳＦ特異的翻訳後修飾（例えばリン酸化）を検出する。
【００１９】
　ここで用いるように、ＣＳＦ富化タンパク質またはＣＳＦ抗原あるいはポリペプチドは、ＣＳＦに特異的かあるいは他の体液に比してＣＳＦ中で豊富な抗原またはポリペプチドである。表１において、ＣＳＦ中で濃度が高いことが知られる複数のタンパク質が識別される。これらは本出願中で識別されるタンパク質ではないが、いくつかの実施形態においてここで多抗原検定において識別される１つ以上のタンパク質と組み合わせることができる。
【００２０】

【表１】

タンパク質	MW (kDa)	CSF濃度	CSF／血清比
βトレースタンパク質	25	16.6 mg/l	34:1
シスタチンC	13.3	3.1 mg/l	5:1
タウタンパク質	55-74	0.2 μg/l	10:1
S-100 B	21	1.5 μg/l	18:1
NSE	78	8 mg/l	1:1
トランスチレチン	55	17 mg/l	1:18
アルブミン	67	245 mg/l	1:205
IgG	150	25 mg/l	1:440

【００２１】

充分な量で存在するとともに他の体液のレベルに比してＣＳＦ中で有意に豊富であり、ＣＳＦの標識としてはたらくタンパク質について述べる。ＣＳＦの貯蔵された試料中に見られるタンパク質を、血液、鼻液、唾液、汗、涙および耳排出物（以下、「他の体液」と称する）の中のタンパク質と比較した。年齢の範囲（１～７０年）および男女両方からのＣＳＦを試験した。比較二次元ゲル電気泳動の前に、全ての液体を処理し主要な体液中に存在する優性血清タンパク質（すなわちアルブミン、ＩｇＧ等）を除去した。残ったＣＳＦからのタンパク質および別の体液を区別してＣｙ３およびＣｙ５で標識し、二次元ＰＡＧＥ上を移動させた。このアプローチを用いて、他の体液よりもＣＳＦ中で高濃度のタンパク質の新しい組み合わせが識別された。ＣＳＦ富化二次修飾タンパク質（すなわちリン酸化）もまた識別された。ＣＳＦ抽出物の脱リン酸化によって、ＣＳＦ特異斑がリン酸化に基づき等電位次元において較差移行することが確認された。

【００２２】

実施形態の１つにおいて、ＣＳＦ中で豊富なタンパク質を側方流動検定等の検定においてＣＳＦの検出に用いる。側方流動システムは試験遂行に必要な乾燥成分を含む重複膜からなる（図１）。これらの膜は、よりよい取り扱いのためにプラスチックのケース内に配置可能な小さいストリップへ組み立てられる。患者の素材を試料パッドに乗せる。全体の血液／毛細管血液試料の場合、血液セルおよび血漿の分離が起こる。患者の試料の液体画分は、目的の分析物に特異的な標識された抗体を含む共役パッドを経て拡散する。抗体（共役）が再溶解し、分析物が金（またはラテックス）共役によって特異的に結合する。分析物－金共役複合体は分析膜を経てさらに拡散する。この膜上に２つのラインが交互に配置される。（ｉ）分析物－金共役複合体を不動化する第二設定分析物特異的抗体を含むテストライン、および（ｉｉ）テストラインでの共役がオーバーフローしていることを示す非結合金抗体を固定するコントロールラインである。目的の分析物が検出限界より上で有効である場合、テストラインおよびコントロールラインは明瞭に可視である。分析物が検出限界より下の場合、試験時間の間コントロールラインのみが見える。迅速試験の最後の成分は、試験システムを移動する液体を単純に収拾するとともに液体の逆流を防止する移動（または沈下）パッドである。

【００２３】

側方流動免疫クロマトグラフィー検定は、サンドイッチ検定または競合検定として設計される。サンドイッチ検定は同じ分析物に反応する２つの異なる抗体を用い、テストライ

ンにおいて一方が分析物を色づけしもう一方が分析物を濃縮する。テストラインは陽性試料において色づけされた帯を示す。競合検定によって、テストストリップ上の既に色づけされた分析物およびテストライン上の分析物に対する抗体の組が示される。試料は示される色づけされた分析物とともにテストラインへ流れ、抗体結合と競合する。テストラインは陰性試料中の色づけされた帯として示される。

［ＣＳＦ検定設計仕様］

【００２４】

ここで述べる検定は、ＣＳＦが様々な非ＣＳＦ体液と混合された際の微量のＣＳＦの正確な識別に用いることができる。これらの「他の体液」は例えば鼻および耳排出物、唾液、涙、汗、尿および血液である。この検定は、対象の生理学的、代謝的または病理学的状態、性別、年齢あるいは民族によらず、不正確な陽性または不正確な陰性の結果を最小化することを意図する。

【００２５】

実施形態の１つにおいて、検出の限界は純粋な液または上記液体のいずれかの混合物中のＣＳＦの５％までである。より高い感度を達成しうるが、増大された感度に加えて特異性の維持が必要となる。よって、実施形態のいくつかにおいて、ＣＳＦの１％までの検出限界が達成される。

［多抗原ＣＳＦ「組織」検定］

【００２６】

実施形態の１つにおいて、検定は複数のＣＳＦ富化タンパク質の同時検出によってＣＳＦの存在の検出を可能とする。すなわち、試験にはＣＳＦへの２つ以上の標識が含まれ、ＣＳＦ検出の信頼性が向上される。単一の「バイオ標識」の試験よりも、複数標識検定は強壮であるとともに、様々な可能性および未知の情況において高い選択性および感度で正しい解答を示すであろう。例えば、抗体がＣＳＦ以外の液体（すなわち血液）中の抗原を認識した場合、単抗原検定は不正確な陽性を示しうる。検定がＣＳＦ内で豊富であるがＣＳＦに過剰ではない抗原を試験する場合、異常に高い血液のレベルによって不正確な陽性が示されうる。ありうる生理学的、病理学的、民族、性別、食餌、年齢依存等の条件から誤った結果となるストリップの試験は実行できないため問題になりうる。さらに、特定のＣＳＦ抗原のレベルが検出レベルより下に減少しうるか、あるいは特定のＣＳＦ抗原が稀な遺伝子型相違を有しうるので、特定のヒト母集団の反応性が低下し、誤った陰性が得られる。これらは全て、単一のＣＳＦ富化抗原の試験から生じるありうる問題である（図２参照）。混合体液試料中のＣＳＦを検出するための新しい多抗原検定は、単ＣＳＦ抗原試験より実質的に向上しているべきである。特定の実施形態において、多抗原試験は他の体液中でのレベルに比してＣＳＦ中で豊富な２、３、４、５、６、７、８、９または１０の抗原に特異的な少なくとも１つの抗体を含む。他の実施形態において、個々の抗原に特異的な少なくとも２つの抗体を用いる。

【００２７】

ここで述べるように、多数のＣＳＦ富化タンパク質斑を抽出しＬＣ－ＭＳによって解析する。このアプローチの原理は図２で説明される。複数のＣＳＦ富化抗原を識別し、少なくとも２つの異なる抗体を個々の抗原に供した。ＩｇＧの２つの組のそれぞれの混合物をテストストリップの可動および不動部分（図２参照）にそれぞれ加える。多抗原検定は、全ての抗体分子が結合した際のしきい値より下の、特定の抗原に対するある濃度の抗体の添加によってなされる。それぞれしきい値より下のレベルの複数の抗体の混合物を検定に用いる。ＣＳＦを加える際に、全ての抗体は結合し陽性信号の生成を集積する。最適な実施形態では、４つの検出しきい値を有する少なくとも５～６の異なる抗原を用い、単一の抗原の損失によって誤った陰性が生じないようにする。実施形態の１つにおいて、装置または試験は、それぞれ特異的に異なるＣＳＦ抗原と結合する４～１０の異なる抗体からなり、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としない。テストストリップ上でのＩｇＧ／抗原の集積は線形であるとともに、個々の抗体の検出のしきい値より低いレベルが用いられ、他の陽性抗体の添加によってのみ陽性反応が生じる。少なくとも４つのＩｇＧ／抗原の

集積を要する陽性反応において、検定はいずれか１つの抗原のレベルの変動にも関わらずより強壮である。検定はまた、汚染された体液中での単抗原免疫反応の異常な増加にも関わらずより強壮である。１〜３の抗原による人工的免疫反応では陽性試験ができないであろうため、試験はより強壮であるとともに誤った陽性がより少なくなるであろう。

［ＣＳＦ富化タンパク質の識別］

【００２８】

１〜４０人の個人からのＣＳＦ試料を蓄積し、蓄積した試料の２００μｌを解析する。１〜４０人の個人からの血清試料を蓄積し、蓄積した血清の１ｍｌを解析する。血液およびＣＳＦで共有される主要なタンパク質（すなわちアルブミン、免疫グロブリン等）が、反復親和クロマトグラフィーによって双方の試料から除去された。

【００２９】

生体外で、５０μｌの対照タンパク質抽出物および５０μｌの蓄積した試料を、ＧＥヘルスケアＣｙ３およびＣｙ５　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル染料で標識した。これらの染料は、染料の単一正電荷がタンパク質の修飾されたリジンまたはＮ末端失われた電荷と置換されることで、電荷および質量に関して適合する。Ｃｙ３およびＣｙ５標識タンパク質は、個々の試料において４５０Ｄａをタンパク質に加える染料標識とともに相互移動する。

【００３０】

対照、実験および内標準試料を混合し（すなわちタンパク質全体で１５０μｌ）、それから等しい体積の２Ｘサンプルバッファーを加えた。

【００３１】

体積はリハイドレーションバッファーによって４５０μｌに上げられる。イモビライン（商標）（ＩＰＧ）ドライストリップ（ＧＥヘルスケア）２４ｃｍを１０〜２４時間再水和し、等電集束を行った。３〜７、４〜７、３．５〜４．５、４．０〜５．０、４．５〜５．５、５．０〜６．０、５．５〜６．７および６〜９を含む複数の異なるｐＨ範囲を用いた。ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動（第二）を、幅１０インチ、高さ７．５インチ、厚さ１．０ｍｍのゲルの片側をゲルボンド（商標）で被覆して行った。最適に１２〜１００ｋＤのタンパク質を分離するであろう１２．５％ポリアクリルアミドゲルを用いた。

【００３２】

ＳＤＳ　ＰＡＧＥの直後に、ゲル（まだ２つのガラス板の間に保持されている）を、ＧＥヘルスケア　タイフーン（商標）９４１０イメージャーにおいて、同時に３つの波長で走査した。走査の後に、個々のカラーチャンネルの１６ビットＴＩＦＦファイルを、ＧＥヘルスケア　デサイダー（ＤｅＣｙｄｅｒ）ソフトウェアパッケージを用いたゲル内示差分析を用いた画像解析のために出力した。斑の検出（自動バックグラウンド補正、斑体積標準化および体積比計算を含む）の後に、使用者定義の“ダストフィルター”を個々のゲルに適用した。これは、非タンパク質斑をゲルから自動的に除去する効果を有するとともに、実験パラメーターの再計算に続く。

【００３３】

前側ガラス板を取り外し、それからゲルを固定するとともに、ゲルから目的の斑を切除するガイドとして用いる蛍光染料であるサイプロ　ルビー（Ｓｙｐｒｏ　Ｒｕｂｙ）で染色した。ゲル中の全てのタンパク質を染色するサイプロ　ルビーを用いた理由は、取り込みの範囲がモルＣｙ染料／モルタンパク質に関して５％未満となるようにＣｙ染料標識が行われるためである。Ｃｙ染料は約５８０Ｄａの分子量を有するため、Ｃｙ染料で標識された低分子量のタンパク質（例えば１０Ｋｄ）は必ずしもその未標識相当品とともにＳＤＳ　ＰＡＧＥ中を移動しない。

【００３４】

ＧＥヘルスケア　デサイダー（商標）ソフトウェアをゲル画像の定量、および切除されるとともにＭＳに基づくタンパク質識別の対象となる示されたタンパク質斑の識別に用いた。デサイダー　ソフトウェアは、同一または別のゲル上のいずれか２つのＣｙ染色ゲル

画像を解析し、２つの画像の斑を結び付けるとともに、異なって示されたタンパク質斑を識別することができる。デサイダー（商標）ソフトウェアは、Ｃｙ－２内部標準を用いたｔ－試験値を含むタンパク質表出の統計的に有意な相違の一覧を自動的に出力する。異なって示される斑は、面積、体積、３Ｄピーク勾配、３Ｄピーク高さ、および／あるいは統計的変化を含む複数の基準を用いて識別された。２つの試料の間で異なる度合いの強度を示すタンパク質斑は、ソフトウェアによって強調されるとともに、手動で確認される。デサイダー ソフトウェアはまた、サイプロ ルビー画像の解析、サイプロ染色で見出された斑のＣｙ染色で識別された斑との結び付け、およびサイプロ染色ゲル画像からの「ピックリスト」の選択に用いられた。

【００３５】

タンパク質斑ピックリストは、選択されたタンパク質斑をゲルから自動的に切り出すとともに９６ウェルミクロタイタープレートへ移動するエッタン（Ｅｔｔａｎ）（商標）スポットピッカー器具（ＧＥヘルスケア）へ移転される。

【００３６】

切り出されたタンパク質斑は、それからエッタンＴＡダイジェスターでの自動ゲル内トリプシン消化の対象となった。

【００３７】

個々の消化の部分標本は、（マトリクスとともに）ＭＡＬＤＩ－ＭＳターゲット上に配置された。

【００３８】

高質量精度自動ＭＡＬＤＩ－ＭＳ／ＭＳスペクトルを個々の対象で取得し（アプライドバイオシステムズ４８００Ｔｏｆ／Ｔｏｆ器具を使用）、結果のペプチド塊をマスコット アルゴリズムを用いてデータベースから検索した。

【００３９】

このアプローチで識別されなかったタンパク質斑の消化の残りの部分標本を、得られたＭＳ／ＭＳスペクトルとともにナノスプレーまたはＬＣ／ＭＳ／ＭＳ解析し（マイクロマスＱ－Ｔｏｆ）、それからシーケスト（Ｓｅｑｕｅｓｔ）データベース検索の対象とすることで試料中に存在するタンパク質を識別した。

［ＣＳＦテストストリップの抗原としてのＣＳＦ富化タンパク質リン酸化サイト］

【００４０】

ＣＳＦ富化タンパク質の識別のための蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動（ＤＩＧＥ）実験中に、高度にＣＳＦ富化されたｐＨ次元に分布する斑（すなわち血液試料中に存在しない）を識別したが、ＬＣ－ＭＳタンパク質識別において、これらのタンパク質の多くが実際に血液中に存在するがゲルのｐＨ次元において異なるパターンを有することが確認された（図６）。一様に間隔を置かれた同じ分子量の斑はしばしば、同じタンパク質の異なるリン酸化変型を示す。ｐＨ次元中の異なる、および規則的な移動は、PO_3^-集団の負電荷の大きくしかし非連続な性質を示す。これらの斑配列のホスホペプチドマッピング上で、これが実際にあったことが決定された。これらのタンパク質のいくつか（アンギオテンシノゲン（図６）を含む）は、高度にＣＳＦ富化されたリン酸化を有していた。いくつかの場合において、これらのリン酸化サイトはセリン／トレオニンのリン酸化であり、別の場合ではチロシンのリン酸化であった。全ての場合において、タンパク質はタンパク質毎の複数のリン酸化サイトで選択された（すなわちアンギオテンシノーゲン）。リン酸化されている場合のみ単エピトープを認識する抗体を生成可能なので、リン酸化サイトはここで述べる検定での抗原として含まれうる。これらのリン酸化エピトープは非常に普及しているので候補として有力であり、単一タンパク質上の２つのＣＳＦ富化リン酸化サイトの存在によって、ストリップの可動および不動領域において差別的に用いることができ、陽性反応のために二重リン酸化を必要とする異なるサイトへの抗体の組を作ることが促進される。アルカリホスファターゼで脱リン酸化したＣＳＦタンパク質と比してＤＩＧＥゲルを移動させた（図９）。これによってここで列挙したタンパク質がＣＳＦ中での差別的リン酸化として識別された。

【００４１】
抗原の識別は、２次元ＤＩＧＥゲル電気泳動およびその後のトリプシン消化およびＬＣ－ＭＳによってなされる。血液およびＣＳＦの双方で主要なタンパク質は、電気泳動の前にアフィニティカラムで除去される。これらのタンパク質は体液中に遍在する（すなわちアルブミン、免疫グロブリン等）。全ての試料を二重にカラムをわたって移動させ、１４の支配的血清タンパク質を除去する。血液全体の１～２ｍｌから抽出したタンパク質を、２００μｌのＣＳＦからのタンパク質とともにゲル上で移動させる。これによって血液タンパク質が富化され、ＣＳＦ中で豊富なタンパク質の識別が確実となる。ＣＳＦからのタンパク質をＣｙ３またはＣｙ５蛍光体を用いて標識する。これに対し血液タンパク質はＣｙ３またはＣｙ５でそれぞれ標識する。それから試料を混合し、２次元ＰＡＧＥゲルに入れる。多数の異なるゲルを、分子量次元（Ｙ－次元）およびｐＨ次元（Ｘ－次元）の異なる領域について用いた。ゲルを用いた後で、差別的に視覚化した蛍光標識タンパク質の強度を定量し、自動化コンピュータープログラムで比較する。ＣＳＦ中で少なくとも５倍豊富な斑を機械的に収集し、トリプシン消化するとともにＬＣ－ＭＳで解析する。ペプチド分子量を公表されたデータベースと比較する。豊富なタンパク質を候補として選択し、標準分子生物学的方法論を用いてバクテリア中のヒスチジン標識組み替えタンパク質またはタンパク質の特異的領域に対応する別のペプチドを人工的に生成する。単クローン性および多クローン性抗体を商用個人用抗原によって生成する。臭化シアン活性カラムおよび組み替えタンパク質を免疫処置のために用いる標準カラム技術によって親和性精製を行う。ＣＳＦ特異性抗原を、トリプシンおよびキモトリプシン消化およびその後のＬＣ－ＭＳおよびホスホペプチド測定によって識別する。

【００４２】
ＣＳＦ富化抗体の確認は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上の体液タンパク質全体の個別の部分の分割、ニトロセルロース膜への移動、最初に抗原に対する一次抗体、次にＨＲＰ標識二次抗体での免疫ブロットおよびその後のＥＬＣ定量によってなされる。血液、鼻および耳排出物、涙、唾液または汗の全体より大きい体積のレベルのＣＳＦ中で５倍より多い免疫反応性を有する抗原が追求される。２０～３０人の異なる個人からの体液の試料を個々の抗原について試験した。液試料は純度が保証される商業研究所から購入されるか、あるいは直接収集される。幼児から老人（７５歳）までの年齢、男性および女性、複数の一般的な病的条件（すなわち高次の糖尿病、冠状動脈疾患、喘息等の範囲の個人からの体液が試験される。

【００４３】
リン酸化状態特異的抗原の識別のために、２次元ゲルを前記のように生成し、しかし３つの標識されたタンパク質画分を生成し（Ｃｙ２、Ｃｙ３およびＣｙ５）、ＣＳＦ、血液全体およびＣＳＦタンパク質内で標識より前の追加の工程において全てのリン酸化タンパク質がアルカリホスファターゼによって除去する。それから脱リン酸化されたＣＳＦチャンネルと通常のＣＳＦチャンネルとの比較を改変のために行う。脱リン酸化の後で消えるとともに血液タンパク質蛍光チャンネルに存在しない斑を、収集し配列決定する。リン酸化のサイトの絶対的識別は、リン酸化ペプチドおよびリン酸化アミノ酸の解析、組み替えタンパク質およびタンパク質切片の生体外リン酸化、およびリン酸化特異的抗体との免疫反応によって決定される。

【００４４】
テストストリップ中で用いる抗体が選択されると、個々の抗体の相対的親和性は、組み替え抗原の純粋な試料を用いた希釈曲線によって決定されるであろう。これによってテストストリップ上の包含のための抗体の混合が誘導されるであろう。

【００４５】
実施形態の１つにおいて、迅速、臨床、または傷病者の優先順位づけの体液、外科的サイトまたは傷の、脳脊髄液の存在のための試験の装置および方法が含まれる。別の実施形態において、試験は中枢神経系（ＣＮＳ）傷害、裂傷または損傷の表示としての血液、血漿または血清の試料中のＣＳＦ富化タンパク質の検出を可能とすることを企図する。小児

から老人の広い範囲の個人に、体液の組成を変化させうる疾患、個人的習慣または個人の遺伝的変異性の存在によらずに、ＣＳＦの検出に個別または組み合わせて用いることができる新たに識別されたＣＳＦ特異的または富化抗原がここで述べられる。

【００４６】

実施形態の１つにおいて、脳脊髄液を含むのではないかと疑われる試料等の試料中の脳脊髄液の検出のための装置が含まれる。該装置は前記のＣＳＦ抗原の１つ以上に特異的な１つ以上の抗体を含む。ＣＳＦ抗原は組み合わせて用いることで、信号対雑音比を増強する、または異なる体液中の前記の抗原の発現において個々の変異性を克服することができる。実施形態のいくつかにおいて、複数の抗原の検出により、ＣＳＦ富化抗原の検出における優れた感受性および選択性が得られる。

【００４７】

実施形態の１つにおいて、脳脊髄液を含むのではないかと疑われる試料等の試料中の脳脊髄液の検出のための装置についてここで述べられる。該装置は、脳脊髄液に特異的であるとともに翻訳後修飾の効能によって他の体液中の同じ抗原から区別可能な翻訳後修飾の状態の１つ以上のＣＳＦ抗原に特異的な１つ以上の抗体を含む。

【００４８】

実施形態のいくつかにおいて、脳脊髄液を含むのではないかと疑われる試料等の試料中の脳脊髄液の検出のための装置についてここで述べられる。該装置は、脳脊髄液に特異的であるとともにリン酸化の効能によって他の体液中の同じ抗原から区別可能なリン酸化状態の１つ以上のＣＳＦ抗原に特異的な１つ以上の抗体を含む。

【００４９】

ここで開示される装置を用いた試験のための試料は、ＣＳＦ漏出が起こりうる外科のサイト（すなわち頭、首、耳、喉、鼻または脊髄手術）、硬膜外注射または脊椎穿刺のサイト、脳脊髄膜の裂傷が起こりうる領域（すなわち頭、首、脊髄、鼻区画、鼻、耳、喉、頭蓋等）あるいは負傷した集合髄膜裂傷または中枢神経系の深刻な傷害の可能性の兆候を実証する領域の創傷のサイト、あるいは硬膜外注射、脊椎注射または脊椎穿刺のサイト等の人体の異なるサイトから取得できる。ここで識別された抗原は脳傷害のために特に良好な標識である。さらなる試料には唾液試料および尿試料が含まれる。

【００５０】

２Ｄ－ＤＩＧＥ研究を用いてヒトＣＳＦと血清との成分の比較を行う特異なアプローチによって、ＣＳＦに特異的かあるいはＣＳＦ中で豊富な多数の抗原が得られた。これらの抗原に特異的な抗体は、体液中、またはその存在が非定型であるとともに患者または外傷被害者の健康または寿命をおびやかしうる創傷、外科または注射のサイトでの、ＣＳＦの存在の標識である。

【００５１】

実施形態のいくつかにおいて、前記のＣＳＦ抗原はリン酸化、グリコシル化、ＳＵＭＯ化、ユビキチン化、脂質付加、ニトロシル化、アセチル化、ＮＥＤＤ８付加等の翻訳後修飾を有する。これらの翻訳後修飾は抗原のＣＳＦ形態に特異的であり、側方流動検定、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡまたは免疫沈降反応に用いうる。

【００５２】

実施形態のいくつかにおいて、複数の抗原を用いうるとともに、該抗原は様々な検定、側方流動、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡまたは免疫沈降反応において、単一抗原（未修飾抗原）を検出する抗体と前記のような翻訳後修飾された抗原を検出する抗体との組み合わせを含みうる。

【００５３】

実施形態の１つにおいて、試料がＣＳＦの存在または不在を示すＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを含む場合、抗体を検出に用いる。抗体結合は、例えば放射免疫検定、ＥＬＩＳＡ（酵素結合免疫吸着検定）、“サンドイッチ”免疫検定、免疫放射定量検定、表面プラズモン共鳴、免疫細胞化学、免疫組織化学、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散検定、原位置免疫検定（例えばコロイド状金、酵素または放射性同位元素標識を用いる）、

ウェスタンブロット、沈降反応、凝集検定（例えばゲル凝集検定、血球凝集検定等）、補体結合検定、免疫蛍光検定、Ａタンパク質検定、免疫電気泳動検定等によって検出される。抗体結合の検出は、酵素、比色、蛍光、生物発光、ルミネセンス、着色ラテックスビーズ、コロイド状金および／または銀の方法を用いて達成可能である。

【００５４】

実施形態の１つにおいて、抗体結合は、一次抗体上の標識の検出によって検出される。別の実施形態において、一次抗体は二次抗体の結合または一次抗体への試薬の検出によって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体が標識される。免疫検定中の結合の検出のための技術は多くが知られている。

【００５５】

実施形態のいくつかにおいて、自動検出検定が用いられる。免疫検定の自動化の方法には米国特許５８８５５３０号、４９８１７８５号、６１５９７５０号および５３５８６９１号に記載の方法が含まれ、これらは参照によって組み込まれる。実施形態のいくつかにおいて、結果の解析および提示もまた自動化される。例えば、実施形態のいくつかにおいて、免疫検定の結果に基づく試料中の特異的ポリペプチドの存在およびＣＳＦの確度に相関するスコアを生成するソフトウェアが用いられる。

【００５６】

別の実施形態において、免疫検定は米国特許５５９９６７７号および５６７２４８０号で述べられるようであり、これらは参照によって組み込まれる。

【００５７】

単離された抗体または抗体切片（例えばＦａｂ切片、Ｆａｂ２切片等）が提供される。抗体を生成しＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを検出することができる。抗体はＣＳＦおよびその切片の存在と関連付けられた様々なポリペプチド、合成ペプチドおよび／または組み替えペプチドを用いて調製される。実施形態の１つにおいて、免疫原はＣＳＦおよびその切片の存在と関連付けられたポリペプチド、合成ペプチドおよび／または組み替えペプチドであり、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを認識する抗体が生成される。実施形態の１つにおいて、抗体は天然または“折り畳まれた”タンパク質と反応する。別の実施形態において、抗体は変性タンパク質（界面活性剤による可溶化を含む）と反応する。このような抗体は、多クローン性、単クローン性、キメラ、単鎖、Ｆａｂ切片、Ｆａｂ発現ライブラリ、または組み替え（例えばキメラ、人間化等）抗体を、それがタンパク質を認識可能である限りは含むが、これらに限定されない。抗体は、従来の抗体または抗血清調製工程に基づき、タンパク質またはペプチドを抗原として用いて生成することができる。

【００５８】

ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドに対する多クローン性抗体の生成には、様々な手順が用いられる。抗体の生成のために、様々な宿主動物を、ＣＳＦおよびその切片の存在と関連付けられたポリペプチド、合成ペプチドおよび／または組み替えペプチドの注射によって免疫化する。これにはウサギ、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ロバ等が含まれるがこれらに限定されるものではない。特異的な実施形態においては、ペプチドは免疫抗原性担体（例えばジフテリア類毒素、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）またはスカシガイヘモシアニン（ＫＬＨ））と共役される。様々な補助剤を用いて宿主の種に依存する免疫反応を増大しうる。該補助剤には、フロイント（完全および不完全）、ミネラルゲル（例えば水酸化アルミニウム）、表面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、多価陰イオン、ペプチド、油乳濁液、スカシガイヘモシアニン、ジニトロフェノール、およびＢＣＧ（カルメットーゲラン菌）やコリネバクテリウムーパルヴム等の有用かもしれないヒト補助剤が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００５９】

ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチド、合成ペプチドおよび組み替えペプチドに対する単クローン性抗体の調製のために、培養での連続的細胞系による抗体分子の生成の技法が考えられる。これには当初ケーラーおよびミルスタインによって開発されたハイブ

リドーマ技法、トリオーマ技法、ヒトＢ細胞ハイブリドーマ技法、およびＥＢＶハイブリドーマ技法によってヒト単クローン性抗体を生成することが含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００６０】

さらなる実施形態において、単クローン性抗体が無菌動物から生成される。さらに、ヒト抗体をヒトハイブリドーマによって、またはヒトＢ細胞のＥＢＶウイルスでの生体外形質変換によって生成することが考えられる。

【００６１】

加えて、単鎖抗体の生成のために述べられる技法を単鎖抗体の生成に用いることが考えられる。さらなる実施形態において、Ｆａｂ発現ライブラリの構成によって単クローン性Ｆａｂ切片を望ましい特異性で迅速かつ容易に識別する技法が用いられる。

【００６２】

他の実施形態において、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドに対する組み替え抗体またはその切片が考えられる。組み替え抗体にはヒト化およびキメラ抗体が含まれるが、これらに限定されるものではない。組み替え抗体の生成方法は当該分野で既知である。

【００６３】

抗体切片の生成に適した技法を、抗体分子のイディオタイプ（抗原結合領域）を含む抗体切片の生成に用いることが考えられる。例えば、このような切片には抗体分子のペプシン消化によって生成されるＦ（ａｂ’）$_2$切片、Ｆ（ａｂ’）$_2$切片のジスルフィド架橋の還元によって生成されるＦａｂ’切片、および抗体分子をパパインおよび還元剤で処理することで生成されるＦａｂ切片が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【００６４】

実施形態の１つにおいて、抗体結合は一次抗体の標識の検出によって検出される。他の実施形態において、一次抗体は二次抗体の結合または一次抗体への試薬の検出によって検出される。さらなる実施形態において、二次抗体は標識される。免疫抗原性ペプチドは、免疫化プロトコルで用いられる担体分子無しで生成されうる。例えば、ペプチドがＫＬＨと共役した場合、スクリーニング検定においてＢＳＡと共役するかもしくは直接用いられる。

【００６５】

前記の抗体は、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドの局在および構造（例えばウエスタンブロットのための）、適当な生物試料中のそのレベルの測定等に関する技術において既知の方法に用いることができる。抗体は個人からの生物試料中のＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドの検出に用いることができる。生物試料には、組織、血液、血清、血漿、尿、鼻および耳排出物、唾液、汗、涙等の生物液が含まれるが、これらに限定されるものではない。実施形態の１つにおいて、試料はスポーツ催事、自動車事故、軍事活動およびオートバイ事故への参加による軽度の外傷性脳傷害といった脳傷害を有すると疑われる個人からのものである。試験は傷害が苛酷性において緩和される軽度の場合において最も有用であろう。貫通傷害を含むより苛酷な頭部傷害は、概して既に必要な水準の医療処置を受けている。外傷性脳傷害の診断は概して短期神経系試験（ＧＣＳ）を要する。軽度で穏やかな傷害の正確な指示は、時には近年のベースライン、傷害前試験無しでの目的の識別が困難である。他の傷害または処置（鎮静、麻酔等）は試験に干渉しうる。現在の抗原の組は、頭部傷害の実在および苛酷さの“指紋を取る”のに用いられうる“バイオマーカー”を示すことができる。血液または他の体液（汗、尿、唾液等）中のこれらの抗原のサブセットの存在の定性的または定量的な迅速試験は、ＧＣＳまたは他のそのような神経系試験との組み合わせで、傷害の苛酷さの測定として用いることができる。しばしば頭部傷害を緩和する苛酷さの軽さ、およびどのような度合いで個人がクリティカル・アクティビティを受けることを継続する（すなわちスポーツ催事への参加の継続、乗り物の操作または運転の継続、戦闘領域への残留、戦闘の指令位置への就任の継続、重機械の操作等）は知られない。通常はＣＳＦにおいてのみ豊富な血液に運ばれるか分泌されるタ

ンパク質のより具象的な試験は、傷害の診断試験を示しうる。
【００６６】
生物試料をそれから、適当な戦略（例えばＥＬＩＳＡまたは放射免疫検定）およびフォーマット（例えばマイクロウェル、ディップスティック（例えば国際特許公報ＷＯ　９３／０３３６７で開示されるもの））で、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドの存在について直接試験することができる。あるいは、試料中のタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム（ＳＤＳ）、トライトン、ノニデット（あるいは他のイオン性または非イオン性界面活性剤）の存在下または非存在下、免疫ブロット（ウェスタンブロット）で検出されるＣＳＦ抗原の存在下で、サイズで分離（例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＰＡＧＥ））する。タンパク質のエピトープに対応するペプチドに対して生成される抗体を用いる免疫ブロット技法は概してより効果的であり、そのため本開示に特に適している。
【００６７】
前記の相関手順は定性的または定量的に、例えば蛍光体検定や比色検定において実行されうる。
［キットおよび装置］
【００６８】
試料がＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを含むか否かの検出のためのキットおよび装置もまた提供される。診断キットおよび装置は様々なやり方で作成される。実施形態のいくつかにおいて、キットおよび装置は少なくとも１つの、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを特異的に検出する試薬を含む。特定の実施形態において、キットおよび装置はＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを特異的に検出する複数の試薬を含む。他の実施形態において、試薬はＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドと選択的に結合する抗体である。試験は、複数の抗原についての複数（２～１０）の試験ＣＳＦの存在を示す結果を生成しうる。あるいは、個々の試験はＣＳＦの存在または不在を示すと解釈できる異なる明白な結果を示しうる。
【００６９】
実施形態のいくつかにおいて、キットまたは装置は、試料がＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドを含むか否かの検出のための説明を含む。特定の実施形態において、該説明は、ＣＳＦの存在または不在は対象の試料中にＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドが存在するか否かの検出によって決定されることを特定する。
【００７０】
実施形態のいくつかにおいて、キットおよび装置は、緩衝剤、タンパク質安定剤等の補助的な試薬、およびシグナル生成システム（例えばＦＲＥＴシステム等の蛍光生成システム）を含む。試験キットまたは装置は、適当な方式、典型的には必要により単一のコンテナまたは複数の様々なコンテナに、試験を行うための説明のシートとともにパッケージされる。実施形態のいくつかにおいて、キットまたは装置は陽性対照試料を含む。さらなる実施形態において、キットまたは装置は、強度、カラースペクトルまたは他の指標の物理的属性によりＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドが存在するか否かを解釈するための比較試験材料を含む。
【００７１】
ＣＳＦ診断のための健康管理に用いることが可能な、迅速で再生可能かつ反応性が高く単純な診断試験の要求は大いに重要である。このような試験は、既存の実験室試験、すなわち免疫固定電気泳動、酵素免疫吸着検定（ＥＬＩＳＡ）および免疫ブロットに対し、実験室に試料を送る場合は数日を要したのに対し即座に患者の傍で行い数分で結果を得られるという明白な利点を有する。側方流動免疫クロマトグラフィー試験を、生物液中のＣＳＦ検出のための診断キットの作成に用いてもよい。
【００７２】
実施形態の１つにおいて、装置は、ＣＳＦ抗原との結合に適した可動指示体を含む第一相、およびＣＳＦ抗原との結合に適した固定指示体を含む第二相からなる固相を含む。
【００７３】

実施形態の１つにおいて、側方流動装置は、任意に樹脂テストカセットを伴うテストストリップを含む。抗体は、１つの膜の３つの異なる帯域に付着する。それは、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドに対する第一の単クローン性抗体を含む試料帯（Ｓ）、膜において固定化されたＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドに対する第二の単クローン性または多クローン性抗体を含む試験帯（Ｔ）、および例えば固定化ウサギ抗マウス抗体等の対照抗体を含む対照帯（Ｃ）である。試料帯（Ｓ）中の第一の単クローン性抗体は例えば着色ラテックス粒子や金粒子等の可動粒子と共役する。あるいは、第一の単クローン性抗体は、蛍光分子やタグ（緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）またはＦＰオルソログ変異体および他の自然発生ＧＦＰ類似蛍光有色タンパク質、フルオレセイン（およびオルソログ）、ローダミン（およびオルソログ）、Ｃｙ３、Ｃｙ５、Ｃｙ２、Ｃｙ７、Ｃｙ８、アレクサ（商標）染料、テキサスレッド等）等の発色指示体と共役する。

【００７４】

典型的な装置は、単クローン性抗体の使用に基づく免疫クロマトグラフィー試験を用いて実行される。試料をＳ帯域に加え、ＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドが存在する場合、第一の単クローン性抗体と結合してポリペプチド共役複合体を形成する。この複合体は膜上をクロマトグラフィーにより移動し、Ｔ帯域の固定抗体に達すると、凝集が起こり青色のバンドが形成される。

【００７５】

簡潔に、実施形態の１つにおいて、第一の単クローン性抗体は金またはラテックスビーズ等の可動粒子と共役する。これらのビーズは固有の色を有し、赤である（金について）かもしくはラテックスビーズを用いた場合に異なる色になりうる。試料が“Ｓ帯域”に加えられると、標識、試料中に存在する場合はＣＳＦの存在と関連付けられたポリペプチドが、ビーズと共役した第一の単クローン性抗体と結合し、それから、その上にビーズが配置された側方流動吸収パッドにより、複合体（ビーズ＋抗体＋試料中に存在する場合はポリペプチド）が側方に移動する。複合体が、第二の抗体がストリップ上に固定されている“Ｔ帯域”に達した場合、複合体とともに移動している標識が第二の固定抗体と結合する。第二の抗体は固定されているので、複合体全体が捕捉され、複合体は着色されたビーズを含むので、固定Ｔ帯域ラインは用いたビーズ（赤（金について）もしくはラテックスビーズを用いた場合に異なる色（青様））によって発光する。過剰な複合体試料はストリップの終末まで移動し、“Ｃ帯域”においてビーズと共役した第一の抗体が固定化ウサギ抗マウス抗体に捕捉され、試験の完了を示す着色されたラインが得られる。よって、着色されたバンドは陽性の結果を示す。Ｔ帯域にバンドが無いことは陰性の結果を示す。Ｃ帯域の固定多クローン性抗体は陽性および陰性試料と共役したラテックスと結合するであろう。この青いバンドは正しい試験実行の証明となる。

【００７６】

実施において、キットおよび装置は様々な臨床設定において試料中のＣＳＦの存在の検出に用いられる。

【００７７】

本発明は以下の限定しない例によって説明される。

［例］

【００７８】

ここで新たに識別されたＣＳＦ特異性抗原は以下を含む。それは、神経細胞付着分子様のアイソフォーム１（登録番号ｇｉ｜６２０８８２３８）タンパク質、鎖Ａ、ウシ膵臓トリプシン阻害剤と複合したヒトメソトリプシン（Ｂｐｔｉ）（登録番号ｇｉ｜１６２３３００９５）、ＣＮＴＮ２　コンタクチン－２（登録番号ｇｉ｜４８２７０２２）、ＣＮＴＮ１　コンタクチン－１のアイソフォーム２（登録番号ｇｉ：２８３７３１１９）、ＳＰＡＲＣ様タンパク質１に高度に類似のｃＤＮＡ（登録番号ｇｉ｜１９４３８８０５０）、ＮＲＣＡＭタンパク質（ニューロン細胞付着分子）［ホモ・サピエンス］あるいはわずかに長い切片（～９６ｋＤａ）（登録番号ｇｉ｜６８５３４６５２およびｇｉ｜１０９７３１５０１）、ＮＣＡＭ２　神経細胞付着分子２（登録番号ｇｉ｜１１９６３０４０９）、

ＳＥＲＰＩＮＡ３　セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードＡ、アルファー１ー抗キモトリプシン／生育阻害タンパク質２５のメンバー３前駆体／アイソフォーム１［ホモ・サピエンス］またはアルファー１ー抗キモトリプシン前駆体のわずかに長い切片（登録番号ｇｉ｜４６９８１９６１）、ＡＧＴ　アンギオテンシノーゲン（登録番号ｇｉ｜５５３１８１）、アンギオテンシノーゲン前駆体（セルピンＡ８）（登録番号ｇｉ｜４５５７２８７）、免疫グロブリン上科、ヒト中のメンバー４Ｂとも呼ばれ、また細胞付着分子３とも呼ばれる無名タンパク質産物、ありうる切片（登録番号ｇｉ｜１８７６０８３６３）、ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５９８９３、ディックコップフ同族体３前駆体（登録番号ｇｉ｜４０５４８３８９）、ＳＥＲＰＩＮＦ１　セリン（またはシステイン）プロテイナーゼ阻害剤、クレードＦ（アルファー１抗プラスミン、色素エピセリウム誘導因子）、メンバー１アイソフォーム４［チンパンジー］因子（登録番号ｇｉ｜１５９８８０２４）、ＧＣビタミンＤー結合タンパク質ＰＲＥＤＩＣＴＥＤ、ビタミンＤー結合タンパク質［チンパンジー］（登録番号１８１４８２）、ＣＤ１４　ヒト単核細胞抗原ＣＤ１４（ＣＤ１４）（登録番号ｇｉ｜１１７６４６２１２）、ＣＡＤＭ３　ホモ・サピエンス細胞付着分子３（ＣＡＤＭ３）、転写変異体１（登録番号ｇｉ｜９００８０５０３、ｇｉ｜１８７６０８３６３（ヒト））、神経細胞付着分子変異体（登録番号ｇｉ６２０８８２３８）、クラステリンに高度に類似のＣＬＵ　ｃＤＮＡ　ＦＬＪ５７６２２（登録番号ｇｉ｜１８９０５４０９１）、クラステリンに高度に類似のタンパク質（登録番号ｇｉ｜１９３７８７５０２）、ＬＭＡＮ２　小胞性統合膜タンパク質ＶＩＰ３６（登録番号ｇｉ｜１５７８３４８００）、超酸化物ジスムターゼ３、細胞外前駆体（登録番号ｇｉ｜１１８５８２２７５）、フィブリン　アルファＣターム切片（登録番号ｇｉ｜２２３０５７）、ＫＬＫ６　カリクレインー６のアイソフォーム１（登録番号ｇｉ｜２１４６５９７０）、ＡＰＣＳ　血清アミロイドＰー成分／鎖Ａ、五量体ヒト血清アミロイドＰ成分の構造体（登録番号ｇｉ｜５７６２５９）、ＦＡＭ３Ｃタンパク質　ＦＡＭ３Ｃ／配列類似３の族、メンバーＣ前駆体［ホモ・サピエンス］、記＝予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様ＥＭＴ誘導物質（登録番号ｇｉ｜５５６２９２７２）、鎖Ａ、ヒトカリクレイン６（Ｈｋ６）活性形態およびベンズアミジン阻害剤（登録番号ｇｉ｜２１４６５９７０）、免疫グロブリン上科、メンバー４Ｂとも呼ばれる、ヒトにおいて細胞付着分子３とも呼ばれる無名タンパク質産物［カニクイザル］類似のタンパク質、ありうる切片（登録番号ｇｉｌ１８７６０８３６３）、および前記ＣＳＦ抗原のＣＳＦ富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記ＣＳＦ抗原のうち２つ以上の組み合わせである。

【００７９】

ここで開示される全ての範囲は包括的かつ組み合わせることができる。本発明は好ましい実施形態に関して述べられているが、本発明の範囲内において様々な変更がなされうるとともに要素を同等物と置換しうることは、当業者には理解されるであろう。さらに、特定の状況または材料を本発明の教示に適合するための多くの改良が、本発明の本質的な範囲内においてなされうる。よって、本発明は、本発明を実行するのに考えられる最良の形態として開示される特定の実施形態に限定されず、本発明は添付の請求項の範囲内の全ての実施形態を含むであろうことが意図されるものである。

【００８０】

引用した特許、特許出願、他の文献の全ては、その全体を参照によってここに組み込む。

【図面の簡単な説明】

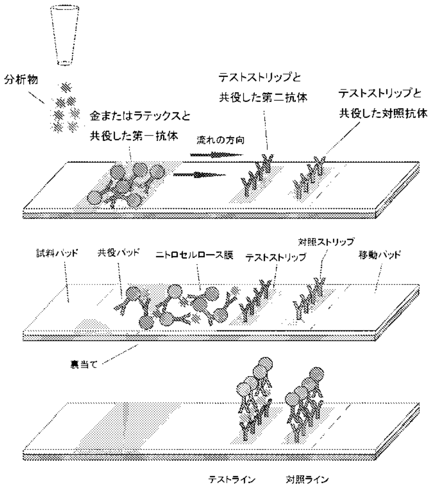
【００８１】

【図１】図１は側方流動検定である。分析物をドロッパーまたは直接滴下でストリップの左端から加える。液体（約７５μｌ）をストリップをわたって右へ移動させる。共役パッドは、可視粒子（金またはラテックス微小球）に取り付けられた可溶性ＩｇＧを含む。分析物溶液が分析物を含む場合、抗体は共役し、複合体がストリップをわたって移動する。混合物はまず、分析物に対する固定化抗体を含むテストストリップに接近する。分析物、可溶性の一次および可視タグは、それからテストラインに結合する。分析物が存在しない

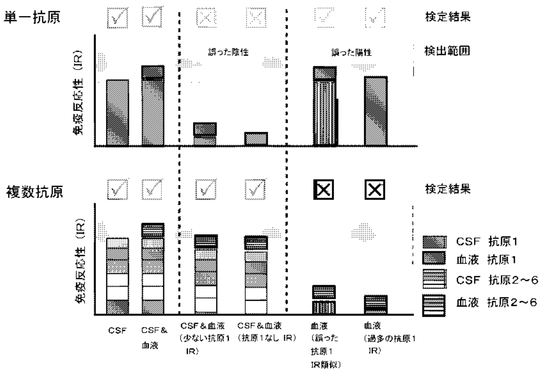
場合、可溶性分画はテストラインを通過する。分析物が存在するかどうかによらず、指標に結合した過剰の可溶性ＩｇＧは、コントロールストリップに結合した固定化抗グロブリンＩｇＧと結合する。
【図２】図２はＣＳＦ検出への多抗原アプローチの利点を示す。上側の図は様々な試験条件での単抗原検定の結果を示し、下側の図は多抗原の結果を示す。Ｘ軸に沿ったバーは異なる検定条件を示し、Ｙ軸に沿ったバーは検定によってわかる免疫反応の度合いを示す。上側の影つきの一帯は、側方流動検定のテストライン上の陽性比色反応を示す。影つきの一帯に入る免疫反応による検定により、陽性の試験結果が得られるであろう。バー１：上側のグラフのＣＳＦバーは、陽性試験結果を呈示するのに充分な単抗原の免疫反応を示す。あるいは、複合抗原グラフ（下側）において、それぞれ部分的な信号を生じる抗原の組み合わせが累積し、単抗原の免疫反応を示す。バー２：血液に混入されたＣＳＦは、より少ないが付加的な血液免疫反応によって同様の陽性反応を示す（上側のバーの太い線）。バー３：抗原１の免疫反応が不完全な異常なＣＳＦ／血液試料。単抗原検定において、検定は不正確な陰性を示すが、複数抗原検定は他の５つの抗原免疫反応が異常ではないことの結果として検定しきい値より上のままである。バー４：抗原１の免疫反応が無いＣＳＦ／血液試料。バー３と同様の結果である。バー５：ＣＳＦが無く血液のみを用いた交差反応抗原。この場合、単抗原検定は不正確な陽性を示すが、単抗原の免疫反応は陽性を示すには充分でない。複数抗原検定では正確な陰性の結果が示される。バー６：ＣＳＦが無く抗原１の血液レベルは異常に高い。単抗原検定は高い血液レベルのために不正確な陽性を示す。複数抗原検定は血液中の抗原１の異常に高いレベルと反応するが、不正確な陽性のしきい値には達しない。この検定は５抗原／抗体１／抗体２の混合を示すが、他の実施形態では２から最大１０の抗原／抗体１／抗体２の混合を含みうる。
【図３】ＣＳＦおよび血液タンパク質の二次元ゲル電気泳動。１００μｇのＣｙ標識ＣＳＦタンパク質（Ａ）および１００μｇのＣｙ３標識ＣＳＦタンパク質（Ｂ）を二次元で分離する単一実験の例。ＡおよびＢは、異なる励磁および放射設定を用いた同一のゲルのグレースケール画像である。ｐＨ範囲は４～８である。Ｃは有意な重複を示す黄色い斑を有する２つのチャンネルのＲＧＢマージである。ＤはＣＳＦまたは血液の５倍以上の拡大の斑の自動抽出である。全ての試料を主要な血清／ＣＳＦタンパク質の２倍枯渇させた（方法参照）。
【図４】図３のゲルに見られるＣＳＦ富化斑のいくつかの液体クロマトグラフィー－質量分析解析。
【図５】ＣＳＦ富化タンパク質ＦＬＪ５５およびディックコップフ同族体３前駆体（ＤＫＫ３）。Ａ：ＦＬＪ５５の免疫ブロット。ＦＬＪ５５の組換体断片に対して生成される親和性精製多クローン性ウサギ抗ヒト抗体によって、血清試料中ではなくＣＳＦ試料中で正確な分子量において免疫反応が生じる。Ｂ：ＤＫＫ３の組換体断片に対して生成される親和性精製多クローン性ウサギ抗ヒト抗体によっても、血清試料中ではなくＣＳＦ試料中で正確な分子量において免疫反応が生じる。双方の場合において、過剰な血清タンパク質は血清より高いレベルであった。Ｃ：異なる親和性精製抗体でのＤＫＫ３に対する反応性を示すＣＳＦの４つの異なる試料（左）。５つの血液試料で免疫反応の生成が失敗する。レーン５の血液は高い非特異的バックグラウンドを有する。
【図６】高度にＣＳＦ富化されたアンギオテンシノーゲンのリン酸化形態。Ｃｙ３血液（緑）およびＣｙ５ＣＳＦ（赤）のＲＧＢマージ。血液中に存在しないいくつかの新しく重複していないリン酸化変型（右の４つの赤い斑）を識別した。ＣＳＦおよび血液に少なくとも３つの組み合わせ（左の３つの斑）が存在する。
【図７】ＣＳＦ特異的翻訳後修飾。抽出タンパク質の第二修飾全ての除去の前（上側のパネル）および後（中間のパネル）のＣＳＦ二次元ゲルタンパク質分布パターンの変化。下側のパネルの赤い斑は、翻訳後修飾の除去に伴う特定のタンパク質シグナルの減少を示す。
【図８】ＣＳＦ検出テストストリップ作成の実験フローチャート。
【図９】リン酸化されたＣＳＦタンパク質。血清タンパク質枯渇ＣＳＦの２つの試料が単

ＤＩＧＥゲル上を移動された。Ａ：アルカリホスファターゼ中で１時間インキュベートされたＣＳＦ試料からのＣｙ３標識タンパク質。Ｂ：アルカリホスファターゼで処理していない血清タンパク質枯渇ＣＳＦの等価試料。Ｃ：２つのゲルの斑の嵩（Ａ対Ｂ）のコンピューター生成差異（青い境界）。全ての青い斑はＣＳＦタンパク質を示す。

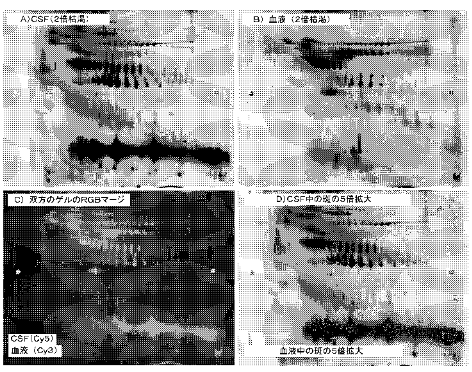
【図１】



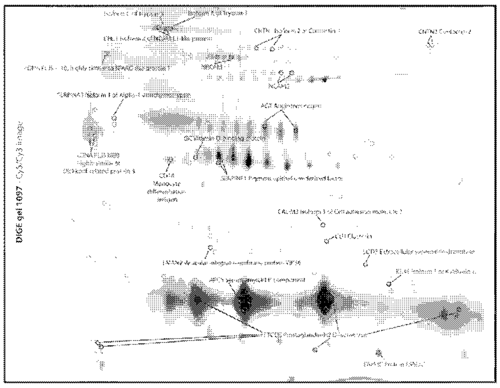
【図２】



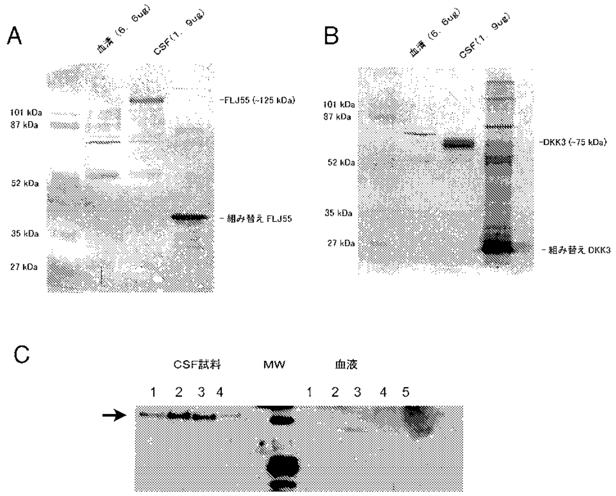
【図３】



【図４】



【図５】



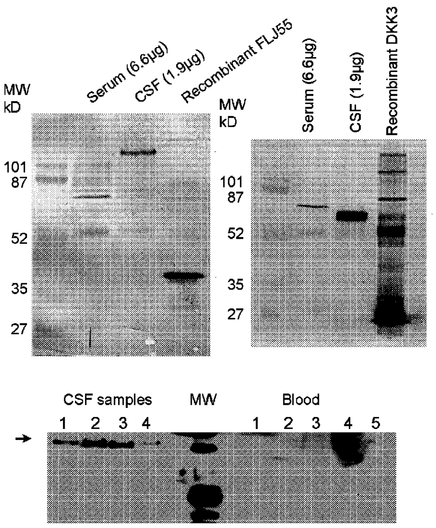
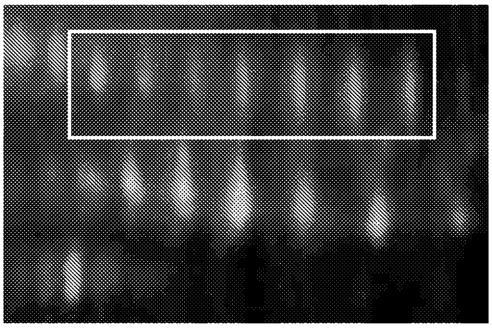
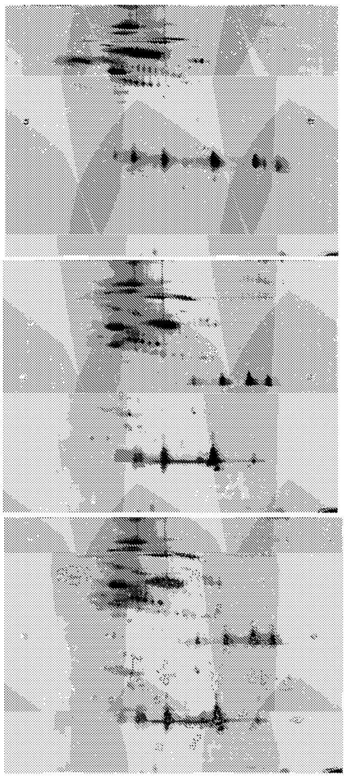


Figure 5

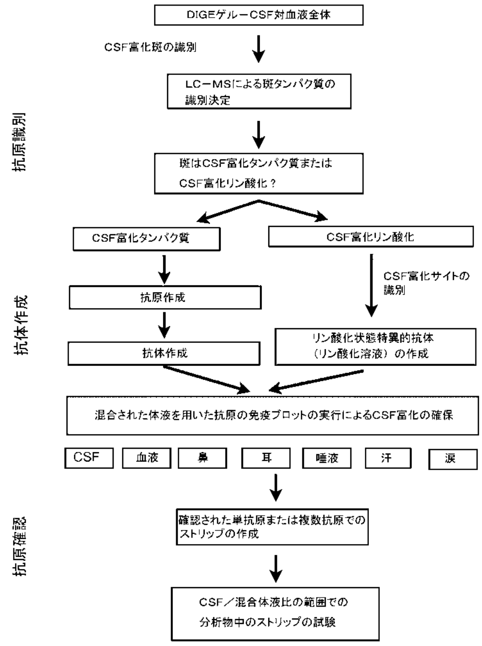
【図６】



【図７】



【図８】



【図９】

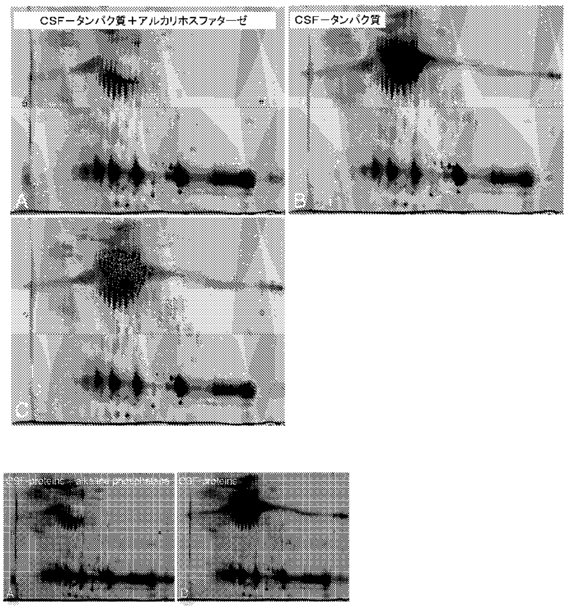


Figure 9

【配列表】
2013501919000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/044690

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/541(2006.01)i, G01N 33/538(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i

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)
G01N 33/541; C07K 16/46; G01N 33/543

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)
eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: cerebrospinal fluid, marker, antibody, isoform 1 of neural cell adhesion molecule like protein

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2004/0002168 A1 (REMINGTON, B. J. et al.) 1 Jan. 2004 See fig. 7, [0030], [0112], and claims 6, 13, 15, 24, 27 and 29.	1
Y	YIN, G. N. et al. Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases. Brain Research, 10 April 2009, Vol. 1265, pp. 158-170. See abstract and tables 1-4.	1
Y	VAWTER, M. P. et al. Characterization of human cleaved N-CAM and association with schizophrenia. Exp. Neurol., 2001, Vol. 172, pp. 29-46. See abstract and introduction.	1

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 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
13 MAY 2011 (13.05.2011)	**13 MAY 2011 (13.05.2011)**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	KIM, YUN-KYUNG Telephone No. 82-42-481-5605

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2010/044690

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.: 8-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 8-20 pertain to methods for diagnosis and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 2-7
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:
Although claims 2-7 are drafted as dependent claims of claim 1, claims 2-7 deal with different category of the invention from the claim 1.

3. ☐ Claims Nos.:
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:
The present invention can be divided into 29 groups based on their technical features.

Groups 1-29: Claims 1-7(in part) directed to a device for detection of the presence or absence of cerebrospinal fluid in a sample by detecting a CSF-enriched protein selected from proteins of SEQ ID NO 1-29.

1. ☐ As all required addtional 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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

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.:
claims 1-7(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/US2010/044690

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004-0002168 A1	01.01.2004	None	

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,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,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

专利名称(译)	用于免疫学鉴定脑脊髓液的装置和方法		
公开(公告)号	JP2013501919A	公开(公告)日	2013-01-17
申请号	JP2012523974	申请日	2010-08-06
[标]申请(专利权)人(译)	AFFINIMARK TECH		
申请(专利权)人(译)	Afinimaku Technologies公司		
[标]发明人	ピエリボンヴィンセント		
发明人	ピエリボン,ヴィンセント		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N33/53 G01N33/57488 G01N2410/02 G01N2800/28 G01N2800/2871		
FI分类号	G01N33/543.501.D G01N33/543.521 G01N33/53.D G01N33/543.541.Z C07K14/47.ZNA		
F-TERM分类号	4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA86 4H045/EA50		
优先权	61/232033 2009-08-07 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本公开涉及通过检测富含CSF的一种或多种抗原与其在其他体液中的水平相比检测样品中脑脊髓液（CSF）的存在或不存在。所述装置和方法适用于检测来自跨越种族，年龄，性别，健康状况和遗传变异性的各种人群的混合体液样品中脑脊液的存在或不存在。

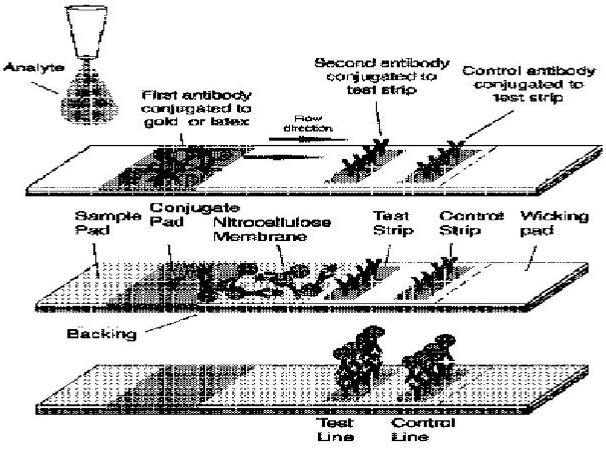


Figure 1