

(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2014-518624

(P2014-518624A)

(43) 公表日 平成26年8月7日(2014.8.7)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 1
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 1	4 B O 6 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 47 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-510535 (P2014-510535)
 (86) (22) 出願日 平成24年5月14日 (2012.5.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年12月5日 (2013.12.5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/037774
 (87) 国際公開番号 W02012/155134
 (87) 国際公開日 平成24年11月15日 (2012.11.15)
 (31) 優先権主張番号 61/485,375
 (32) 優先日 平成23年5月12日 (2011.5.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 398076227
 ザ・ジョンズ・ホプキンス・ユニバーシ
 ティー
 アメリカ合衆国、メリーランド州 212
 18、ボルチモア、ノース・チャールズ・
 ストリート 3400
 (74) 代理人 100113376
 弁理士 南条 雅裕
 (74) 代理人 100179394
 弁理士 瀬田 あや子
 (74) 代理人 100185384
 弁理士 伊波 興一朗

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ニューログラニン診断キットのためのアッセイ試薬

(57) 【要約】

本発明は、バイオマーカーの分野に関する。より具体的には、本発明は、ニューログラニンの検出に有用なアッセイ試薬に関する。特定の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合する単離抗体またはそのフラグメントを提供する。別の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合するポリヌクレオチドアダプターを提供する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

単離抗体またはそのフラグメントであって、
ニューログラニンに特異的に結合する、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 2】

単離抗体またはそのフラグメントであって、
配列番号 4 のアミノ酸 1 - 78 に特異的に結合する、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 3】

単離抗体またはそのフラグメントであって、
配列番号 4 のアミノ酸 55 - 78 に特異的に結合する、
単離抗体またはそのフラグメント。

10

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記抗体またはそのフラグメントが、ポリクローナルであることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 5】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記抗体またはそのフラグメントが、モノクローナルであることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

20

【請求項 6】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記抗体またはそのフラグメントが、哺乳類のものであることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 7】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記抗体またはそのフラグメントが、ヒトのものであることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 8】

ハイブリドーマ細胞であって、
請求項 5 に記載の抗体またはそのフラグメントを産生する、
ハイブリドーマ細胞。

30

【請求項 9】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記フラグメントは、Fab フラグメント；F(ab')₂ フラグメント；Fv フラグメント；および単鎖フラグメントからなる群から選択されることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 10】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
抗体に結合した検出可能物質をさらに含むことを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

40

【請求項 11】

請求項 10 に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
前記検出可能物質は、酵素；蛍光ラベル；ラジオアイソトープ；および化学発光ラベル
からなる群から選択されることを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 12】

請求項 10 に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
ELISA においてニューログラニンに特異的に結合することを特徴とする、

50

単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 13】

請求項 10 に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
競合結合アッセイにおいてニューログラニンに特異的に結合することを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 14】

請求項 10 に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
ラジオイムノアッセイにおいてニューログラニンに特異的に結合することを特徴とする
、
単離抗体またはそのフラグメント。 10

【請求項 15】

請求項 10 に記載の単離抗体またはそのフラグメントであって、
蛍光活性化セルソーティング (FACS) アッセイにおいてニューログラニンに特異的
に結合することを特徴とする、
単離抗体またはそのフラグメント。

【請求項 16】

ニューログラニンを検出するためのキットであって、以下：
(a) 請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体；および
(b) ニューログラニンへの、単離抗体の結合を検出するための少なくとも 1 つの構成
要素 20
を含む、
キット。

【請求項 17】

ニューログラニンで免疫化された動物から得られた単離抗体であって、
前記抗体は、ニューログラニンの、抗原性エピトープを有するポリペプチドフラグメン
トに特異的に結合する、
単離抗体。

【請求項 18】

モノクローナル抗体であって、
ニューログラニンに特異的に結合する、30 . 5 . 2 と指定された、 30
モノクローナル抗体。

【請求項 19】

抗 - ニューログラニンモノクローナル抗体であって、
30 . 5 . 2 と指定されたハイブリドーマにより産生される、
抗 - ニューログラニンモノクローナル抗体。

【請求項 20】

ポリヌクレオチドアプタマーであって、
ニューログラニンに特異的に結合する、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 21】 40

請求項 20 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、
前記ニューログラニンが、ヒトニューログラニンであることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 22】

請求項 20 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、
前記アプタマーは、約 1000 n 未満の Kd でニューログラニンに結合することを特
徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 23】

請求項 20 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、 50

前記アプタマーは、約 100 nM 未満の K_d でニューログラニンに結合することを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 24】

請求項 20 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

前記アプタマーは、約 20 nM 未満の K_d でニューログラニンに結合することを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 25】

請求項 20 から 24 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

約 10 ~ 約 100 ヌクレオチドからなることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 26】

請求項 25 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

約 20 ~ 約 80 ヌクレオチドからなることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 27】

請求項 26 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

約 30 ~ 約 50 ヌクレオチドからなることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 28】

請求項 20 から 27 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

RNA アプタマーであることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 29】

請求項 28 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

配列番号 4 - 6 のうちのいずれか 1 つまたはそれらの少なくとも 10 個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも 80 % 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 30】

請求項 29 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

配列番号 4 - 6 のうちのいずれか 1 つまたはそれらの少なくとも 10 個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも 90 % 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 31】

請求項 30 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

配列番号 4 - 6 のうちのいずれか 1 つまたはそれらの少なくとも 10 個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも 95 % 同一のヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 32】

請求項 31 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

配列番号 4 - 6 のうちのいずれか 1 つまたはそれらの少なくとも 10 個連続したヌクレオチドのフラグメントのヌクレオチド配列を含むことを特徴とする、

ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 33】

請求項 31 に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、

配列番号 4 - 6 のうちのいずれか 1 つまたはそれらの少なくとも 10 個連続したヌクレ

10

20

30

40

50

オチドのフラグメントのヌクレオチド配列からなることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 34】

請求項 20 から 33 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、
少なくとも 1 つの修飾ヌクレオチド間リンカーを含むことを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 35】

請求項 20 から 34 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、
少なくとも 1 つの末端ブロッカーを含むことを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

10

【請求項 36】

請求項 20 から 35 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーであって、
コンジュゲートに結合されていることを特徴とする、
ポリヌクレオチドアプタマー。

【請求項 37】

ポリヌクレオチドであって、
請求項 20 から 36 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーをコードする
、
ポリヌクレオチド。

20

【請求項 38】

ベクターであって、
請求項 37 に記載のポリヌクレオチドを含む、
ベクター。

【請求項 39】

細胞であって、
請求項 20 から 36 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドアプタマーを含む、
細胞。

【請求項 40】

細胞であって、
請求項 20 から 36 のいずれか一項に記載の、2 以上の異なるポリヌクレオチドアプタ
マーを含む、
細胞。

30

【請求項 41】

細胞であって、
請求項 37 に記載のポリヌクレオチドを含む、
細胞。

【請求項 42】

細胞であって、
請求項 38 に記載のベクターを含む、
細胞。

40

【請求項 43】

対象での、ニューログラニンと関連する疾患または障害を診断する方法であって、
ニューログラニンを、請求項 20 から 36 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドア
プタマーと結合させ、ニューログラニンに結合したアプタマーの量を決定することにより
、前記対象でのニューログラニンのレベルを測定するステップを含む、
方法。

【請求項 44】

請求項 43 に記載の方法であって、
前記結合は、対象から得られるサンプル内で生じることを特徴とする、
方法。

50

【請求項 4 5】

サンプル中のニューログラニンの量を決定するための方法であって、
三連四重極質量分析計およびマルチプルリアクションモニタリングを用いて、ニューログラニンに特異的なペプチドを検出するステップを含み、
ここで、ニューログラニンに特異的な前記ペプチドは、配列番号 7 を含む、
方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、2011年5月12日に出願された米国仮出願第 61 / 485 , 375 号の利益を主張し、それは、その全体で参照により本明細書中に援用される。

10

【0002】

[政府権益の声明]

【0003】

本発明は、助成金 No. NHLBI 1 R01 HL091759 - 02 および NHLBI 5U54HL090515 - 02 の下で、米国政府の支援により行われた。米国政府は本発明において特定の権利を有する。

【0004】

[本発明の分野]

本発明は、バイオマーカーの分野に関する。より具体的には、本発明は、バイオマーカーの検出に有用なアッセイ試薬に関する。

20

【0005】

[電子的に提出された資料の参照援用]

本出願は、配列リストを含む。それは「P11546 - 02 __ Sequence __ Listing __ ST25 . text」と題された ASCII テキストファイルとして EFS - Web を介して電子的に提出された。配列リストは 3 , 146 バイトのサイズであり、2012年5月10日に作成された。それは、その全体で参照により本明細書中に援用される。

【背景技術】

30

【0006】

脳損傷は複雑であり、多くの深刻な臨床転帰を有し得る。脳および脊髄の損傷は、頭部外傷、脳卒中、出生時外傷、心臓手術、心停止、および、補助人工心臓または体外式膜型人工肺 (ECMO) での心血管系の補助が必要な患者に起因し得る。さらに、無症状の脳損傷の検出は、特に子供および出生に関する損傷を有する新生児において、困難である。加えて、鎌状赤血球症を有する子供は、無症状の脳損傷の危険性が高い。子供における未治療の無症状の脳損傷は、顕性の脳卒中、神経障害、学習障害および記憶喪失に進行し得る。

【0007】

残念なことに、身体検査のような臨床手段、およびイメージング (CT スキャンまたは MRI) は主観的であり、広く利用可能ではなく、精度または特異性が十分でなく、およびまたは、脳損傷を有する幼児、子供または大人を特定するのにコストがかかりすぎる。脳損傷および特に無症状の損傷を有する患者を同定することは、これらの幼児、子供および大人は、顕性の脳卒中への進行、そして、認知および動作障害の進行、および認知症の重大な危険性があるため、大きな臨床的必要性が存在する。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明は、少なくとも一部には、ニューログラニンに結合するアプタマーおよび抗体の開発に基づく。一実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合する、単離

50

抗体またはそのフラグメントを提供する。特定の実施態様では、単離抗体またはそのフラグメントは、配列番号4のアミノ酸1 - 78に特異的に結合する。さらに特定の実施態様では、単離抗体またはそのフラグメントは、配列番号4のアミノ酸55 - 78に特異的に結合する。特定の実施態様では、抗体またはそのフラグメントはポリクローナルである。他の実施態様では、抗体またはそのフラグメントはモノクローナルである。特定の実施態様では、抗体またはそのフラグメントは哺乳類のものである。前記抗体またはそのフラグメントはヒトのものであり得る。特定の実施態様では、本発明は、本発明に記載の抗体またはフラグメントを産生するハイブリドーマ細胞を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

抗体フラグメントは、Fabフラグメント；F(ab')₂フラグメント；Fvフラグメント；および単鎖フラグメントからなる群から選択され得る。前記単離抗体またはそのフラグメントは、抗体に結合された検出可能物質をさらに含み得る。特定の実施態様では、前記の検出可能物質は、酵素；蛍光ラベル；ラジオアイソトープ；および化学発光ラベルからなる群から選択される。

【0010】

一実施態様では、前記単離抗体またはそのフラグメントは、ELISAにおいてニューログラニンに特異的に結合する。別の実施態様では、前記単離抗体またはそのフラグメントは、競合結合アッセイにおいてニューログラニンに特異的に結合する。さらに別の実施態様では、前記単離抗体またはそのフラグメントは、ラジオイムノアッセイにおいてニューログラニンに特異的に結合する。さらなる実施態様では、前記単離抗体またはそのフラグメントは、蛍光活性化セルソーティング(FACS)アッセイにおいてニューログラニンに特異的に結合する。

【0011】

別の態様では、本発明は、ニューログラニンの検出に有用なキットを提供する。ニューログラニンを検出するためのキットは、(a)本明細書に記載の単離抗体；および(b)ニューログラニンへの、単離抗体の結合を検出するための少なくとも1つの構成要素を含んでよい。

【0012】

別の実施態様では、本発明は、ニューログラニンで免疫化された動物から得られる単離抗体を提供し、ここで、前記抗体は、ニューログラニンの、抗原性エピトープを有するポリペプチドフラグメントに特異的に結合する。特定の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合する、30.5.2と指定されたモノクローナル抗体を提供する。別の実施態様では、本発明は、ハイブリドーマによって産生される抗-ニューログラニンモノクローナル抗体を提供する。

【0013】

別の態様では、本発明は、ニューログラニンに結合するアプタマーを提供する。特定の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合するポリヌクレオチドアプタマーを提供する。別の実施態様では、前記ニューログラニンはヒトニューログラニンである。特定の実施態様では、前記アプタマーは、約1000nM未満のK_dでニューログラニンに結合する。さらに特定の実施態様では、前記アプタマーは、約100nM未満のK_dでニューログラニンに結合する。さらなる実施態様では、前記アプタマーは、約20nM未満のK_dでニューログラニンに結合する。本発明のポリヌクレオチドアプタマーは、約10~約100ヌクレオチドからなることができる。別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアプタマーは、約20~約80ヌクレオチドからなる。さらに別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアプタマーは、約30~約50ヌクレオチドからなる。特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアプタマーはRNAアプタマーである。

【0014】

特定の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアプタマーは、配列番号4 - 6のうちのいずれか1つまたはそれらの少なくとも10個連続したヌクレオチドのフラグメントと少な

10

20

30

40

50

くとも80%同一のヌクレオチド配列を含む。別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアダプターは、配列番号4-6のうちのいずれか1つまたはそれらの少なくとも10個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも90%同一のヌクレオチド配列を含む。さらに別の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアダプターは、配列番号4-6のうちのいずれか1つまたはそれらの少なくとも10個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも95%同一のヌクレオチド配列を含む。

【0015】

別の実施態様では、ポリヌクレオチドアダプターは、配列番号4-6のうちのいずれか1つまたはそれらの少なくとも10個連続したヌクレオチドのフラグメントのヌクレオチド配列を含む。さらなる実施態様では、ポリヌクレオチドアダプターは、配列番号4-6のうちのいずれか1つまたはそれらの少なくとも10個連続したヌクレオチドのフラグメントのヌクレオチド配列からなる。前記ポリヌクレオチドアダプターは、少なくとも1つの修飾ヌクレオチド間リンカーを含んでよい。他の実施態様では、前記ポリヌクレオチドアダプターは、少なくとも1つの末端ブロッカーを含んでよい。本発明のポリヌクレオチドアダプターは、コンジュゲートに結合してよい。

10

【0016】

本発明はさらに、本明細書に記載のポリヌクレオチドアダプターをコードするポリヌクレオチドを提供する。特定の実施態様では、本発明は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本発明はさらに、本明細書に記載のポリヌクレオチドアダプターを含む細胞を提供する。細胞は、2以上の異なるポリヌクレオチドアダプターを含んでよい。本発明はまた、本明細書に記載のポリヌクレオチドおよび本発明に記載のベクターを提供する。

20

【0017】

別の態様では、本発明は、対象でのニューログラニンと関連する疾患または障害を診断する方法を提供する。特定の実施態様では、前記方法は、ニューログラニンをポリヌクレオチドアダプターと結合させ、ニューログラニンに結合したアダプターの量を決定することにより、前記対象でのニューログラニンのレベルを測定するステップを含む。特定の実施態様では、前記結合は、対象から得られるサンプル中で生じる。他の実施態様では、サンプル中のニューログラニンの量を決定するための方法は、三連四重極質量分析計およびマルチプルリアクションモニタリングを用いて、ニューログラニンに特異的なペプチドを検出するステップを含み、ここで、前記のニューログラニンに特異的なペプチドは、配列番号7を含む。

30

【0018】

特定の実施態様では、本発明は、以下の配列：TCTAACGCCCTCCCGTATGTTTTCCTTTTCCATTGCGGAT(配列番号4)を含む配列を有するニューログラニンRNAアダプター(NRGN-A1)を提供し、それはニューログラニタンパク質に結合することができて、検出アッセイに有用である。別の実施態様では、本発明は、以下の配列：TTTTCAATTTTCATTTTTCCTCAATCGATCCGCCGGA CCTTAT(配列番号6)を含む配列を有するニューログラニンRNAアダプター(NRGN-A6)を提供し、それはニューログラニタンパク質に結合することができて、検出アッセイに有用である。

40

【0019】

別の実施態様では、本発明は、ヒトニューログラニンに対する、30.5.2として同定されたモノクローナル抗体を提供し、これは脳損傷の診断的検出アッセイに有用である。さらなる実施態様では、哺乳類の対象での脳損傷の診断的アッセイにおける、ニューログラニンRNAアダプターを使用する方法は、(a)脳損傷を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、および(b)サンプル中のニューログラニンのレベルを検出するために、前記アダプターを用いてアッセイを行うステップを含み、ここで、そのサンプル中のニューログラニンのレベルが、脳損傷を有さないコントロール対象から得られたサンプル中と有意に異なるものを、脳損傷の診断とする。さらに別の実施態様では、哺乳類

50

の対象での脳損傷の診断的アッセイにおいてニューログラニンモノクローナル抗体を用いる方法は、(a)脳損傷を有する疑いがある対象からサンプルを得るステップ、および(b)サンプル中のニューログラニンのレベルを検出するために、前記抗体を用いてアッセイを行うステップを含み、ここで、そのサンプル中のニューログラニンのレベルが、脳損傷を有さないコントロール対象から得られるサンプル中と有意に異なるものを、脳損傷の診断とする。そのような方法では、脳損傷は、無症状の脳損傷および顕性の脳損傷からなる群から選択される。最後に、本発明は、ニューログラニンの捕捉試薬および検出試薬を含む、脳損傷の診断/予後キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】ニューログラニタンパク質の検出のために必要なニューログラニンアプタマーの最小限の量を示すゲルである。

【図2】ニューログラニンアプタマーを用いたプルダウンアッセイの結果を示す。

【図3】ABI Sciex Qtrap 4000三連四重極質量分析計を用いた、ニューログラニンシグネチャペプチドおよびラベル化スタンダードペプチドのシグナルを表す。

【図4】クーマシー染色後の、PAGEゲル上のHis-NRGNを示す。His-NRGNの予測分子量は8.5Kdである。

【図5】マウスモノクローナル抗体30.5.2を用いた、組み換えNRGNのダイレクトELISAの検量線を示す。濃度範囲は0.002~10ng/mlである。

【図6】ニューログラニンに対する抗-ヒトモノクローナル抗体を用いた、組み換えNRGNのダイレクトELISAの検量線を示す。濃度範囲は75ng/mlである。

【図7】先天性心疾患の外科的修復のための心肺バイパスを受けている患者由来の、ニューログラニンおよびGFAPのレベルを示す。

【図8】ニューログラニンは急性脳損傷の循環バイオマーカーであり、急性脳卒中の公知の循環バイオマーカーであるグリア線維酸性タンパク質よりも早く循環中に現れることを示すグラフである。

【図9A】鎌状赤血球症(SCD)を有する子供(n=115)および同年齢の非SCDコントロール(n=46)での、血漿ニューログラニン濃度のログプロットである。破線は、46の非SCDコントロール間の95thパーセンタイル値を示す。バーは中央値を示す。

【図9B】SCDおよびSCIを有する子供(n=64)、SCDを有しSCIを有さない子供(n=51)、および同年齢の非SCDコントロール(n=46)での、血漿ニューログラニン濃度のログプロットである。破線は、60の健常な小児コントロール間の95thパーセンタイル値を示し、パーセントは、健常コントロールの95thパーセンタイルより上の比率を示す。

【発明を実施するための形態】

【0021】

本発明は、本明細書に記載の特定の方法及び構成要素などに制限されず、変更し得ることが理解されよう。また、本明細書で用いられる専門用語は、特定の実施態様を説明する目的のみのために使用され、本発明の範囲を限定することを意図しないことも理解されるものである。本明細書および添付の請求項において用いられる、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに別段の指示をしない限り、複数形の言及を含むことを留意しなければならない。このように、例えば、「タンパク質(protein)」との言及は、1つまたは複数のタンパク質との言及であり、当業者等に知られるそれらの同等物を含む。

【0022】

別段に定義されない限り、本明細書で用いられる全ての技術的および科学的用語は、本発明が属する分野における通常の知識を有する者により一般に理解されるのと同じ意味を有する。特定の方法及びデバイス、および材料を記載するが、本明細書に記載のものと類似

10

20

30

40

50

または同等の任意の方法および材料を本発明の実施または試験に用いることができる。

【0023】

全ての雑誌論文、本、マニュアル、公開された特許出願、および付与特許を含む、本明細書が引用する全ての刊行物は、参照により本明細書に援用される。さらに、本明細書、実施例、および添付の請求項で用いられる特定の用語および語句の意味が与えられる。定義は実際に制限することを意図せず、本発明の特定の態様の、より明確な理解を与えるために役立つ。

【0024】

I. 定義

用語「脳損傷」は、脳がある事象に起因する傷害により損傷している状態を指す。本明細書において用いられる「損傷」とは、細胞または分子の完全性、活性、レベル、ロバスト性、状態における変化、またはある事象に起因し得る他の変化である。例えば、損傷は、細胞または分子の特性の、物理的、機械的、化学的、生物学的、機能的、感染性、または他のモジュレーターを含む。事象は、衝突（衝撃）のような物理的外傷、または血管の遮断または漏出のいずれかにより生じる脳卒中のような生物学的異常を含み得る。事象は、場合により、感染因子による感染である。当業者は、用語「損傷」または「事象」により含まれる非常に多くの同等の事象を認識する。

10

【0025】

より具体的には、用語「脳損傷」は、その病態生理学的基礎に関わらず、中枢神経系の傷害をもたらす状態を指す。最も高頻度の「脳損傷」起源は、脳卒中および外傷性脳損傷である。「脳卒中」は、出血系および非出血系に分類される。出血系脳卒中の例は、脳溢血、くも膜下出血、および脳動脈奇形に続発する頭蓋内出血を含み、一方で、非出血系脳卒中の例は、脳梗塞を含む。

20

【0026】

用語「外傷性脳損傷」または「TBI」は、物理的外傷が脳傷害を引き起こす場合に生じる脳への外傷性損傷を指す。例えば、TBIは、非開放性頭部損傷または穿通性頭部損傷に起因し得る。「非外傷性脳損傷」は、虚血または機械的外力に関わらない脳損傷（例えば、脳卒中、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、多発性硬化症、筋萎縮性側索硬化症、脳出血、脳感染症、脳腫瘍など）を指す。

【0027】

用語「脳損傷」はまた、無症状の脳損傷、脊髄損傷、および無酸素性虚血性脳損傷を指す。用語「無症状の脳損傷」(SCI)とは、脳損傷の顕性の臨床的証拠がない脳損傷を指す。脳損傷が実際に存在する場合に脳損傷の臨床的証拠がないことは、損傷の程度、損傷のタイプ、意識レベル、および薬剤、特に鎮静剤および麻酔薬に起因し得る。

30

【0028】

用語「脊髄損傷」とは、脊椎の破砕または脱臼に起因して、脊髄が圧縮/磨滅を受けて機能障害を引き起こす状態を指す。本明細書において用いられる用語「無酸素性虚血性脳損傷」は、脳機能障害をもたらす、脳組織への酸素供給の欠乏を指し、脳低酸素症を含む。例えば、無酸素性虚血性脳損傷は、局所脳虚血、全脳虚血、低酸素性低酸素症（すなわち、環境中の制限された酸素が脳機能の低下を引き起こす。例えば、潜水土、飛行士、登山者、および消防士などでは、それらの全てに、この種の脳低酸素症の危険性がある）、肺での閉塞（例えば、窒息、狭窄、気管の圧挫から生じる低酸素症）を含む。

40

【0029】

本明細書において用いられる用語「比較する」とは、患者由来のサンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーの割合、レベルまたは細胞局在が、どのように、標準またはコントロールサンプル中の対応する1つまたは複数のバイオマーカーの割合、レベルまたは細胞局在に関連するかを評価することを指す。例えば、「比較する」は、患者由来のサンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーの割合、レベル、または細胞局在が、標準またはコントロールサンプル中の対応する1つまたは複数のバイオマーカーの割合、レベル、または細胞局在と同じか、それより多いか少ないか、または異なるかどうかを、評価するこ

50

とを指し得る。より具体的には、その用語は、患者由来のサンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーの割合、レベル、または細胞局在が、例えば、無症状の脳損傷（SC I）を有する患者、SC Iを有さない患者、SC Iの治療に反応する患者、SC Iの治療に反応しない患者、特定のSC I治療に反応する可能性がある/ない患者、または、他の疾患または状態を有する/有しない患者に対応する、事前に定義されたバイオマーカーレベルの割合、レベル、または細胞局在と同じか、それより多いか少ないか、異なるか、またはさもなければ対応する（または対応しない）かどうか、評価することを指し得る。特定の実施態様では、用語「比較する」は、患者由来のサンプル中の本発明の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルが、コントロールサンプル中の同一バイオマーカーのレベル（例えば、非感染の個体と関連する事前に定義されたレベル、標準のSC Iレベルなど）と同じか、それより多いかまたは少ないか、異なるか、さもなければ対応する（または対応しない）かどうか、評価することを指す。

10

20

30

40

50

【0030】

本明細書において用いられる用語「示す（indicates）」または「関連する（correlates）」（または、文脈に応じて「indicating」または「correlating」、または、「indication」または「correlation」）は、パラメーター、例えば、患者由来のサンプル中での調節された割合、レベル、または細胞局在に関して、その患者がSC Iを有することを意味し得る。特定の実施態様では、そのパラメーターは、本発明の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルを含んでよい。1つまたは複数のバイオマーカーの量の特定のセットまたはパターンは、患者がSC Iを有することを示し得る（すなわち、SC Iを有する患者と関連する）。他の実施態様では、1つまたは複数のバイオマーカーの量の特定のセットまたはパターンは、非罹患者に関連し得る（すなわち、患者がSC Iを有さないことを示す）。特定の実施態様では、本発明により用いられる「示す」または「関連する」は、診断の評価、SC IまたはSC Iの進行の予測、臨床治療の有効性評価、特定の治療計画または医薬品に反応し得る患者の同定、治療の進行のモニタリングのための、および、スクリーニングアッセイの関連においては抗-SC I治療の同定のための、スタンダード、コントロールまたは比較値に対するバイオマーカーレベル間の関係を定量する任意の線形法または非線形法によるものであり得る。

【0031】

用語「患者」、「個体」または「対象」は、本明細書において交換可能に用いられ、哺乳類、特にヒトを指す。患者は、軽度、中度または重度の疾患を有してよい。患者は、未治療であってよく、任意の形態の治療に反応し、または難治性であってよい。患者は、治療を必要とする個体、または特定の症状または家族歴に基づく診断を必要とする個体であってよい。ある場合には、この用語は、制限されないが、マウス、ラット、およびハムスターを含む齧歯類；および霊長類を含む、実験動物での、獣医用途での、および疾患に関する動物モデルの開発での治療を指してよい。

【0032】

用語「測定する」および「決定する」は、全体にわたって交換可能に用いられ、患者サンプルを得るステップおよび/またはサンプル中のバイオマーカー（単数または複数）のレベルを検出するステップを含む方法を指す。一実施態様では、その用語は、患者サンプルを得るステップおよびサンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルを検出するステップを指す。別の実施態様では、用語「測定する」および「決定する」は、患者サンプル中の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルを検出するステップを意味する。測定は、当技術分野で知られている方法および本明細書にさらに記載される方法により達成することができる。用語「測定する」はまた、用語「検出する」と全体にわたって交換可能に用いられる。

【0033】

用語「サンプル」、「患者サンプル」、「生物学的サンプル」などは、患者、個体、または対象から得られる様々なサンプルタイプを含み、診断またはモニタリングアッセイで

用いることができる。患者サンプルは、健常な対象、病気の患者、または S C I と関係がある症状を有する患者から得てよい。さらに、患者から得られるサンプルは分けることができ、一部のみを診断に用いてよい。さらに、サンプルまたはその一部は、後の分析のためにサンプルを維持する条件下で保管することができる。定義は、特に、血液および生物学的起源の他の液体サンプル（制限されないが、血漿、血清、末梢血、脳脊髄液、尿、唾液、排泄物および滑液を含む）、固形組織サンプル、例えば生検材料または組織培養またはそれら由来の細胞およびそれらの産物を含む。特定の実施態様では、サンプルは血液サンプルを含む。別の実施態様では、血清サンプルが用いられる。定義はまた、例えば遠心分離、濾過、沈殿、透析、クロマトグラフィー、試薬処理、洗浄、または特定の細胞集団の濃縮により、調達後に任意の方法で操作されたサンプルを含む。その用語はさらに臨床サンプルを含み、また、例えば培地中、細胞上清中、組織サンプル中、臓器中の細胞も含む。サンプルはまた、新鮮凍結および/またはホルマリン固定の、パラフィン包埋された組織ブロック、例えば、臨床的または病理学的バイオプシーから調製された、病理学的分析または免疫組織化学による試験のために調製されたブロックを含んでよい。

10

【0034】

本発明に関する様々な方法論は、値、レベル、特徴、特性、特質などを、「適したコントロール」または「コントロールサンプル」と本明細書で交換可能に言及される「適切なコントロール」との比較を含むステップを含む。「適切なコントロール」、「適したコントロール」または「コントロールサンプル」は、比較目的に有用な、当技術分野における通常の知識を有する者になじみのある任意のコントロールまたはスタンダードである。一実施態様では「適切なコントロール」または「適したコントロール」は、細胞、臓器、または患者において決定される値、レベル、特徴、特性、特質などであり、例えば正常の形質を示す、コントロールまたは正常の細胞、臓器、または、患者などである。例えば、本発明のバイオマーカーは、非罹患者（U I）または正常のコントロールの個体（N C）（両方の用語は、本明細書において交換可能に用いられる）由来のサンプル中のレベルに関して評価されてよい。別の実施態様では、「適切なコントロール」または「適したコントロール」は、患者に対して治療（例えば、S C I 治療）を行う前に決定される値、レベル、特徴、特性、特質などである。さらに別の実施態様では、転写率、m R N A レベル、翻訳率、タンパク質レベル、生物学的活性、細胞の特性または特質、遺伝子型、表現型などは、細胞、臓器、または患者への治療の投与前、投与中、または投与後に決定することができる。さらなる実施態様では、「適切なコントロール」または「適したコントロール」は、事前に定義された値、レベル、特徴、特性、特質などである。「適切なコントロール」は、S C I と関連する本発明の1つまたは複数のバイオマーカーのレベルのプロファイルまたはパターンであってよく、それに対して患者サンプルを比較することができる。患者サンプルはまた、ネガティブコントロール、すなわち、S C I を有さないことに関連するプロファイルと比較することもできる。

20

30

【0035】

用語「単離された」は、その元の環境（天然に存在する環境）から取り出された生物学的材料（核酸またはタンパク質）を指す。例えば、植物または動物中に天然状態で存在するポリヌクレオチドは単離されていないが、天然に存在する隣接核酸から分離された同一のポリヌクレオチドは「単離された」とみなされる。用語「精製された」は、他の化合物の存在を除き、その材料が絶対的な純度を示す形態で存在することを要求するのではない。それはむしろ相対的な定義である。

40

【0036】

「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、一本鎖形状または二本鎖ヘリックスのいずれかでの、リボヌクレオシド（アデノシン、グアノシン、ウリジンまたはシチジン；「R N A 分子」）またはデオキシリボヌクレオシド（デオキシアデノシン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、またはデオキシシチジン；「D N A 分子」）のリン酸エステルポリマー型、またはそれらの任意のリン酸エステルアナログ、例えばホスホロチオエートおよびチオエステルを指す。二本鎖 D N A - D N A、D N A - R N A および R N A - R N A へ

50

リックスがあり得る。核酸分子、および特にDNAまたはRNA分子という用語は、分子の一次構造および二次構造のみを指し、いかなる特定の三次構造にも限定しない。このように、この用語は、とりわけ、線状または環状DNA分子（例えば、制限フラグメント）、プラスミド、およびクロモソームで見られる二本鎖DNAを含む。特定の二本鎖DNA分子の構造について論じる場合、配列は、DNAの非転写鎖（すなわち、mRNAに相同の配列を有する鎖）に沿って5'から3'への方向での配列のみ与える通常の慣習に従って、本明細書中に記載され得る。「組み換えDNA分子」は、分子の生物学的操作を受けたDNA分子である。

【0037】

用語「フラグメント」は、参照核酸と比較して減少した長さのヌクレオチド配列を意味し、共通部分にわたって、参照核酸と同一のヌクレオチド配列を含むことが理解されよう。本発明による、そのような核酸フラグメントは、適切な場合、当該フラグメントが構成要素の一部であるより長いポリヌクレオチド中に含まれてよい。そのようなフラグメントは、本発明による核酸の、少なくとも6、8、9、10、12、15、18、20、21、22、23、24、25、30、39、40、42、45、48、50、51、54、57、60、63、66、70、75、78、80、90、100、105、120、135、150、200、300、500、720、900、1000または1500個の連続したヌクレオチドの長さの範囲のオリゴヌクレオチドを含むか、あるいは、そのようなオリゴヌクレオチドからなる。

【0038】

当技術分野で知られている、用語「パーセント(%)同一性」または「パーセント(%)同一」は、配列を比較することにより決定される、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列間の関係である。当技術分野において、「同一性」はまた、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列間の配列関係の程度も意味し、場合により、そのような配列の鎖間をマッチングさせることにより決定される。「同一性」および「類似性」は、公知の方法により容易に計算することができ、制限されないが、以下に記載のものを含む：Computational Molecular Biology (Lesk, A.M., ed.) Oxford University Press, New York (1988); Biocomputing: Informatics and Genome Projects (Smith, D.W., ed.) Academic Press, New York (1993); Computer Analysis of Sequence Data, Part I (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.) Humana Press, New Jersey (1994); Sequence Analysis in Molecular Biology (von Heinje, G., ed.) Academic Press (1987); and Sequence Analysis Primer (Gribnikov, M. and Devereux, J., eds.) Stockton Press, New York (1991)。同一性を決定する好ましい方法は、試験される配列間のベストマッチを与えるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、一般に利用可能なコンピュータプログラムに体系化されている。配列アライメントおよびパーセント同一性の計算は、LASERGENE bioinformatics computing suite (DNASTAR Inc., Madison, Wis.) のMegalignプログラムを用いて行なってよい。配列のマルチプルアライメントは、Clustalのアライメント方法(Higgins and Sharp (1989) CABIOS. 5: 151-153)を用いてデフォルトパラメーター(GAP PENALTY=10、GAP LENGTH PENALTY=10)で行なってよい。Clustalの方法を用いた、ペアワイズのアライメントに関するデフォルトパラメーターは、KTUPLE 1、GAP PENALTY=3、WINDOW=5およびDIAGONALS SAVED=5と選択してよい。

【0039】

用語「配列解析ソフトウェア」は、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列の解析に有用な任意のコンピュータアルゴリズムまたはソフトウェアプログラムを指す。「配列解析ソフトウェア」は、市販されるか、独立に開発されてよい。典型的な配列解析ソフトウェアは、制限されないが、GCG suiteのプログラム(Wisconsin Package Version 9.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN、BLASTX (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)) および DNASTAR (DNASTAR, Inc. 1228 S. Park St. Madison, Wis. 53715 USA) を含む。本出願の関連において、配列解析ソフトウェアが解析に用いられる場合、解析の結果は、別段の定めのない限り、参照プログラムの「デフォルト値」に基づくことが理解されよう。本明細書において用いられる「デフォルト値」は、最初の初期化時にソフトウェアに元々ロードされた値またはパラメーターの任意のセットを意味する。

【0040】

用語「に特異的に結合する」、「に特異的」および関連する文法上の異形は、共有結合または非共有結合の相互作用、または、共有結合と非共有結合の相互作用の組み合わせにより仲介され得る、抗体/抗原、アプタマー/標的、酵素/基質、受容体/アゴニストおよびレクチン/糖のようなペア種の間を生じる結合を指す。2種の相互作用が、非共有結合の複合体を生じさせる場合、生じる結合は典型的に、静電気、水素結合、または親油性相互作用の結果である。したがって、特定の実施態様では、「特異的な結合」は、2つの間に相互作用が存在するペア種の間を生じ、抗体/抗原または酵素/基質などの相互作用の特性を有する結合複合体を生じさせる。特に、特異的な結合は、ペアのうちの1つのメンバーが特定の種に結合して、結合メンバーの対応メンバーが属する化合物ファミリー内の他の種には結合しないことにより特徴付けられる。このように、例えば、抗体は典型的に単一のエピトープに結合して、タンパク質ファミリー内の他のエピトープには結合しない。一部の実施態様では、抗原と抗体の間の特異的な結合は、少なくとも 10^{-6} Mの結合親和力を有する。他の実施態様では、抗原と抗体は、少なくとも 10^{-7} M、 10^{-8} M ~ 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの親和力で結合する。特定の実施態様では、その用語は、任意の非標的と比べて少なくとも5倍高い親和力、例えば、少なくとも10倍、20倍、50倍、または100倍高い親和力で、標的(例えばタンパク質)に結合する分子(例えばアプタマー)を指す。

【0041】

「随意的」または「場合により」は、その後に記載される事象または状況が、生じ得るまたは生じ得ないこと、および、その記載が、事象または状況が生じる事例およびそれが生じない事例を含むことを意味する。

【0042】

「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介して、例えばタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、糖、ポリヌクレオチド、脂質などの標的を認識して特異的に結合する免疫グロブリン分子である。本明細書において用いられるその用語は、最も広い意味で用いられ、無傷のポリクローナル抗体、無傷のモノクローナル抗体、抗体フラグメント(Fab、Fab'、F(ab')₂、およびFvフラグメントなど)、単鎖Fv(scFv)突然変異体、少なくとも2つの無傷の抗体から生産される二重特異性抗体などの多重特異性抗体、抗体部位を含む融合タンパク質、および、抗体が所望の生物学的活性を示す限りにおいて抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を含む。抗体は、免疫グロブリンの5つの主要クラス: IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、または、それらのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のいずれかであってよく、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる、それらの重鎖定常ドメインの同一性に基づく。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる、そして良く知られたサブユニット構造および三次元立体配置を有する。抗体は、裸の(nak

e d) 抗体であっても、トキシン、ラジオアイソトープなどの他の分子にコンジュゲートされていてよい。

【0043】

本明細書において用いられる用語「抗体フラグメント」、「フラグメント」、または「その(それらの)フラグメント」は、無傷の抗体の一部を指す。抗体フラグメントの例は、限定されないが、線状抗体；単鎖抗体分子；FcまたはFc'ペプチド、FabおよびFabフラグメント、および抗体フラグメントから形成された多重特異性抗体を含む。ほとんどの実施態様では、その用語はまた、標的分子(例えばニューログラニン)の抗原に結合するフラグメントを指し、「抗原結合フラグメント」と呼ばれ得る。

【0044】

本明細書において用いられる、非ヒト(例えばムーリン)抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小限の配列を含む、または含まない、キメラ抗体である。ほとんどの部分に関して、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)であり、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト種、例えばマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類の超可変領域(ドナー抗体)由来の残基により置換されている。いくつかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基により置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体内またはドナー抗体内に見られない残基を含むことができる。これらの修飾は通常、抗体の能力をさらに高めるために施される。一般に、ヒト化抗体は、実質的に少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの全てを含み、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR残基の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含むこともでき、典型的には、ヒト免疫グロブリンのものである。ヒト化抗体を生産するために用いられる方法の例は、米国特許第5,225,539号に記載されている。

【0045】

本明細書において用いられる用語「ヒト抗体」は、ヒトにより産生される抗体、または、当技術分野で知られている技術のいずれかを用いて作製される、ヒトにより産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。ヒト抗体のこの定義は、無傷の、または全長の抗体、そのフラグメント、および/または、少なくとも1つのヒト重鎖ポリペプチドおよび/または軽鎖ポリペプチドを含む抗体、例えば、ムーリン軽鎖ポリペプチドとヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体を含む。

【0046】

「ハイブリッド抗体」は、2つの異なるエピトープまたは2つの異なる抗原が、結果として生じる四量体により認識されて結合されるように、異なる抗原決定領域を有する抗体由来の重鎖および軽鎖のペアがアセンブルされた、免疫グロブリン分子である。

【0047】

用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が、2以上の種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖および重鎖の両方の可変領域は、所望の特異性、親和性、および能力を有する哺乳類(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)の1つの種に由来する抗体の可変領域に対応し、一方で、定常領域は、その種における免疫応答を引き起こすことを避けるために、別の(たいていヒト)に由来する抗体における配列と同種である。

【0048】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、本明細書において交換可能に用いられ、特定の抗体により認識されて特異的に結合されることが可能な抗原の一部を指す。抗原がポリペプチドである場合は、エピトープは、タンパク質三次元フォールディングにより並置された連続アミノ酸と不連続アミノ酸の両方により形成され得る。連続アミノ酸により形成されるエピトープは典型的に、タンパク質変性時に維持されて、一方、三次元フォールディングにより形成されるエピトープは典型的に、タンパク質変性時に失われる。エピトープは典型的に、少なくとも3つの、より通例では少なくとも5つまたは8~10のア

10

20

30

40

50

ミノ酸を、固有の空間構造中に含む。抗原決定基は、無傷の抗原（すなわち、免疫応答を引き起こすために用いられる「免疫原」）と、抗体に対する結合に関して競合することができる。

【0049】

II. ニューログラニンアプタマー

本発明は、ニューログラニンに特異的に結合するポリヌクレオチドアプタマーに関する。特定の実施態様では、アプタマーは、ニューログラニンの検出のために用いられる。本発明のポリヌクレオチドアプタマーの配列は本明細書に開示され、さらなるアプタマーの実施態様は、当技術分野で知られている任意の方法により選択され得る。一実施態様では、アプタマーは、Systemic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX) のような反復選択方法により選択してよい。このタイプの方法では、オリゴヌクレオチドのランダムプール（例えば、約 10^5 ~ 約 10^{15} のランダムオリゴヌクレオチド）が標的タンパク質に曝されて、標的に結合するオリゴヌクレオチドが単離されて突然変異がされて、その方法が、標的に対して所望の親和力で結合するオリゴヌクレオチドが同定されるまで繰り返される。別の実施態様では、アプタマーは、本明細書に記載のアプタマーの配列および構造上の要求から始めて、その配列を修飾して他のアプタマーを生産することにより選択してよい。

10

【0050】

本発明の一実施態様では、アプタマーは、哺乳類のニューログラニンタンパク質に関する。さらなる実施態様では、アプタマーは、ヒト、マウスまたはラットのニューログラニンに関し得る。別の実施態様では、アプタマーは、ヒト、マウスおよびラットのニューログラニンに関する。特定の実施態様では、アプタマーは、約 1000 nM 未満、例えば、約 500 、 200 、 100 、 50 、または 20 nM 未満の K_d でニューログラニンに結合し得る。アプタマーは、ニューログラニンの任意のアイソフォームまたは翻訳後修飾形態、または、アイソフォームや翻訳後修飾形態などの任意の組み合わせに関し得る。

20

【0051】

本発明のアプタマーの長さは、制限されないが、典型的なアプタマーは、約 10 ~ 約 100 ヌクレオチド、例えば約 20 ~ 約 80 ヌクレオチド、約 30 ~ 約 50 ヌクレオチド、または約 40 ヌクレオチドの長さを有する。特定の実施態様では、アプタマーは、 $5'$ および/または $3'$ 末端に結合されたさらなるヌクレオチドを有してよい。さらなるヌクレオチドは、例えば、プライマー配列、制限エンドヌクレアーゼ配列、またはアプタマーの生産に有用なベクター配列の一部であってよい。

30

【0052】

本発明のポリヌクレオチドアプタマーは、リボヌクレオチドのみ (RNA アプタマー)、デオキシリボヌクレオチドのみ (DNA アプタマー)、またはリボヌクレオチドとデオキシリボヌクレオチドの組み合わせからなり得る。ヌクレオチドは、天然起源のヌクレオチド (例えば、ATP、TTP、GTP、CTP、UTP) または修飾ヌクレオチドであってよい。修飾ヌクレオチドとは、例えば、アデニン、グアニン、シトシン、チミン、およびウラシル、キサンチン、イノシン、およびキユーオシンなどの塩基が、1つまたは複数の原子または基の置換または付加により修飾されたものを含むヌクレオチドを指す。塩基部分に関して修飾されたヌクレオチドを含み得る、修飾のタイプのいくつかの例は、限定されないが、様々な組み合わせでのアルキル化、ハロゲン化、チオール化、アミノ化、アミド化、またはアセチル化塩基を含む。より具体的な例は、5 - プロピニルウリジン、5 - プロピニルシチジン、6 - メチルアデニン、6 - メチルグアニン、N, N, - ジメチルアデニン、2 - プロピルアデニン、2 - プロピルグアニン、2 - アミノアデニン、1 - メチルイノシン、3 - メチルウリジン、5 - メチルシチジン、5 - メチルウリジンおよび 5 位に修飾を有する他のヌクレオチド、5 - (2 - アミノ) プロピルウリジン、5 - ハロシチジン、5 - ハロウリジン、4 - アセチルシチジン、1 - メチルアデノシン、2 - メチルアデノシン、3 - メチルシチジン、6 - メチルウリジン、2 - メチルグアノシン、7 - メチルグアノシン、2, 2 - ジメチルグアノシン、5 - メチルアミノエチルウリジン、5

40

50

- メチルオキシウリジン、デアザヌクレオチド、例えば 7 - デアザ - アデノシン、6 - アゾウリジン、6 - アゾシチジン、6 - アゾチミジン、5 - メチル - 2 - チオウリジン、他のチオ塩基、例えば、2 - チオウリジンおよび 4 - チオウリジンおよび 2 - チオシチジン、ジヒドロウリジン、シュードウリジン、キューオシン、アルカエオシン、ナフチルおよび置換ナフチル基、任意の O - および N - アルキル化プリンおよびピリミジン、例えば、N6 - メチルアデノシン、5 - メチルカルボニルメチルウリジン、ウリジン 5 - オキシ酢酸、ピリジン - 4 - オン、ピリジン - 2 - オン、フェニルおよび修飾フェニル基、例えば、アミノフェノールまたは 2, 4, 6 - トリメトキシベンゼン、G - クランプヌクレオチドとして作用する修飾シトシン、8 - 置換アデニン類およびグアニン類、5 - 置換ウラシル類およびチミン類、アザピリミジン、カルボキシヒドロキシアルキルヌクレオチド、カルボキシアルキルアミノアルキルヌクレオチド、およびアルキルカルボニルアルキル化ヌクレオチドを含む。修飾ヌクレオチドはまた、糖部分に関して修飾されたヌクレオチド（例えば、2' - フルオロまたは 2' - O - メチルヌクレオチド）、および、糖類またはリボシルではないそのアナログを有するヌクレオチドを含む。例えば、糖部分は、マンノース、アラビノース、グルコピラノース、ガラクトピラノース、4' - チオリボース、および他の糖類、ヘテロ環、または炭素環であってよく、またはこれらに基づいてよい。用語ヌクレオチドはまた、ユニバーサル塩基として当技術分野で知られているものを含むことを意味する。例として、ユニバーサル塩基は、限定されないが、3 - ニトロピロール、5 - ニトロインドール、またはネブラリンを含む。修飾ヌクレオチドは、標識ヌクレオチド、例えば、放射能で、酵素的に、または発色により (chromogenically) 標識されたヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

【0053】

本発明の一実施態様では、アプタマーは RNA アプタマーであり、配列番号 4 - 6 のいずれかと同一のヌクレオチド配列を含む。別の実施態様では、RNA アプタマーは、配列番号 4 - 6 のいずれかと同一のヌクレオチド配列からなる。さらなる実施態様では、RNA アプタマーは、配列番号 4 - 6 のいずれかと少なくとも 70% 同一の、例えば、少なくとも 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、ヌクレオチド配列を含む。別の実施態様では、アプタマーは、配列番号 4 - 6 のいずれかと少なくとも 70% 同一の、例えば、少なくとも 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一の、ヌクレオチド配列からなる。異なる実施態様では、アプタマーは、配列番号 4 - 6 のいずれかの少なくとも 10 個連続したヌクレオチド、例えば、少なくとも約 15 個、20 個、25 個、30 個、または 35 個連続したヌクレオチドのフラグメントと同一のヌクレオチド配列を含む。さらなる実施態様では、アプタマーは、配列番号 4 - 6 のいずれかの少なくとも 10 個連続したヌクレオチド、例えば、少なくとも約 15 個、20 個、25 個、30 個、または 35 個連続したヌクレオチドのフラグメントと少なくとも 70% 同一の、例えば、少なくとも 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% 同一のヌクレオチド配列を含む。一実施態様では、上述の RNA アプタマー中の 1 つまたは複数のリボヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチドにより置換される。別の実施態様では、配列番号 4 - 6 のアプタマーのフラグメントおよび / またはアナログは、配列番号 4 - 6 のアプタマーの 1 つまたは複数と実質的に類似する結合および / または阻害活性を有する。本明細書で用いられる「実質的に類似する」とは、配列番号 4 - 6 のアプタマーの 1 つまたは複数の少なくとも約 20% の結合および / または阻害活性である、1 つまたは複数のニューログラニン機能に対する結合および / または阻害活性を指す。

【0054】

アプタマー配列、例えば配列番号 4 - 6 の変更は、ニューログラニンに対するアプタマーの結合のための構造上の要求に基づいて施され得る。構造上の要求は、開示のアプタマー間の共通配列を解析することにより、および / または、開示のアプタマーに突然変異を起こさせてニューログラニンの結合親和力を測定することにより、当業者により容易に決

定され得る。例えば、NRGN - A 1、NRGN - A 2、NRGN - A 3、NRGN - A 4 および NRGN - A 5 のそれぞれは、CC により隔てられた 2 T リッチのモチーフを含み、この配列が結合活性に重要であることを示している。

【0055】

アプタマーは、当業者に公知の任意の方法により合成されてよい。一実施態様では、アプタマーは、オリゴヌクレオチドの化学合成、および/または、より短いオリゴヌクレオチドのライゲーションにより生産されてよい。本発明の別の実施態様は、本発明のアプタマーをコードするポリヌクレオチドに関する。そのポリヌクレオチドを用いて、例えばインビトロ転写、ポリメラーゼ連鎖反応増幅、または細胞の発現により、アプタマーを発現してよい。そのポリヌクレオチドはDNA および/またはRNA であってよく、一本鎖または二本鎖であってよい。一実施態様では、そのポリヌクレオチドは、アプタマーを発現するために用いられ得るベクターである。そのベクターは、例えば、プラスミドベクターまたはウイルスベクターであってよく、任意のタイプの細胞、例えば、哺乳類、昆虫、植物、真菌、または細菌の細胞での使用に適している。そのベクターは、アプタマーを発現するために必要な1つまたは複数の調節エレメント、例えば、プロモーター、エンハンサー、転写調節エレメントなどを含んでよい。本発明の一実施態様は、本発明のアプタマーをコードするポリヌクレオチドを含む細胞に関する。別の実施態様では、本発明は、本発明のアプタマーを含む細胞に関する。その細胞は、任意のタイプの細胞、例えば、哺乳類、昆虫、植物、真菌、または細菌の細胞であってよい。

10

【0056】

本発明の一態様は、診断目的のための、本発明のアプタマーの使用に関する。アプタマーは、対象でのニューログラニンのレベルを測定するためのアッセイにおいて、結合剤として用いることができる。そのような測定は、ニューログラニンのレベルが異常かどうか決定するために用いることができる。そのような測定は、さらに、ニューログラニンと関連する、例えば、ニューログラニンの過剰発現または過小発現と関連する疾患または障害を診断するために用いることができる。他の実施態様では、アプタマーは、ニューログラニン受容体の競合結合アッセイにおいて、ニューログラニン受容体の存在量および/または受容体に対するニューログラニンの結合親和性および特異性を測定するために用いることができる。アプタマーはまた、インビボのイメージングまたは組織学的分析のために用いることができる。非常に多くの適切な結合アッセイが、当業者によく知られている。診断的アッセイは、研究目的のために、単離された細胞または細胞株上で、インビトロで行うことができる。診断的アッセイはまた、対象由来のサンプル（例えば、組織サンプル（バイオプシー、吸引液（aspirates）、スクレーピング（scrapings）など）または身体の液体サンプル（血液、血漿、血清、唾液、尿、脳脊髄液など））上で行うことができ、またはインビボで行うことができる。アプタマーは、制限されないが、蛍光性、発光性、リン光性、放射性、および/または比色性化合物を含む、当技術分野で知られている方法およびラベルを用いて標識することができる。

20

30

【0057】

一態様では、本発明は、ニューログラニンに結合させるために本発明のポリヌクレオチドアプタマーを用いるステップを含む、対象でのニューログラニンのレベルを測定する方法に関する。別の態様では、本発明は、本発明のポリヌクレオチドアプタマーを用いて対象でのニューログラニンのレベルを測定するステップを含む、対象でのニューログラニンと関連する疾患または障害を診断する方法に関する。ニューログラニンのレベルは、ニューログラニンと関連する疾患または障害の存在または不存在と相関し得る。

40

【0058】

上述のそれぞれの方法に関して、その方法はニューログラニンを標的とする単一のアプタマーを用いて実施してよい。別の実施態様では、その方法は、ニューログラニンを標的とする2以上の異なるアプタマー、例えば、3、4、5、または6の異なるアプタマーを用いて実施してよい。

【0059】

50

III. ニューログラニン抗体

一態様では、本発明は、診断またはスクリーニング目的に有用な、ニューログラニンに対する抗体を提供する。特定の実施態様では、本発明に記載の抗体は単離される。特定の実施態様では、本発明に記載の抗体は実質的に純粋である。

【0060】

一部の実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。特定の実施態様では、抗体はキメラ、ヒト化、またはヒト抗体である。本発明はさらに二重特異性抗体を提供する。特定の実施態様では、抗体はFabフラグメントのような抗体フラグメントである。

【0061】

特定の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに対する単離抗体を提供する。特定の実施態様では、前記抗体は配列番号11に特異的である。他の実施態様では、前記抗体は、配列番号11のアミノ酸55-78に特異的に結合する。前記抗体またはその抗体フラグメントは、ニューログラニンを特異的に認識する任意のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であり得る。一部の実施態様では、本発明は、ニューログラニンに特異的に結合するモノクローナル抗体またはそのフラグメントを提供する。一部の実施態様では、前記モノクローナル抗体またはそのフラグメントは、ニューログラニンまたはそのエピトープまたは抗原決定基に特異的に結合するキメラまたはヒト化抗体である。

10

【0062】

ニューログラニンに対する抗体は、本発明に記載の実験的および診断的方法での用途を見いだす。特定の実施態様では、本発明の抗体は、例えば、組織、血液、血漿、血清、脳脊髄液サンプルなどの生物学的サンプル中のニューログラニタンパク質の発現を検出するために用いられる。組織バイオプシーを切開して、ニューログラニタンパク質を、例えば、免疫蛍光または免疫組織化学を用いて検出することができる。あるいは、サンプル由来の各細胞を単離して、FACS分析により固定細胞または生細胞上にタンパク質発現を検出する。さらに、抗体をタンパク質アレイ上で用いて、例えば、細胞上、細胞溶解物中、または他のタンパク質サンプル中のニューログラニンの発現を検出することができる。

20

【0063】

ポリクローナル抗体は、任意の公知の方法で調製することができる。ポリクローナル抗体は、場合により、滅菌生理食塩水中に希釈されたキーホールリンペットヘモシニアン(KLH)、血清アルブミンなどに結合され、および、アジュバント(例えば、完全または不完全フロイントアジュバント)と組み合わせて安定したエマルジョンを形成させて、関連抗原(精製ペプチドフラグメント、全長組み換えタンパク質、融合タンパク質など)の複数回の皮下または腹腔内注射により動物(例えば、ウサギ、ラット、マウス、ロバなど)を免疫化することにより高めることができる。ポリクローナル抗体は、それから、そのように免疫化された動物の血液、腹水などから回収される。回収血液は凝固されて、血清が静かに移され、遠心分離により澄まされて、抗体力価に関して分析される。ポリクローナル抗体は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析などを含む、当技術分野で標準的な方法により、血清または腹水から精製することができる。

30

40

【0064】

モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein(1975)Nature 256:495により記載されるもののようなハイブリドーマ方法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ方法を用いて、マウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は上述のように免疫化されて、免疫抗原に特異的に結合する抗体の、リンパ球による産生を引き起こす。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化することができる。免疫化に続いて、リンパ球を単離して、ポリエチレングリコールなどを用いて適切な骨髓腫細胞株と融合してハイブリドーマ細胞を形成してから、融合されていないリンパ球および骨髓腫細胞から選択することができる。免疫沈降、イムノプロットティング、またはインビトロ結合アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)または酵素結合免疫吸着

50

測定法 (ELISA) により決定される、選択抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、それから、標準的な方法 (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986) を用いてインビトロ培養で、または動物での腹水腫瘍としてインビボでのいずれかで、増殖することができる。モノクローナル抗体は、それから、上記にポリクローナル抗体に関して記載のように、培養培地または腹水液から精製することができる。

【0065】

あるいはモノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載の組み換えDNA法を用いて作成することもできる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞などから、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を実験的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRなどにより単離され、そして、それらの配列は従来法を用いて決定される。重鎖および軽鎖をコードする単離ポリヌクレオチドはそれから、適切な発現ベクターにクローニングされて、E.coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞、または骨髄腫細胞などの免疫グロブリンタンパク質を産生しない宿主細胞にトランスフェクトされると、モノクローナル抗体は宿主細胞により産生される。また、所望の種の組み換えモノクローナル抗体またはそのフラグメントは、記載 (McCafferty et al., 1990, Nature, 348: 552-554; Clackson et al., 1991, Nature, 352: 624-628; および Marks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581-597) のようにファージディスプレイライブラリーから単離することもできる。

10

20

【0066】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチド (単数または複数) は、組み換えDNA技術を用いた多くの異なる方法でさらに修飾して、代替的な抗体を生産することができる。一実施態様では、例えば、マウスモノクローナル抗体の軽鎖および重鎖の定常ドメインを、1) 例えば、ヒト抗体のこれらの領域に置換してキメラ抗体を産生する、または2) 非免疫グロブリンポリペプチドに置換して融合抗体を産生することができる。他の実施態様では、定常領域をトランケートまたは除去して、モノクローナル抗体の所望の抗体フラグメントを産生する。さらに、可変領域の部位特異的または高密度の突然変異誘発を用いて、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化することができる。

30

【0067】

本発明の一部の実施態様では、ニューログリンに対するモノクローナル抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体は、可変領域内に、非ヒト (例えばミューリン) 抗体由来の最小限の配列を含む抗体である。実際には、ヒト化抗体は典型的に、最小限の非ヒト配列を有するヒト抗体である。ヒト抗体は、ヒトにより産生される抗体またはヒトにより産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。

【0068】

ヒト化抗体は、当技術分野で知られている様々な技術を用いて生産することができる。抗体は、ヒト抗体のCDRを、所望の特異性、親和性、および能力を有する非ヒト抗体 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど) のものと置換することにより、ヒト化することができる (Jones et al., 1986, Nature, 321: 522-525; Riechmann et al., 1988, Nature, 332: 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science, 239: 1534-1536)。ヒト化抗体は、Fvフレームワーク領域内および/または置換された非ヒト残基内のいずれかを、さらなる残基の置換によりさらに修飾して、抗体の特異性、親和性、および/または能力を高めて、そして最適化することができる。

40

【0069】

ヒト抗体は、当技術分野で知られている様々な技術を用いて、直接調製することができる。インビトロで免疫化された、または免疫化個体から単離された、標的抗原に対する抗

50

体を産生する不死化ヒトBリンパ球を生産することができる(例えば、Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al., 1991, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95; および米国特許第5,750,373号を参照)。また、ヒト抗体は、ファージライブラリーがヒト抗体を発現するファージライブラリーから選択することができる(Vaughan et al., 1996, *Nature Biotechnology*, 14: 309-314; Sheets et al., 1998, *PNAS*, 95: 6157-6162; Hoogenboom and Winter, 1991, *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.*, 222: 581)。ヒト抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含むトランスジェニックマウス内で作成することもでき、内因性の免疫グロブリン産生の不存在下で、免疫化の際にヒト抗体の全レパートリーを産生することが可能である。この方法は、米国特許第5,545,807号;第5,545,806号;第5,569,825号;第5,625,126号;第5,633,425号;および第5,661,016号に記載されている。

【0070】

本発明の特定の実施態様では、無傷の抗体よりむしろ、抗体フラグメントを用いる方が望ましくあり得る。抗体フラグメントの生産に関して、様々な技術が知られている。伝統的には、これらのフラグメントは、無傷の抗体のタンパク質分解により得られる(例えば、Morimoto et al., 1993, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 および Brennan et al., 1985, *Science*, 229: 81)。しかしながら、これらのフラグメントは、現在では典型的に、上述のように組み換え宿主細胞により直接生産される。したがって、Fab、Fv、およびscFv抗体フラグメントは全て、E.coliまたは他の宿主細胞で発現されて分泌することができ、したがって、これらのフラグメントの大量生産が可能である。あるいは、そのような抗体フラグメントは、上述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。抗体フラグメントはまた、例えば米国特許第5,641,870号に記載の線状抗体であってよく、単一特異性または二重特異性であってよい。抗体フラグメントの生産に関する他の技術は明らかである。

【0071】

本発明は、本明細書に記載の、キメラ抗体、ヒト化抗体およびヒト抗体、またはそれらの抗体フラグメントと実質的に相同の変異体および同等物をさらに含む。これらは、例えば保存的置換変異、すなわち、類似アミノ酸による1つまたは複数のアミノ酸の置換を含み得る。例えば、保存的置換とは、例えば、1つの酸性アミノ酸が別の酸性アミノ酸で、1つの塩基性アミノ酸が別の塩基性アミノ酸で、または1つの中性アミノ酸が別の中性アミノ酸により置換されるように、アミノ酸が、同一の一般的な分類内の別のアミノ酸で置換されることを指す。保存的アミノ酸置換により意図されることは、当技術分野でよく知られている。

【0072】

本発明はさらに、1つまたは複数の抗体を含む、製造キットおよび製品を提供する。特定の実施態様では、そのキットは、少なくとも2つの抗体を含む。特定の実施態様では、そのキットは、ニューログラニンタンパク質に特異的に結合する少なくとも1つの抗体を含む。

【0073】

IV. ニューログラニンおよび他のバイオマーカーの検出

A. 質量分析による検出

一態様では、本発明のバイオマーカーは、質量分析計を用いて気相イオンを検出する方法である質量分析により検出され得る。質量分析計の例は、飛行時間型、磁場型、四重極フィルター型、イオントラップ型、イオンサイクロトロン共鳴型、静電セクタ分析機器、

10

20

30

40

50

前述の複合型または組み合わせなどである。特定の実施態様では、質量分析方法は、マトリクス支援レーザー脱離/イオン化飛行時間型(MALDI-TOF MSまたはMALDI-TOF)を含む。別の実施態様では、方法はMALDI-TOFタンデム質量分析(MALDI-TOF MS/MS)を含む。さらに別の実施態様では、質量分析は、当技術分野における通常の知識を有する者により検討され得る別の適切な方法(単数または複数)と組み合わせることができる。例えば、MALDI-TOFを、本明細書に記載のようにトリプシン消化およびタンデム質量分析とともに使用することができる。別の実施態様では、質量分析技術は、マルチプルリアクションモニタリング(MRM)または定量MRMである。

【0074】

代替の実施態様では、質量分析技術は、例えば、米国特許第6,225,047号および第5,719,060号に記載の表面エンハンス型レーザー脱離イオン化または「SELDI」を含む。手短には、SELDIは、脱離/イオン化気相イオン分光分析(例えば質量分析)の方法を指し、分析物(ここでは、1つまたは複数のバイオマーカー)は、SELDI質量分析プローブの表面上に捕捉される。使用がされ得る様々なバージョンのSELDIが存在し、制限されないが、Affinity Capture Mass Spectrometry(Surface-Enhanced Affinity Capture(SEAC))とも呼ばれる)、および、プローブ表面に化学的に結合されたエネルギー吸収分子を含むプローブ(SENDプローブ)の使用を含むSurface-Enhanced Neat Desorption(SEND)が含まれる。別のSELDI方法は、Surface-Enhanced Photolabile Attachment and Release(SEPAR)と呼ばれ、表面に結合された部分を有するプローブの使用を含み、それは分析物に共有結合することができ、そして、光、例えば、レーザー光への曝露後に、その部分での感光性の結合を切断することにより、その分析物を放出する(米国特許第5,719,060号参照)。SEPARおよび他の形態のSELDIは、本発明に従って、バイオマーカーまたはバイオマーカーパネルの検出に容易に適用される。

【0075】

別の質量分析方法では、バイオマーカーは、このバイオマーカーを結合するクロマトグラフィー特性を有するクロマトグラフィー樹脂上に最初に捕捉され得る。例えば、CM Ceramic HyperD F樹脂などのカチオン交換樹脂上にバイオマーカーを捕捉して、樹脂を洗浄して、バイオマーカーを溶出してMALDIにより検出することができる。あるいは、この方法は、カチオン交換樹脂への適用の前に、アニオン交換樹脂上でサンプルの分画を先に行うことができる。別の代替では、アニオン交換樹脂上で分画して、MALDIにより直接検出することができる。さらに別の方法では、このバイオマーカーを結合する抗体を含むイムノクロマトグラフィー樹脂上にバイオマーカーを捕捉して、樹脂を洗浄して、結合していない物質を除去して、樹脂からバイオマーカーを溶出して、MALDIまたはSELDIによって溶出バイオマーカーを検出することができる。

【0076】

B. イムノアッセイによる検出

他の実施態様では、本発明のバイオマーカーは、イムノアッセイにより検出および/または測定することができる。イムノアッセイは、バイオマーカーを捕捉するための、抗体のような生体特異性の捕捉試薬を必要とする。多くの抗体が市販されている。抗体はまた、当技術分野でよく知られている方法によって、例えば、バイオマーカーで動物を免疫化することによって生産することもできる。バイオマーカーは、その結合特性に基づいてサンプルから単離することができる。あるいは、ポリペプチドバイオマーカーのアミノ酸配列が公知ならば、そのポリペプチドを合成して用い、当技術分野でよく知られている方法により抗体を生産することができる。

【0077】

本発明は、例えば、ELISAまたは蛍光に基づくイムノアッセイを含むサンドイッチ

10

20

30

40

50

イムノアッセイ、イムノプロット、ウエスタンプロット(WB)、および他の酵素イムノアッセイを含む、伝統的なイムノアッセイを企図する。ネフェロメトリは液相内で行われる分析であり、抗体は溶液中に存在する。抗体への抗原の結合は吸光度の変化をもたらす、それが測定される。SELDIに基づくイムノアッセイでは、バイオマーカーに関する生体特異性の捕捉試薬は、MSプローブの表面、例えば、事前に活性化されたタンパク質チップアレイに結合される。それから、バイオマーカーは、この試薬を介してバイオチップ上に特異的に捕捉されて、捕捉されたバイオマーカーは質量分析により検出される。

【0078】

抗体は、その広範囲の特性のため有用であるが、本発明のバイオマーカーに特異的に結合する任意の他の適切な物質(例えば、ペプチド、アプタマー、または有機小分子)が、場合により、上述のイムノアッセイでの抗体の代わりに使われる。例えば、ニューログリン全部および/または1つまたは複数のその分解産物に特異的に結合するアプタマーを用いてよい。アプタマーは、特異的なリガンドに結合する核酸ベースの分子である。特定の結合特異性を有するアプタマーを作製するための方法は、米国特許第5,475,096号;第5,670,637号;第5,696,249号;第5,270,163号;第5,707,796号;第5,595,877号;第5,660,985号;第5,567,588号;第5,683,867号;第5,637,459号;および第6,011,020号に記載されるように公知である。

【0079】

C. 電気化学発光アッセイによる検出

様々な実施態様において、本発明のバイオマーカーは、Meso Scale Discovery (Gaithersburg, MD)により開発された電気化学発光アッセイを用いて検出してよい。電気化学発光の検出は、電気化学的に刺激されると発光するラベルを用いる。刺激のメカニズム(電気)がシグナル(光)から切り離されているため、バックグラウンドシグナルは最小限である。ラベルは安定で非放射性であり、便利な結合化学(coupling chemistries)の選択を提供する。それらは約620nmで発光し、消色の問題をなくす。米国特許第7,497,997号;第7,491,540号;第7,288,410号;第7,036,946号;第7,052,861号;第6,977,722号;第6,919,173号;第6,673,533号;第6,413,783号;第6,362,011号;第6,319,670号;第6,207,369号;第6,140,045号;第6,090,545号;および第5,866,434号を参照。また、米国特許出願公開第2009/0170121号;第2009/006339号;第2009/0065357号;第2006/0172340号;第2006/0019319号;第2005/0142033号;第2005/0052646号;第2004/0022677号;第2003/0124572号;第2003/0113713号;第2003/0003460号;第2002/0137234号;第2002/0086335号;および第2001/0021534号も参照。

【0080】

D. バイオマーカーを検出するための他の方法

本発明のバイオマーカーは、他の適切な方法により検出することができる。この目的を達成するために用いることができる検出方法論は、光学的方法、電気化学的方法(ボルタメトリーおよびアンペロメトリー技術)、原子間力顕微鏡、および無線周波数方法、例えば、多極性共鳴分光法を含む。光学的方法の具体例は、共焦点および非共焦点の両方の顕微鏡に加えて、蛍光、発光、化学発光、吸光度、反射率、透過率、および複屈折または屈折率の検出(例えば、表面プラズモン共鳴、偏光解析法、共振ミラー法、格子結合導波管法(grating coupler waveguide method)または干渉法)である。

【0081】

さらに、サンプルはまた、バイオチップを用いて分析してもよい。バイオチップは通常、固体基板を含み、一般に平面表面を有し、捕捉試薬(吸着剤またはアフィニティ試薬と

10

20

30

40

50

も呼ばれる)がそれに結合している。しばしば、バイオチップの表面は複数のアドレス可能な場所を含み、そのそれぞれが、そこに結合された捕捉試薬を有する。タンパク質バイオチップは、ポリペプチドの捕捉に適したバイオチップである。多くのタンパク質バイオチップが当技術分野で説明されている。これらは、例えば、Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA)、Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA)、Affymetrix, Inc. (Fremont, CA)、Zyomyx (Hayward, CA)、R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN)、Biacore (Uppsala, Sweden) および Procognia (Berkshire, UK) により生産されるタンパク質バイオチップを含む。そのようなタンパク質バイオチップの例は、以下の特許または公開特許出願：米国特許第6,537,749号；米国特許第6,329,209号；米国特許第6,225,047号；米国特許第5,242,828号；PCT国際公開WO00/56934；およびPCT国際公開WO03/048768に記載されている。

10

【0082】

V. ニューログラニンおよび他の脳損傷バイオマーカーの検出のためのキット

別の態様では、本発明は、脳損傷の状態を認定するためのキットを提供し、そのキットは、ニューログラニンおよび他のバイオマーカーを検出するために用いられる。特定の実施態様では、そのキットは、ニューログラニンに対する抗体を含むELISAキットとして提供される。他の実施態様では、キットは、ASTN1、BAI3、CNDP1、ERMIN、GFAP、GRM3、KLH32、MAGE2、NRG3、OMG、SLC39A12、RTN1およびMT3の1つまたは複数に対する抗体を含み得る。

20

【0083】

ELISAキットは、固体支持体、例えば、チップ、マイクロタイタープレート(例えば96ウェルプレート)、ビーズ、またはバイオマーカー捕捉試薬が結合した樹脂を含んでよい。キットはさらに、バイオマーカーを検出するための手段、例えば、抗体、および、二次抗体-シグナル複合体、例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)-コンジュゲート型ヤギ抗-ウサギIgG抗体およびHRPの基質としてのテトラメチルベンジジン(TMB)を含んでよい。

【0084】

他の実施態様では、脳損傷の状態を認定するためのキットは、抗体が固定化された膜を含むイムノクロマトグラフィーストリップとして、および、例えば金粒子結合抗体を検出するための手段として提供され得て、ここで膜はNC膜およびPVDF膜を含む。キットは、サンプルアプリケーションパッド、ガラス繊維フィルター上に一時的に固定化された金粒子結合抗体、抗体バンドおよび二次抗体バンドが固定化されたニトロセルロース膜、および吸収剤パッドが、血清の連続的な毛管流を維持するために、その上に連続して配置されるプラスチックプレートを含んでもよい。

30

【0085】

特定の実施態様では、患者は、患者由来の血液または血清をキットに添加して、抗体と特異的に結合される関連バイオマーカーを検出することにより、具体的には、(i)患者から血液または血清を回収するステップ；(ii)患者の血液から血清を分離するステップ；(iii)患者由来の血清を診断キットに添加するステップ；および、(iv)抗体と結合するバイオマーカーを検出するステップを含む方法により、診断することができる。この方法では、抗体は、患者の血液と接触させられる。サンプル中にバイオマーカーが存在すれば、抗体は、サンプル、またはその一部に結合する。他のキットおよび診断の実施態様では、血液または血清は、患者から回収する必要はない(すなわち、すでに回収されている)。さらに、他の実施態様では、サンプルは、組織サンプルまたは臨床サンプルを含んでよい。

40

【0086】

キットはまた、洗浄液または洗浄液を作るための説明書も含むことができ、捕捉試薬と洗浄液の組み合わせは、例えば抗体または質量分析による後の検出のための、固体支持体

50

上のバイオマーカーの捕捉を可能にする。さらなる実施態様では、キットは、ラベルまたは別個の挿入物の形態で適切な操作パラメーターに関する説明書を含むことができる。例えば、説明書は、サンプル回収の仕方、プローブの洗浄の仕方、または検出すべき特定のバイオマーカーなどについて、消費者に情報を提供し得る。さらに別の実施態様では、キットは、キャリブレーション用のスタンダード（単数または複数）として用いられるバイオマーカーサンプルを有する1つまたは複数の容器を含むことができる。

【0087】

さらなる苦勞なく、当業者は上述の説明を用いて、本発明を最大限に利用することができることが確信される。以下の実施例は説明のためのみであって、いかなる場合においても開示の残部を限定しない。

【実施例】

【0088】

以下の実施例は、本明細書および特許請求の範囲に記載の化合物、組成物、物品、デバイス、および/または方法が、どのように作製および評価されるかについて、完全な開示および説明を、当技術分野における通常の知識を有する者に提供するために提示され、純粹に説明を目的とし、発明者らが彼らの発明だと考える範囲を限定することを意図しない。数（例えば、量、温度など）に関して正確さを保証する努力をしているが、いくらかの誤差および偏差が本明細書で考慮されるべきである。別段の指示がない限り、部は重量部であり、温度はセ氏温度または周囲温度であり、そして圧力は大気圧または大気圧付近である。反応条件、例えば、構成要素の濃度、所望の溶媒、溶媒混合物、温度、圧力、および、記載の方法から得られる産物の純度および収率を最適化するために用いることができる他の反応範囲および条件の、非常に多くのバリエーションおよび組み合わせがある。合理的で日常的な実験のみが、そのような方法の条件を最適化するために必要とされる。

【0089】

（実施例1）ニューログラニンのアッセイの開発

ヒトNRGN特異的アプタマーの同定。 Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment (SELEX)の方法を用いて、ヒトNRGN特異的アプタマーを同定した。手短には、特異的アプタマーは、フィルター固定化により、一本鎖RNAのプールから選択した。RNA-NRGN標的複合体は、ニトロセルロースフィルターに結合することができ、フリーのRNAは濾過を通過した。特異的アプタマーをフィルターから回収してPCR増幅した。数回もの選択後、NRGNと最も高い親和力を有する特異的アプタマーを富化して配列同定した。

【0090】

選択のためにライブラリーを調製する。一本鎖DNAオリゴプールを、化学的に合成した。DNAオリゴは、2つの定常配列が隣接した40merのランダムなセントラルコアを有し、ライブラリーは、ライブラリーの5'および3'保存末端を標的とするプライマーペアにより増幅することができる。ライブラリーの配列は、5'-TCTCGGATCCCTCAGCGAGTCTCTG(N40)CCGCATCGTCCCTCCTA-3'（配列番号1）である。

【0091】

RNAライブラリーの生産。一本鎖DNAライブラリーは、インビトロ転写のためのT7プロモーターを含んで配列が5'-GGGGGAATTCTAATACGACTCACCTATAGGGAGGACGATGCGG-3'（配列番号2）である、Sel2 5'プライマーで最初にアニールさせた。ギャップは、37で1.5時間のKlenow反応により埋めた。反応を、フェノール：クロロホルム：イソアミル（25：24：1）およびクロロホルム：イソアミル（24：1）のそれぞれ一回抽出により精製し、さらに、4にてセントリコン30で濃縮した。濃縮行程中に、pH7.4のTEバッファーを用いて反応を2回洗浄した。最終OD260を測定して濃度を決定した。

【0092】

10

20

30

40

50

上記のアニールオリゴプールを用いて、メーカーの反応条件に従ってDuraScribe (登録商標) T7転写キット (Epicentre, DS010910) を用いたインビトロ転写により、SELEXのためのRNAライブラリーを作成した。2'-フッ素-CTP (2'-F-dCTP) および2'-フッ素-UTP (2'-F-dUTP) を用いて転写反応でCTPおよびUTPを置換した。最終のDuraScript (登録商標) RNA (2'-フッ素-修飾RNA) はRNase Aに完全に耐性である。インビトロ転写後、DNase Iを用いて反応を処理し、フェノール：クロロホルム：イソアミル (25:24:1) およびクロロホルムそれぞれ1回でRNAを抽出して、続けて濃縮し、4 にてセントリコン30で脱塩した。

【0093】

変性PAGE (12%、7M尿素) ゲル精製によりRNAをさらに精製した。RNAバンドをPAGEゲルから切り取り、4 にて一晚、RNAを2mlのTEバッファー中に溶出した。再びセントリコン30を用いて純粋なRNAを濃縮し、従来の方法を用いてRNA濃度を決定した。

【0094】

ニトロセルロースフィルターの事前洗浄。 13mmのSwinn-Lokフィルターホルダー (Whatman) (直径13mm)、0.45 μmのポアサイズのHAWPニトロセルロースディスクフィルター (Millipore) を組み立てた。20mM HEPES pH7.4、50mM NaClおよび2mM CaCl₂を含む、1ml洗浄バッファーで、フィルターを事前に湿らせた。500 pmolのRNAを、100 μlの1 × 結合バッファー (組成は、0.1% BSAを加えた以外、洗浄バッファーと同じ) 中に希釈して、フィルターホルダーの容器内にアプライした。フィルターホルダーを50ml円錐管中に密封して、37 で30分間インキュベートした。インキュベーション後、1mlシリンジを用いてフィルターユニットを通すことによりRNAを回収し、100 μlの1 × 結合バッファーを用いて一度洗浄した。フィルターを通ったRNAを回収した；事前に浄化されたRNAの全量は約180 μlであった。

【0095】

結合反応。 50 pmolのヒトNRGNタンパク質を、事前に浄化されたRNAに、RNA：タンパク質の分子比を約10:1で添加することにより、結合反応を構築した。全量は1 × 結合バッファー中、200 μlであった。反応は、37 で15分間インキュベートした。新しいフィルターホルダーを組み立てて、上記のように事前に湿らせて、フィルターに対する結合反応を適用して、5mlシリンジを用いて結合サンプルを押し通して、5mlの洗浄バッファーでフィルターを洗浄した。

【0096】

選択RNAを回収する。 フィルターホルダーを解体して、600 μlのフェノール：クロロホルム：イソアミル (25:24:1) を含む1.5ml遠心分離管内へフィルターを移した。チューブをおよそ1分間激しくボルテックスし、それから、RTで30分間インキュベートした。200 μlのH₂Oを加えて再度ボルテックスし、それから、14,000 rpmで10分間、回転させた。回収RNAを含む上清を400 μlのクロロホルムで一度抽出して、それから、500 μlのエタノール、20 μlの3M NaAcetate (pH 5.2) および3 μlのGlycogen blue (Ambion, 5 mg/ml) を加えることにより沈殿させて、それから、-80 で一晚インキュベートした。4 で20分間、14000 rpmでの遠心分離によりRNAを回収し、それから、1mlの75%エタノールで一度洗浄し、遠心分離およびRNAの風乾を続けた。乾燥RNAペレットを、20 μlのH₂O中に溶解させた。

【0097】

RT-PCRによって、選択RNAを増幅する。 5mlの回収RNAを用いてDNAの第一鎖を合成した。2 μMのプライマーSel2_{3'}を反応に加えた。Sel2_{3'}プライマーの配列は：5'-TCT CGG ATC CTC AGC GAG TCG TC-3' (配列番号3) である。Rocheからの逆転写酵素 (Cat. No. 10

10

20

30

40

50

109 118 001) を、メーカーにより推奨される条件で反応に用いた。

【0098】

PCR 反応は以下のように構築した：5 μ l の第一鎖 DNA (上記のステップによる)、3 μ l の各 10 μ M プライマー (上記ステップによる Sel 2 3' および上記ステップによる Sel 2 5')、39 μ l の H₂O および 50 μ l の 2 \times Top Taq Master Mix (Qiagen)。全部で 8 反応 (800 μ l) を行なった。PCR サイクルの条件は以下であった：94 / 5 分 - -> (94 / 30 秒 - -> 55 / 30 秒 - -> 72 / 30 秒) \times 20 サイクル - -> 4。3% アガロースゲル電気泳動により PCR 産物を確認して、PCR 産物の残りを脱塩して、4 でセントリコン 30 を用いて濃縮した。OD / 260 nm を測定することにより、PCR 産物の濃度を決定した。

10

【0099】

選択を反復する。 上述のようにインビトロ転写のプロトコルに従って、1 μ g の濃縮 PCR 産物を用いて、次ラウンドの選択のための RNA を生産した。全部で 10 回の選択を行なった。

【0100】

10 ラウンドの選択後、高塩結合バッファーを用いて別の 3 ラウンドの選択を行なって選択ストリンジェンシーを高めた。1 \times 結合バッファー F および洗浄バッファー F の組成は、NaCl 濃度を 150 mM に増加した以外は、上述のバッファーと同一である。他の詳細の方法は上述のものと同じである。

【0101】

13 ラウンドの選択後の最終 PCR 産物を、pGEM-T Easy ベクター (Promega) にクローニングして、DNA シーケンシングにより富化アプタマーを同定した。EMBL-EBI ウェブサイトでの Clustal W2 を用いて、プライマー全長および 40 mer のインサートを含むクローンをアライニングした。

20

【0102】

同定された、ヒト NRGN 特異的アプタマー。 6 つのクローンをシーケンシング用に選択し、全ての配列の質は非常に高かった。DNA アライメント解析後、6 つのクローンのうちの 5 つは、NRGN-A4 が 1ヌクレオチドの違い (下線) を有する以外、ほぼ同一であった。他の良くアライニングされた 5 つのクローンと比較してあまり似ていないものは NRGN-A6 であり、それらの全てが、CC/CA (四角で囲った) により隔てられた 2 T-リッチのモチーフを有することを示した。NRGN-A1 と NRGN-A6 を、検証のための標的として選択した。以下にアプタマーのアライメントを示した：

30

【0103】

NRGN-A1 TCTAACGCCTCCCGTATGTTTT \square CCT---TTTT-CCATTG---CGGAT 40

(配列番号4)

NRGN-A2 TCTAACGCCTCCCGTATGTTTT \square CCT---TTTT-CCATTG---CGGAT 40

(配列番号4)

NRGN-A3 TCTAACGCCTCCCGTATGTTTT \square CCT---TTTT-CCATTG---CGGAT 40

40

(配列番号4)

NRGN-A5 TCTAACGCCTCCCGTATGTTTT \square CCT---TTTT-CCATTG---CGGAT 40

(配列番号4)

NRGN-A4 TCTAACGCCTCCCG \underline{C} ATGTTTT \square CCT---TTTT-CCATTG---CGGAT 40

(配列番号5)

NRGN-A6 -TTTTCA \underline{C} TTTT \square ---ATTTTTTTCCAAATCGATCCGCCGGACCTTAT 43

50

(配列番号6)

【0104】

アプタマー - NRGN相互作用の検証。 RNAの3'末端にビオチンリンカーを付加して、同定された配列に基づいてNRGN - A1およびNRGN - A6 RNAを化学的に合成した。2つの異なるストラテジーを用いて、NRGNアプタマーとNRGN組み換えタンパク質の相互作用を試験した。詳細を以下に示す。

【0105】

ドットプロットを用いて、ニトロセルロース上のRNAタンパク質複合体を検出する。 SEL EX方法で使用したものと同一のメカニズムに基づいて、RNA - タンパク質複合体をニトロセルロース膜上に保持することができ、ドットプロットを用いてビオチンラベル化RNAアプタマーを検出した。最初に、10 pmol ~ 0の範囲のタンパク質量で、2倍希釈系列のHis - NRGN組み換えタンパク質を作製し；それから、各サンプルを1 pmolのNRGNアプタマーRNAと混合した。最終の結合反応液の容量を、1×結合バッファーF中20 µlに維持し、37 °Cで15分間、反応をインキュベートした。

【0106】

その間、ドットプロット装置(Bio - Rad, #170 - 6545)をセットアップした。ニトロセルロース膜を切断して、使用前に、1×洗浄バッファーF中で30分間振とうさせた。ニトロセルロース膜を、事前に湿らせたワットマン紙の上部に置いて、装置の底部に設置し、それからバキュームを組み立てて取り付けた。ウェルあたり100 µlの1×洗浄バッファーFで膜を1回洗浄して、それから、結合反応液をアプライした。反応液が通過後、200 µlの1×洗浄バッファーFで膜を1回洗浄して、それから吸引により排水した。それから膜をUVクロスリンクした(Bio - Rad, #165 - 5031)。

【0107】

化学発光核酸検出モジュール(Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module)(Pierce, #89880)を用いて、メーカーの説明書に従って、ニトロセルロース上に保持されたビオチンラベル化RNAアプタマーを検出した。手短には、ストレプトアビジン - HRPコンジュゲートとともに膜をインキュベートして、HRPの化学発光基質で検出した。

【0108】

結果として、NRGN - A1とA6の両方のNRGNアプタマーがNRGNタンパク質に結合して、この方法を用いた検出に必要な最少タンパク質量は、それぞれ1.25 pmolおよび0.63 pmolであった。コントロールとして同モルのヒトアルブミンを使用した場合は、使用したアルブミンの量にかかわらずシグナルが検出できなかった。この結果は、これらの2つのアプタマーの両方が、His - NRGNタンパク質に特異的に結合することを示した。図1参照。

【0109】

プルダウンアッセイ。 ビオチンラベル化アプタマーをストレプトアビジン粒子上に固定化して、プルダウンアッセイを行なった。TEN100バッファー(10 mM Tris - HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl)中に、アプタマーを1 pmol / µlに希釈して、65 °Cで5分間加熱し、それから、RTで20分間放置して、RNAをその天然コンフォメーションにフォールディングさせた。ストレプトアビジン磁性粒子(Roche, 11641778001)を、2倍量のTEN100バッファーで3回洗浄し、それから、アプタマーサンプルを加えて、RTで30分間、回転させながらインキュベートした。インキュベーション後、粒子をTEN100バッファーで3回洗浄して、それから、1×結合バッファーFで1回平衡化した。異なる量のNRGNタンパク質(0 ~ 2 nmol)を1×結合バッファー中に希釈し、アプタマー固定化磁性粒子中に添加して、それから37 °Cで15分間インキュベートした。

【0110】

結合インキュベーションの後、粒子をTEN100バッファーで2回洗浄した。室温で

10

20

30

40

50

10分間、26µlの溶出バッファー(1M NaCl、10mM EDTA)中でインキュベートすることにより、アプタマータンパク質複合体を解離させた。溶出タンパク質をSDS-PAGEに供し、タンパク質バンドをクマシー染色により可視化した。ヒトアルブミンタンパク質をネガティブコントロールとして用いた。典型的な染色ゲルを図2に示す。

【0111】

ドットプロットとブルダウンアッセイの両方が、アプタマーがヒトNRGN組み換えタンパク質に特異的に結合することを示した。

【0112】

ニューログラニンのマルチプルリアクションモニタリング(MRM)アッセイの開発。
質量分析定量MRMアッセイのために、ニューログラニンシグネチャペプチドを開発した。ペプチド配列およびトランジションを以下の表に示す。ラベル化GPGPGGGAGVAR(配列番号7)をサンプル中に入れて、シグネチャペプチドGPGPGGGAGVAR(配列番号7)の濃度を測定するための検量線を作成した。トリプシン消化に切断ミスがないことを確実にするために、ペプチドKPGPGGGAGVAR(配列番号8)もモニターする。

10

【0113】

【表1】

表8. ニューログラニンペプチド配列

20

プリカーサー Q1	トランジション Q3	ペプチドID
553.79	366.18	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	423.2	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	684.38	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	741.4	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	798.42	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	895.47	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	952.49	GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)

30

558.792	366.18	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
558.792	423.2	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
558.792	694.39	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
558.792	751.41	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
558.792	808.43	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
558.792	905.48	Labeled GPGPGGGAGVAR (配列番号NO:7)
617.846	684.38	KPGPGGGAGVAR (配列番号NO:8)
617.846	741.4	KPGPGGGAGVAR (配列番号NO:8)
617.846	798.42	KPGPGGGAGVAR (配列番号NO:8)
617.846	950.5	KPGPGGGAGVAR (配列番号NO:8)
617.846	962.5	KPGPGGGAGVAR(配列番号NO:8)

40

【0114】

ABI Sciex Qtrap 4000三重四極質量分析計を用いた、ニューログラニンシグネチャペプチドとラベル化スタンダードペプチドのシグナルを図3に示す。

【0115】

His-NRGN組み換えタンパク質の生産。ヒトNRGN cDNAクローンは、Origene(Cat.No.RC201209)から購入した。制限酵素(SgfI+MluI)フラグメントスワッピングにより、DESTINEXベクター(Origene,pEX-N-His,Cat.No.PS100030)にコーディング配列をクローン化して、pEX-N-His-NRGN発現プラスミドを作製した。コーディ

50

ング配列およびリーディングフレームを、DNAシーケンシングにより確認した。

【0116】

pEX-N-His-NRGNプラスミドを、Rosetta 2 (DE3) コンピテント細胞 (Novagen #71397) に、メーカーの説明書に従って形質転換した。細菌を、Overnight Express Instant TB培地 (Novagen #71491) 中で、37 で16~18時間培養してから採集して、TENバッファー (50 mM Tris、pH 8.0、0.5 mM EDTAおよび0.5 M NaCl) 中に懸濁した。1% NP-40、25 mg リゾチームおよびコンブリートプロテアーゼインヒビター (Roche) を添加して30分間氷上に置いて細胞を溶解し、それから1回凍結融解した。溶解物を遠心分離により浄化して、それから、Ni-NTAアガロースビーズ (Qiagen) を上清に添加し、4 で1時間回転させた。洗浄バッファー (20 mM イミダゾール、20 mM KClおよび0.5 M NaCl) でビーズを3回洗浄した。溶出バッファー (100 mM イミダゾール、20 mM K_3PO_4 および167 mM NaCl) 中で、4 で10分間ビーズを回転させて、組み換えタンパク質をビーズから溶出させた。溶出タンパク質を3 LのPBSに対して一晚透析し、従来のタンパク質アッセイによりタンパク質濃度を決定した。図4は、クーマシー染色後のPAGEゲル上の典型的なHis-NRGNを示し; His-NRGNの予測分子量は8.5 kDである。

10

【0117】

ニューログラニンのモノクローナルの開発。 ジョンズ・ホプキンスにて、上述の組み換えニューログラニンを用いて、モノクローナル抗体生産のためにマウスを免疫化した。30のクローンをスクリーニングして、図5に示すダイレクトELISAにおいて高希釈でニューログラニンに結合するクローン30.5.2を同定した。

20

【0118】

ニューログラニンに関するサンドイッチELISAの開発。 75 ng / ウェルの濃度でのニューログラニン抗-ヒトモノクローナル抗体 (ジョンズ・ホプキンス) を捕捉抗体として用い、0.5 μ g / mlの濃度でのニューログラニンに対するウサギポリクローナル (ジョンズ・ホプキンス) を検出として用いた。1 μ g / mlの濃度でのSULFO-TAG抗ウサギ抗体 (MSD Cat # R32AB-1) を、1 μ g / mlの濃度でラベル化レポーターとして用いた。GST-NRGN組み換えタンパク質 (ジョンズ・ホプキンス) を、20 ng / mlの開始濃度で、その後、PBS / 1% BSA中での7倍希釈のために1:2で、スタンダードして用いた。PBS / 1% BSAをブランクとして用いた。このアッセイに関する検量線を図6に示す。

30

【0119】

ニューログラニンは急性脳損傷のバイオマーカーである。 心肺機能不全のための27日間のECMOサポートでの幼児由来の血清サンプルで、上述のニューログラニンサンドイッチアッセイを用いた。幼児は、通常の毎日の頭部超音波 (normal daily head ultrasound) を受けて、死亡時には脳損傷を有していないと考えられた。検死解剖において、脳は、超音波では診断されなかった多発性皮質梗塞を有した。図8に示すように、ECMOサポートの全コースの間、GFAPレベルは変化しなかった。しかしながら、ニューログラニンレベルは、ECMOサポートの14日にわたって、ベースラインを越えて15倍のピークまで増加した。ニューログラニンは灰白質であるので、神経マーカーは、白質損傷のマーカーGFAPよりも、皮質性灰白質損傷に感受性であった。これは、ニューログラニンは急性皮質性脳損傷の循環バイオマーカーであって、GFAPと組み合わせて、脳に対する灰白質損傷から白質を区別することが可能であるという証拠を提供する。

40

【0120】

(実施例2) 脳タンパク質を同定するためのプロテオミクス研究は、鎌状赤血球症を有する子供におけるニューログラニンの上昇を明らかにする。

無症候性脳梗塞 (SCI) は、鎌状赤血球症での神経性損傷の最も一般的な形態である

50

。それは、低下した神経認知機能、および、脳卒中および新規または進行性の病変を含む進行性の損傷に関する増加したリスクと関連する。S C Iは、多重T2 - 強調型の磁気共鳴画像(M R I)上に見ることのできる任意の虚血性病変と定義され、局所神経障害を示唆する歴史または物理的試験と関連しない。これまでに、S C Iに関する非侵襲的で不偏の実験室試験は存在せず、S C Iの危険性がある、S C Dを有する子供を同定する能力は制限されたままである。さらに、S C Iの診断はサーベイランスM R Iで行われ、コストがかかり、多くの機関で日常的には行われぬ。結果として、患者はしばしばS C I関連の障害を経験した後に診断される。

【0121】

S C Iのバイオマーカーとして使用できる血漿脳タンパク質の同定は、S C Dを有する子供に関する検出および治療において重要な進歩を提供する。特に、これらの潜在的バイオマーカーは、S C Iの危険性がある子供の同定に役立ち、早期診断のためにM R Iに対する費用効果的な代替を提供し、治療に対する反応のモニタリングを可能にする。重要なことには、S C Iのバイオマーカーは、疾患に關与する病理学的メカニズムに対する識見を与える。質量分析(M S)に基づくプロテオミクス方法は、これらの潜在的バイオマーカーの同定、定量化および特性化に関するプラットフォームを提供する。

【0122】

実際に、プロテオミクスは脳腫瘍、アルツハイマー病、外傷性脳損傷、および脳卒中を含む多くの病状における脳タンパク質のバイオマーカー発見のために用いられている。また、質量分析に基づく方法は、S C Dの病態生理学に対する識見を得るために用いられている。しかしながら、S C Dにおける臨床バイオマーカー発見のために血漿プロテオミクスを用いた研究はほとんどなく、S C Dおよび無症状の脳損傷に関して公表されたものはない。K a k h n i a s h v i l iらは、二次元蛍光ディフアレンスゲル電気泳動(2 D D I G E)およびタンデムM S(L C - M S / M S)を用いて赤血球(R B C)膜プロテオームにおける量的変化を評価して、酸化ストレス後の修復に關与するタンパク質の増加について報告した。他は、表面エンハンス型レーザー脱離/イオン化飛行時間(S E L D I - T O F)およびマトリクス支援レーザー脱離/イオン化(M A L D I) - T O F M Sを用いて、肺高血圧症およびS C Dでの急性の痛みの発症のバイオマーカーに関して評価した。本研究の目的は、プロテオミクスを用いて、S C Dを有する子供における血漿脳タンパク質を同定および確認することであった。本発明者らは、S C DおよびS C Iを有する子供が、脳損傷に関するサロゲートマーカーとして使用でき、疾患の病態生理学に対して識見を与える、循環する血漿脳タンパク質を有すると仮定した。

【0123】

材料および方法

試験集団。試験集団は、3つのグループ：S C DおよびS C Iを有する子供、S C Dを有しS C Iを有さない子供、および、S C DまたはS C Iを有さない健常で同年齢のコントロールから構成された。S C DおよびS C Iを有する7人の子供、および、S C Iに關する危険因子の現在の知識に基づくW B C、年齢およびヘモグロビンが合致した、S C Dを有するがS C Iを有さない6人の子供由来の血清を用いて、ならびに、6人の同年齢のアフリカ系アメリカ人コントロール(3人が鎌状赤血球形質[S C T]を有する)について、プロテオミクス分析を行なった。S C Dを有する合計115人の子供たち(64人がS C Iを有し、51人がS C Iを有さない)、および、46人の同年齢のアフリカ系アメリカ人コントロール由来の横断的な血漿サンプルを用いて、同定タンパク質の血漿濃度を測定した。

【0124】

S C Dを有する子供由来の血漿を、S i l e n t I n f a r c t T r a n s f u s i o n(S I T)試験(C l i n i c a l T r i a l s . g o v i d e n t i f i e r N C T 0 0 0 7 2 7 6 1)に登録されたものからランダムに抽出した。S I T試験は、慢性の輸血が、5~14才のS C Dを有する子供において、脳卒中へのS C Iの進行を効果的に防ぐことができるかどうか決定するための、多施設での国際的な臨床試験である。

急性または慢性の疾患（喘息、行動/気分障害、および肥満を除く）の証拠を有さない健康コントロールに関する血漿サンプルおよび臨床データを、2つの別々の治験審査委員会承認した試験により得た。

【0125】

サンプル調製。 SCDを有する子供に由来するベースラインの定常状態の末梢全血を、初期スクリーニング時に、EDTAバキュテナチューブ（BD, Franklin Lakes, NJ）内に採取し、室温で24時間以内に、ジョンズ・ホプキンスのSIT Trial Biologic Repositoryへ輸送した。到着時に、サンプルはプロトコルにより1500gで8分間回転された；血漿を取り除いて、分析まで-80で保管した。プロテオミクス分析に関して用いられる非SCDコントロールのための定常状態の末梢全血を、EDTAバキュテナチューブ内に採取して、1500g（4）で12分間遠心分離して、それから分取して-80で保管した。タンパク質候補を測定するために使用する健康コントロールのための血漿サンプルもまた、EDTAバキュテナチューブ内にアリコートして、SIT試験プロトコルに従って処理した。

10

【0126】

ヘモグロビンの欠乏。 かなりの溶血が、SCDサンプルの発見において観察された。低含量のタンパク質を富化するために、ニッケル-ニトリロ三酢酸（Ni-NTA）ビーズ（Qiagen）を用いて、SCD血漿サンプル（n=15）からヘモグロビンを欠乏させた。手短には、Ni-NTAビーズをPBS/0.3M NaClで洗浄した後、500μlの50%ニッケルビーズ（250μlのPBS/0.3M NaCl中、250μlのビーズ）に500μlの血漿を添加して、4で20分間回転させた。インキュベーションに続いて、遠心分離によりヘモグロビン欠乏サンプルからビーズを分離した。コントロールサンプルは、この欠乏ステップを行なわなかった。

20

【0127】

タンパク質の定量化。 クーマシーブルー色素タンパク質アッセイ（BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA）を、タンパク質の定量化のために用いた。

【0128】

タンパク質の富化および精製。 ProteomeLab（商標）IgY-12 LC10カラムキット（Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA）を用いて、12種の豊富な血漿タンパク質（アルブミン、IgG、フィブリノゲン、トランスフェリン、IgA、IgM、HDL、アポA-IおよびアポA-II、ハプトグロビン、1-アンチトリプシン、1-酸糖タンパク質および2-マクログロブリン）の二次元分離および免疫親和性の喪失を、メーカーのプロトコルに従って行なった。PF 2Dプラットフォーム（Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA）上で行われた400μgの富化プロテオームの三次元分離を、PS-HPRP 2D（4.6×33mm）カラム（Beckman-Coulter, Inc.）を用いて行なった。溶媒Aは水中0.1%のTFAであり、溶媒Bはアセトニトリル中0.08%のTFAであった。グラジエントは、1分で5~15% B、2分で15%~25%、2分で25~31%、10分で31~41%、6分で41~47%、4分で47~67%、最後に3分で100% Bまで、1分間維持して、1分で5%まで戻して、流速1mL/分で行なった。結果として生じた39のRP-HPLC画分を、画分コレクターおよび96ウェルプレートを用いて得た。speedvacシステムを用いて分画タンパク質を乾燥させて、MS/MS分析のためにトリプシン（Promega, Madison, WI）で消化した。

30

40

【0129】

タンパク質同定のためのMS分析。 以前に記載のように、オンラインnano-HPLC（Agilent technologies, 1200 Series, Wilmington, DE）を備えたLTQ-Orbitrapハイブリッド質量分析計（ThermoFisher, San Jose, CA）上で、タンデム（LC-MS/MS）の

50

実験を行なった。LTQの生データを、非冗長のInternational Protein Index (IPI) ペプチドデータベース(ヒト, 3.19)の、X!タンデムサーチ(www.thegpm.org; version 2008.12.01)でPASS(Integrated Analysis, Bethesda, MD)を用いて解析した。ペプチドの同定は、35より大きなMowseスコアに基づく確率論により、95%より高い確率で実証でき、少なくとも2つのユニークな平均の同定スペクトルを含んだ場合に、承認された($p < 0.05$)。ペプチドの荷電状態における変化は、ユニークな同定とみなさなかつた。CD-HITで90%配列相同性によりデータセットをフィルターした。

【0130】

タンパク質、遺伝子、機能および臨床の関連性を、GeneCards(<http://www.genecards.org/index.shtml>)、国立生物工学情報センター(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed>)およびOnline Mendelian Inheritance in Man(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>)を用いて調査し、検証した。Protein Atlas、Genenote、GenBank、UniGeneおよびSwissProtデータベースを再検討して、脳内で発現が増加したタンパク質を同定した。脳タンパク質の合成リストを作成し利用してMSデータをフィルターし、SCDを有するおよび有さない子供での脳タンパク質を同定した。

10

20

【0131】

タンパク質は、ヒトの脳、肝臓、および、利用可能なマイクロアレイ、発現配列タグ(EST)および遺伝子発現の逐次分析法(SAGE)データにより評価された26の他の正常ヒト組織での転写のそれらの相対的発現に基づいて、脳組織の特異性スコアが与えられた。具体的には、それぞれのタンパク質を、以下の基準に従ってスコアを付けた: マイクロアレイデータは、ベースラインを越えて10倍より高い発現の増加を示し、ESTおよびSAGEデータは、2未満の他の組織での、そのタンパク質の存在を示す。タンパク質は、それぞれのカテゴリーに関して1または0のいずれかのスコアが付けられ、タンパク質が、マイクロアレイデータによって10倍より高い発現の増加を有し、ESTおよびSAGEによって2未満の組織で見られた場合に、最大スコアの3を割り当てた。

30

【0132】

ニューログラニンは、組織特異性を示し(脳組織特異性スコア=3)、以前に脳損傷に関与し、同定された全脳タンパク質のうち最も高い全スペクトル数を有したので、検証に選択した。

【0133】

Ingenuityパスウェイ分析。Ingenuityパスウェイ分析プログラム(<http://www.ingenuity.com>)を用いて、MSにより同定された存在度変化を有するタンパク質のパスウェイネットワークを解析した。タンパク質のアクセッションナンバーは、データを使用してIngenuityパスウェイデータベースをナビゲートしてタンパク質間のネットワークを抽出するIngenuityソフトウェア内に、Excelスプレッドシートファイルとしてアップロードされた。2よりも良好なスコアは、通常、有効なネットワークと考えられる。

40

【0134】

イムノアッセイのプロトコルの開発。電気化学発光サンドイッチイムノアッセイが、MesoScale Discoveryプラットフォーム(MesoScale Discovery, Gaithersburg, MD)を用いてニューログラニンを測定するために開発された。実施例1に記載のモノクローナル抗-Nrgnを、捕捉抗体(ab)に用いた。ポリクローナル抗-Nrgn(Covance, Berkeley, CA)と抗-種Sulfo-Tag(MesoScale Discovery)の混合物を、検出に用いた。検量線は、1%ウシ血清アルブミン(SeraCare Life Sci

50

ences, Milford, MA) 中の精製ニューログラニンの段階希釈 40 ng/ml ~ 0.055 ng/ml により作製した。ニューログラニンを混ぜた血漿は、ウシ血清アルブミンで作成された検量線と比較して、10 ng/mL で平均 99% の回収を示す。変動係数の 20% を超えない計算濃度での最低希釈として定義される定量化の下限は 0.2 ng/mL であった。アッセイの特異性は、GFAP 抗体を用いて試験した。

【0135】

最終のニューログラニンアッセイのプロトコル。 標準的な結合プレート (Mesoscale Discovery) を、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 1:1000 に希釈した 30 µl のモノクローナル抗-Nrgn プールでコーティングした。プレートを一晩インキュベートしてから、各ウェルを 5% BSA/PBS でブロックして、室温で 1 時間、振とう (600 rpm) しながらインキュベートした。40 ng/ml のスタート濃度から、精製ニューログラニンを 1% BSA/PBS で 1:3 に希釈した。1% BSA/PBS を用いて血漿サンプルを 1:1 に希釈してから、25 µl のスタンダードおよび希釈サンプルをデュプリケートでプレートに加えた。振とうしながら 2 時間インキュベーション後、BioTek (Winooski, VT) 自動プレート洗浄機を用いて、0.5% Tween-80 を含む PBS (洗浄バッファー) 300 µl/ウェルでプレートを 3 回洗浄した。ポリクローナル抗-Nrgn および抗-種 Sulfo-Tag を 1% BSA/PBS で 1:1000 に希釈して、1 µg/mL の最終濃度を得た。続けて、25 µl を各ウェルに添加し、各プレートを、3 回洗浄する前に、振とうしながら 1 時間インキュベートした。それからプレートを Sector Imager 2400 (Mesoscale Discovery) で読み取った。

【0136】

組み換えニューログラニタンパク質の生産。 ニューログラニン cDNA を細菌発現ベクター内にクローニングして組み換えタンパク質を発現させるために、PCR クローニングストラテジーを用いた。ヒトニューログラニン cDNA 配列に基づいてプライマーを設計し、SgfI (フォワードプライマーでの) および MluI (リバースプライマーでの) 切断部位をそれぞれプライマー内に導入して、正しいリーディングフレームおよびクローニングの便宜を確保した。プライマーのための配列は: フォワード 5' - GAGGCGATCGCCATGGACTGCTGCACCGAGAAC - 3' (配列番号 9) およびリバース 5' - GCGACGCGTCTAGTCTCCGCTGGGGCCGC - 3' (配列番号 10) である。PCR 増幅のためのテンプレートとしてヒトニューログラニン cDNA (Origene, RC201209) を用いた。PCR 産物を SgfI および MluI で消化してゲル精製し、予め消化したベクター pEX-N-His-GST (Origene, PS100028) および pEX-N-His (Origene, PS100029) のそれぞれにライゲーションした。DH5 コンピテント細胞 (Invitrogen, 18265017) を形質転換およびプラスミド DNA 増殖に用いた。ポジティブクローンを制限酵素消化分析により同定し、DNA シーケンシングによりさらに確認した。それから、正しいニューログラニン cDNA を含む適正なプラスミドを用いて、タンパク質発現のために Rosetta (Novagen) 株を形質転換した。シングルポジティブの Rosetta クローンを、Overnight Express Inst ant TB 培地 (Novagen, #71491) で 37 °C にて一晩培養した。Ni-NTA Superflow カラム (Qiagen, #30622) を用いて His-Nrgn タンパク質を精製し、グルタチオンスピンカラム (Pierce, #16104) を用いて His-GST-Nrgn タンパク質を精製した; 全ての精製方法はメーカーの説明書に従った。組み換えタンパク質のサンプルを SDS-PAGE に供し、クーマシー染色により可視化した; それから、タンパク質バンドを単離して、消化して質量分析により確認した。

【0137】

モノクローナル抗体の生産。 マウス抗-Nrgn モノクローナル抗体は、ジョンズ・ホプキンス大学の神経科学科の Monoclonal Antibody Core Fa

c i l i t y (M A C F) で生産した。手短には、5匹の6週齢BALB/c雌マウス(Charles River, Wilmington, MA)を100ugのHis-Nrgnの腹腔内注射で免疫化して、同一経路で21日にブーストした。それから、不完全フロイントアジュバント中の50μgのHis-Nrgnでマウスを2回皮下注射した。3回目の免疫化の後10日に血液を採取した。His-GST-Nrgnタンパク質を標的タンパク質として用いてダイレクトELISAにより血清を試験した。ELISAにおいて最も高い力価を有するマウスを、最後の静脈内ブーストに選択した。89日にマウスを屠殺し、融合プロセスのために脾臓を取り出した。

【0138】

ポリエチレングリコール(MW1500, Sigma)を用いて、P3x653.Ag8マウス骨髄腫細胞を免疫化マウス由来の脾臓細胞と融合した。0.5mlの不完全フロイントアジュバントで4日早く腹腔内に初回刺激を受けた正常BALA/cマウスの腹膜から採取されたフィーダー細胞を含む96ウェル組織培養プレート中に、融合細胞を散布した。選択培地(20%FCS(Hyclone)を含むDMEM、補充の1xOPI(Sigma)、100μMヒポキサンチン、0.4μMアミノプテリンおよび160μMチミジン)での10日の静置培養後、上述のようにELISAで上清を試験した。フィーダー細胞としての正常BALA/cマウス由来の脾細胞上で、限界希釈によりポジティブコロニーを2回クローン化した。

10

【0139】

1xOPIで補充された、10%の定義済みFCS(Hyclone)を含むDMEM中で、クローン化ハイブリドーマ株(30.5.2)を4~6日間増殖した。それから、ハイブリドーマ細胞を血清フリー培地での増殖に適応させて、インビトロ系での抗体産生を可能にした。細胞が対数増殖期の時、 2×10^7 細胞をインビトロ系に植え付けた。培養上清(抗体)を5日ごとに回収した。

20

【0140】

統計。グループ間の臨床特性における違いを、不等分散での両側t-検定を用いて評価した。ニューログラニンに関するグループ間の違いを、ノンパラメトリックなマンホイットニーのU検定を用いて比較した。クラスカル・ワリス検定を用いて、3グループ:SCIを有するSCD、SCIを有さないSCD、および健常コントロールにわたる血漿レベルの中央値を比較した。ニューログラニン濃度および他の変数間の相関を、ピアソンにより評価した。解析において、P値<0.05を統計的に有意とした。統計解析はStat version 11.0(StataCorp.College Station, TX)を用いて行なった。

30

【0141】

結果

SCDを有する子供およびコントロールのベースライン特性。予想どおり、プロテオミクス解析に用いられた血漿サンプルの比較は、SCDを有する子供(n=15)が、健常の非SCD対照(n=6)と比較して有意に低いベースラインhbおよびヘマトクリット(hct)値を有することを示した(表1)。

【0142】

40

【表 2】

表 1 : SCDを有する子供および健常な非SCDコントロールの臨床特性

	SCD (n=15)	非SCD (n=6)
% SCT (n)	---	50 (3)
% 男性 (n)	67 (10)	50 (3)
年齢	9.4 (2.7)	11.5 (2.1)
Retic (%) ^A	9.5 (2.7)	0.9 (0.3)
Hb (g/dL) ^A	8.5 (0.8)	12.3 (0.9)
Hct (%) ^A	23.9 (2)	37 (2.5)
WBC (x10 ⁹ /L) ^A	14.9 (5.5)	5.5 (1.4)
Plt (x10 ⁹ /L) ^A	463 (126)	330 (19)

結果は平均±標準偏差を示す。SCT、鎌状赤血球形質、Retic、網状赤血球；Hb、ヘモグロビン；Hct、ヘマトクリット；WBC、白血球数；Plt、血小板。^AP<0.05（スチューデントt-検定によるグループ間）。

【0143】

WBCおよび網状赤血球数は、SCDを有する子供において、有意に、より高かった。表2は、プロテオミクス分析（n=7 SCI、n=8 非SCI）およびニューログラニンの定量（n=65 SCI、n=51 非SCI）に用いられた、SCIを有する、および有さない、SCDの子供に関するベースライン人口統計の情報を示す。ベースラインhb、WBC、血小板または網状赤血球数に有意差は無かった。SCIを有する患者は、SCIを有さないSCDの子供と比較して、より高いレベルの総ビリルビンを有した。

【0144】

【表 3】

表 2 : SCDを有する子供の臨床特性

	プロテオミクス解析に関して (n=15)		タンパク質量に関して (n=115)	
	SCI (n=7)	非SCI (n=8)	SCI (n=65)	非SCI (n=51)
% 男性 (n)	71 (5)	63 (5)	53 (34)	41 (21)
年齢	9.8 (2.4)	9 (3.1)	9.8 (3.1)	8.9 (2.9)
Retic (%)	11 (2.10)	8.2 (2.6)	11 (4.8)	10.6 (3.8)
Hb (g/dL)	8.3 (0.89)	8.6 (0.7)	8.3 (1.1)	8.6 (1.2)
Hct (%)	23.3 (2.3)	24 (1.8)	23.6 (3.5)	24.5 (3.6)
WBC (x10 ⁹ /L)	15.8 (7.5)	14.1 (3.1)	12.1 (4.6)	13.4 (10.1)
Plt (x10 ⁹ /L)	410 (79)	510 (145)	453 (143)	435 (164)
TBili ^A	5.6 (3.4)	2.7 (0.9)	3.7 (2.4)	2.9 (1.6)

結果は平均（±標準偏差）（SD）を示す。Retic、網状赤血球；Hb、ヘモグロビン；Hct、ヘマトクリット；WBC、白血球数；Plt、血小板；TotBili、総ビリルビン。^AP<0.05（スチューデントt-検定によるグループ間）。

【0145】

SCDを有する子供の血漿プロテオーム特性。Hb除去、イムノアフィニティー分画、およびHPLC分離の3連続の分離ステップを用いて、その後タンデムMSおよびIPIペプチドデータベースのX!タンデムサーチをして、SCIグループにおいて752のタンパク質を同定し、さらに390のタンパク質を非SCIグループにおいて同定し、SCDを有する子供の血漿プロテオーム内を循環する合計1162の固有タンパク質を同定した。健常コントロールにおいてさらに239のタンパク質を同定した（n=639 非SCDの子供での総タンパク質）。SCDを有する子供において同定されたタンパク質の

30% (343 / 1162) が S C I グループにおいて見られ、非 S C D グループでは見られなかった。

【0146】

i n g e n u i t y パスウェイソフトウェアを用いた解析は、S C D および正常コントロールの両方で同定されたタンパク質が、多くの生物学的機能およびパスウェイ (細胞間シグナリングと細胞死、免疫細胞トラフィックおよび急性相反応シグナリングを含む) の顕著な過剰提示を示すことを明らかにした。神経疾患は S C I および正常のグループでのトップ5の疾患にランクされたが、非 S C I グループではそうではなかった。さらなる解析により、S C I グループのパスウェイに關与するタンパク質は、鎌状赤血球症、すなわち、虚血 - 再灌流障害、内皮障害、および、神経の損傷と死にすでに關与している、より特有の疾患過程に關与することが明らかになった。さらに、S C D および S C I を有する子供では、神経性疾患に關連する特有の状態が正常コントロールとは異なり、タウオパシー (微小管結合タンパク質 t a u、グリア線維酸性タンパク質) および脳アミロイド血管症 (シスタチン C、ピメンチン) と關連するタンパク質は S C I グループのみで見られた。加えて、神経突起の喪失は S C I および正常グループの両方で見られたが、S C I グループのみが軸索の喪失と關係するタンパク質 (微小管結合タンパク質 t a u) を有し、細胞死に加えて神経損傷を示している。

10

【0147】

脳タンパク質の同定。脳内でのタンパク質発現が増加したタンパク質のリストに対して M S データをフィルターして、S C D を有する子供において見られる脳タンパク質の合成リストを作成した。この方法論を用いて、S C D を有する子供において合計 27 の脳タンパク質を同定した (データ示さず)。これらのタンパク質のいずれも、非 S C D コントロールにおいては同定されなかった。同定された脳タンパク質のうち、ニューログラニンは 10 倍より高く脳での発現が増加していて、E S T および S A G E では 2 未満の組織で発見された。それはまた、最も高い信頼性スコアおよび全スペクトル数を有した。

20

【0148】

子供における血漿ニューログラニンレベル。シナプスの発達およびリモデリングに關与しているカルシウム感受性カルモジュリン結合性ニューロン特異的タンパク質であるニューログラニンは、S C I を有する、および有さない、S C D の子供において見出された。図 9 A に示すように、血漿ニューログラニンレベルの中央値は、非 S C D コントロール (0.12 μ g / ml) に比べて、S C D を有する子供において、有意に、より高かった (0.72 μ g / ml) (P < .001)。S C D を有する子供のうち、63% の S C I (40 / 64) および非 S C I (32 / 51) の子供が、非 S C D の値に關して 95th パーセンタイルよりも上の、ニューログラニン値の中央値を有した (図 9 B)。S C I (0.69 μ g) と非 S C I グループ (0.73) との間に、ニューログラニンレベルの中央値における違いは無かった (P = 0.6、データ示さず)。ニューログラニンは、S C I に關する公知の危険因子、例えば h b、h c t、W B C、血小板、および網状赤血球数、収縮期血圧および h b F のパーセントと相關しなかった。

30

【0149】

考察

S C D における無症状の脳損傷のバイオマーカーは、診断および分子標的治療の開発補助に必要であり、ならびに、疾患の反応をモニターするために必要である。プロテオミクスは、血漿のような複雑な混合物中のこれらの生化学的マーカーを発見する機会を提供する。しかしながら、S C D を有する子供における脳バイオマーカーの発見に關して実証された方法論は、以前に報告がされたことがない。プロテオミクスに基づく方法を用いて、S C D および S C I を有する子供が、無症状の脳損傷と關連する、血漿プロテオームを循環する脳タンパク質を有するという仮説を試験した。一連の欠乏ステップのワークフローを用いて、続いて R P - H P L C による分画および L T Q - O r b i t r a p 質量分析計上でのラベルフリー定量化をして、1162 のタンパク質を同定して S C D を有する子供に特徴付けて、そのうち 27 が脳内での高発現を有することが分かった。ニューログラニ

40

50

ンを測定するために開発されたイムノアッセイを用いて、実験的な方法を検証した。

【0150】

SCDを有する子供および同年齢の非SCDコントロールにおいてニューログラニンを測定して、SCDを有する子供は、有意に、より高い血漿レベルのニューログラニンを有することを見出した。実際に、60%を超える、SCIを有するおよび有さないSCDの子供は、非SCDコントロールにおいて観察されたニューログラニン値の95thパーセンタイルよりも高いニューログラニン値を有した。ニューログラニンは、SCDを有する子供において研究されたことはこれまでにない。実際に、これまでの研究は、神経分裂病およびアルツハイマー病を有する大人で主にされており、ニューログラニンは学習および記憶における障害に関連付けられていた。SCDを有する子供における学力および記憶の神経認知障害がよく立証されている。兄弟姉妹および同年齢の同輩と比較すると、脳卒中を有するSCDの学齢児童は、より多くの神経心理学的障害を有するようだったが、障害は、臨床的に軽度の疾患を有する患者でも見られた。SCDを有する子供における増加したニューログラニンのこれらの知見は、IQにより測定されるように、これらの患者で見られる神経認知機能障害の病因と関連があり得る。既存の治療、例えば輸血およびヒドロキシ尿素が、ニューログラニンのレベルを調節するかどうか評価するためのさらなる研究は有益であり、そして、これらの治療が脳機能の維持を助けることができるか、または、もしかすると任意の機能喪失を覆しさえすることができるかどうか評価するための、測定可能な方法を提供し得る。

10

【0151】

加えて、パスウェイ分析による結果は、SCDを有する子供は神経損傷および細胞死の危険性があることを裏付け、そして、タウオパシーおよび軸索喪失を含む損傷に関する特有のメカニズムを示唆する。分析は、脳卒中の公知のバイオマーカーである細胞内中間体線維タンパク質、グリア線維酸性タンパク質(GFAP)が、SCDおよびSCIを有する子供でのタウオパシーと関連することを示唆した。本発明者らは、GFAPが、健常コントロールと比べてSCDを有する患者において増加し、無症候性脳梗塞を含む虚血脳損傷と関連することを以前に示した。

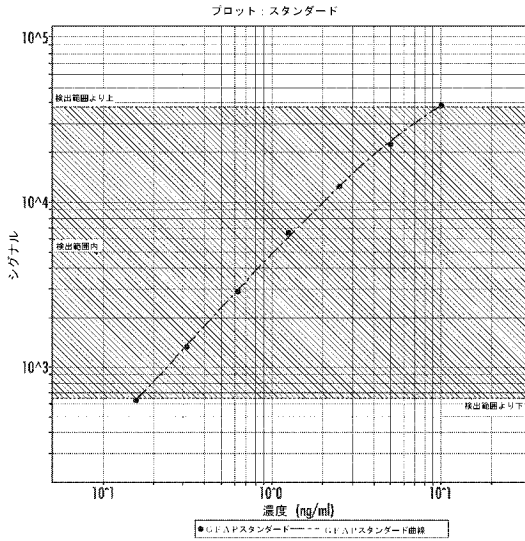
20

【0152】

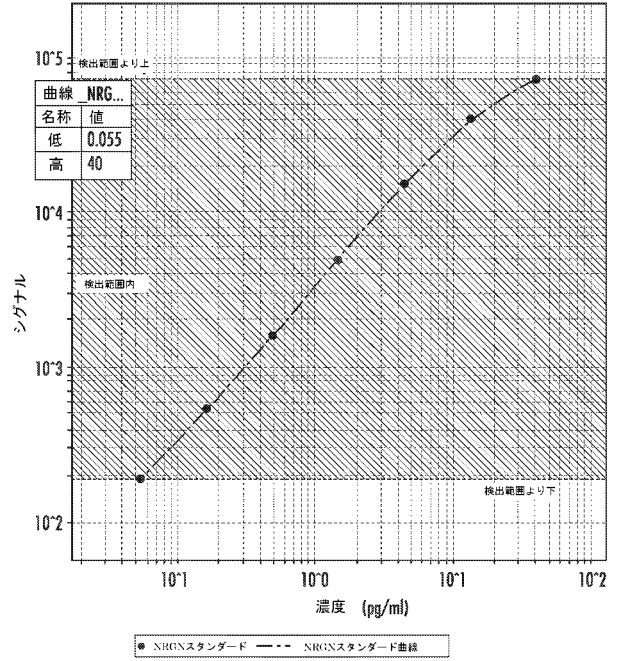
要するに、本発明者らは、SCDを有する子供における、脳バイオマーカーの発見に関するプロテオミクスのワークフローを開発して検証した。本発明者らは、同年齢の非SCDコントロールと比較して、SCDを有する子供におけるニューログラニンの有意な増加を最初に報告し、そして、無症状の脳損傷の病態生理学に対するさらなる識見を提供する。まとめると、これらの知見は、SCDおよびSCIを有する子供におけるバイオマーカーの発見のための臨床検査をサポートし、治療薬発見のための新規の潜在的な標的を提供する。

30

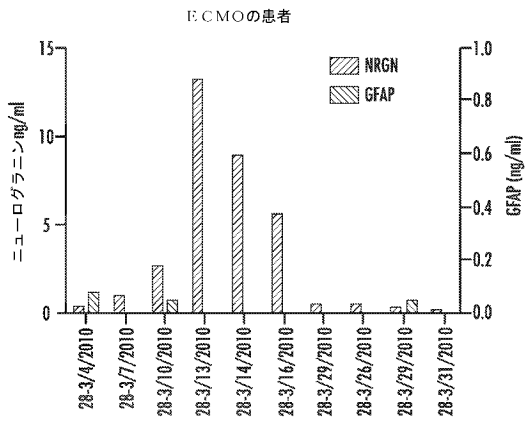
【 図 5 】



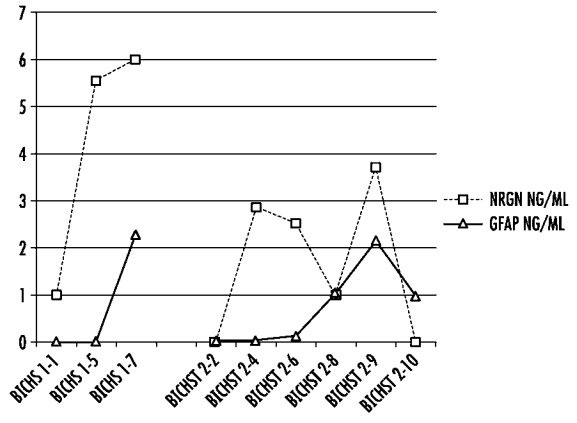
【 図 6 】



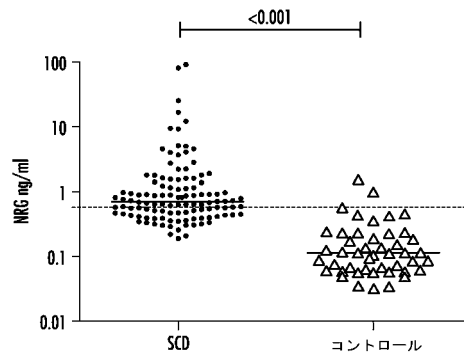
【 図 7 】



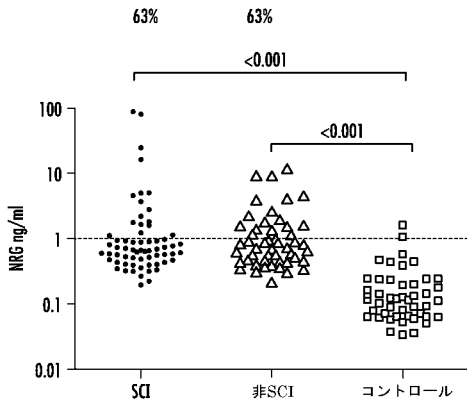
【 図 8 】



【 図 9 A 】





【 図 9 B 】



【 配列表 】

201451862400001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2012/037774
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C07K 16/18(2006.01)i, G01N 33/53(2006.01)i, G01N 33/532(2006.01)i, C12N 5/12(2006.01)i, C12N 15/63(2006.01)i</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) C07K 16/18; C07H 19/10; G01N 33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models 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) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: neurogranin, antibody, aptamer, detection		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PAK, J. et al, 'Involvement of neurogranin in the modulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, synaptic plasticity, and spatial learning: a study with knockout mice' Proc. Natl. Acad. Sci. USA, October 10 2000, Vol. 97, NO. 21, Pages 11232-11237.	1-17
A	See the experimental procedures.	20-27,45
Y	NCBI GeneBank Accession No. NP_006167 (January 14 2011).	20-27,45
A	See the whole document.	1-17
Y	TOK, J. and FISCHER, N. 'Single microbead SELEX for efficient ssDNA aptamer generation against botulinum neurotoxin' Chem. Commun. March 18 2008, Pages 1883-1885.	20-27
A	See the figure 1 and notes and references.	1-17,45
Y	WO 2009-143519 A2 (VAN EYK, J. et al.) November 26 2009.	45
A	See the table 13 and page 52.	1-17,20-27
<input 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: "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 25 JANUARY 2013 (25.01.2013)		Date of mailing of the international search report 30 JANUARY 2013 (30.01.2013)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Kim, Jeong-Ah Telephone No. 82-42-481-8747 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/037774

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

a. a sequence listing filed or furnished

- on paper
 in electronic form

b. time of filing or furnishing

- contained in the international application as filed
 filed together with the international application in electronic form
 furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/037774

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.: 43-44
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 43-44 pertain to a method for diagnosing a disease or disorder associated with neurogranin in a subject, thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
2. Claims Nos.: 18-19,29-33,38,41-42,44
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:
Continued on Supplemental Box
3. Claims Nos.: 28,34-37,39-40,43
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 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.:

- 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/US2012/037774

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2009-143519 A2	26. 11. 2009	EP 2294425 A2 US 2012-009174 A1 WO 2009-143519 A3	16. 03. 2011 12. 01. 2012 18. 03. 2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2012/037774

Continuation of: Box No. II-2

1. Claims 18–19 are directed to an antibody characterized by house name (i.e. 30.5.2) which is unclear, because said claims do not contain all the technical features of said antibody (PCT Article 3, Rule 6.3(b)).
2. Claims 29, 38, 41, 44 are too unclear because they refer to the dependent claims (28, 37, 43) which are not drafted in accordance with the second and/or third sentence of Rule 6.4(a).
3. Claims 30–33, 42 are too unclear because they refer to the dependent claim (29, 30, 31 or 38) which is unclear.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 N 15/115 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 H	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/543 5 9 7	
G 0 1 N 27/62 (2006.01)	G 0 1 N 27/62 V	
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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), 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, R S, 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, I D, 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, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(72) 発明者 エヴェレット アレン デイル
 アメリカ合衆国 2 1 7 3 8 メリーランド州 グレンウッド カッタール クリーク ドライヴ
 3 5 6 3

(72) 発明者 ヤン ジュン
 アメリカ合衆国 2 1 2 1 2 メリーランド州 ボルティモア ラナーク ロード 7 2 0 9

(72) 発明者 フー ゾンミン
 アメリカ合衆国 2 1 2 2 4 メリーランド州 ボルティモア イースタン アヴェニュー 5 2
 0 0

F ターム(参考) 2G041 CA01 FA12 GA03 GA09 KA01 LA07
 4B024 AA01 AA11 BA44 CA04 CA09 DA06 EA04 HA12
 4B063 QA01 QQ52 QQ79 QR32 QS25 QS32 QS34 QX01 QX02
 4B064 AG27 CA02 CA19 CC24 DA13
 4B065 AA26X AA91Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA46
 4H045 AA11 AA30 BA10 BA70 BA71 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	Neurogranin诊断试剂盒的分析试剂		
公开(公告)号	JP2014518624A	公开(公告)日	2014-08-07
申请号	JP2014510535	申请日	2012-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	约翰霍普金斯大学		
申请(专利权)人(译)	约翰·霍普金斯大学		
[标]发明人	エヴェレットアレンデイル ヤンジユン フーゾンミン		
发明人	エヴェレット アレン デイル ヤン ジュン フー ゾンミン		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/18 C12Q1/68 C12N15/115 G01N33/53 G01N33/543 G01N27/62 C12P21/08		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C07K16/18 C12Q1/68.A C12N15/00. H G01N33/53.D G01N33/543.597 G01N27/62.V C12P21/08		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/FA12 2G041/GA03 2G041/GA09 2G041/KA01 2G041/LA07 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/HA12 4B063/QA01 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QS25 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063 /QX02 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA46 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045 /BA10 4H045/BA70 4H045/BA71 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	61/485375 2011-05-12 US		
其他公开文献	JP2014518624A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及生物标志物领域。更具体地，本发明涉及用于检测神经颗粒素的测定试剂。在一个具体实施方案中，本发明提供了特异性结合神经颗粒素的分离的抗体或其片段。在另一个实施方案中，本发明提供了特异性结合神经颗粒素的多核苷酸适体。

プリカーサー Q1	トランジション Q3	ペプチドID
553.79	366.18	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	423.2	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	684.38	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	741.4	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	798.42	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	895.47	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)
553.79	952.49	GPGPGGPGGAGVAR (配列番号NO:7)