

(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2007-532915

(P2007-532915A)

(43) 公表日 平成19年11月15日(2007.11.15)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 GO 4 1
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 33/53 M	
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
	GO 1 N 27/62 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 84 頁)

(21) 出願番号 特願2007-508545 (P2007-508545)
 (86) (22) 出願日 平成17年4月15日 (2005. 4. 15)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年11月28日 (2006. 11. 28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/012746
 (87) 国際公開番号 W02005/106038
 (87) 国際公開日 平成17年11月10日 (2005. 11. 10)
 (31) 優先権主張番号 60/562, 944
 (32) 優先日 平成16年4月15日 (2004. 4. 15)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

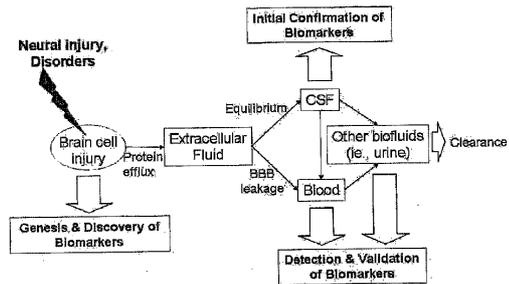
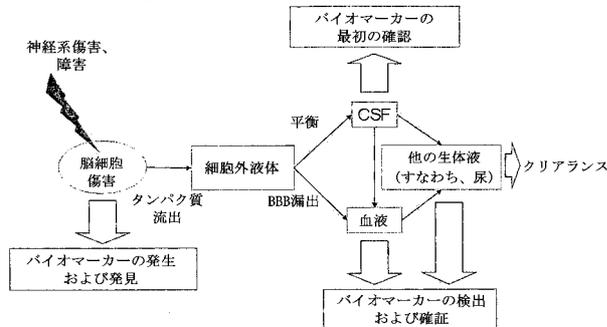
(71) 出願人 500228159
 ユニバーシティ・オブ・フロリダ・リサーチ・ファンデーション・インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国、フロリダ州 3 2 6 1 1、ゲインズビル、グリンター・ホール 2 2 3
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ヘイエス ロナルド
 アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル サウスウェスト 4 5 番 レーン 8 0 3 2

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 神経系傷害および他の神経障害についての生物マーカーとしての神経タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、神経細胞傷害および/またはニューロンの障害の診断に用いられる生物マーカーを同定する。本発明の異なる生物マーカーの検出はまた、神経傷害の重症度の程度、傷害に関与する細胞、および傷害の細胞内局在性の診断に用いられる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の段階を含む神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下から選択される、段階：

軸索タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質、樹状突起タンパク質、細胞体タンパク質、シナプス前性タンパク質、シナプス後性タンパク質、脱髄生物マーカー、グリアタンパク質、神経伝達物質生物マーカー、ドーパミン作動性タンパク質、ノルアドレナリン作動性タンパク質、セロトニン作動性タンパク質、グルタミン酸作動性タンパク質、GABA作動性タンパク質、神経伝達物質受容体、神経伝達物質輸送体、ビメンチン(P31000)、CK-BB(P07335)、14-3-3- (P42655)、MMP2、MMP9、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項 2】

軸索タンパク質が、IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、およびインターネキシンから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

樹状突起タンパク質が、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ビメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、およびコフィリン1、2から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

細胞体タンパク質が、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、およびHNP 22から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

シナプス前性タンパク質が、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、およびアンフィフィシン-2(NP_647477)から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

シナプス後性タンパク質が、SD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMK-IV、SNAP-25、およびa-/b-SNAPから選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

脱髄タンパク質が、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、ならびに乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 8】

グリアタンパク質が、GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P047

10

20

30

40

50

85、ニューロカルシン、およびS100 から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項9】

神経伝達物質が、コリン作動性神経伝達物質、ドーパミン作動性神経伝達物質、ノルアドレナリン作動性神経伝達物質、セロトニン作動性神経伝達物質、グルタミン酸作動性神経伝達物質、およびGABA作動性神経伝達物質から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項10】

神経伝達物質受容体が、NMDA受容体サブユニット、グルタミン酸受容体サブユニット(A-MPA)、カイニン酸受容体、 α -アドレナリン受容体サブタイプ、 β -アドレナリン受容体サブタイプ、GABA受容体、代謝調節型グルタミン酸受容体、5-HTセロトニン受容体、ドーパミン受容体、ムスカリン性Ach受容体、およびニコチン性アセチルコリン受容体から選択される、請求項1記載の方法。

10

【請求項11】

神経伝達物質輸送体が、ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体、小胞アセチルコリン輸送体、およびコリン輸送体から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項12】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーが神経系傷害および/またはニューロンの障害を診断するために用いられる、請求項1記載の方法。

【請求項13】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーが以下を含む、請求項12記載の方法：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

20

【請求項14】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーが神経系傷害および/またはニューロンの障害を診断するために用いられ、該生物マーカーが以下を含む、請求項1記載の方法：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；オレキシン受容体、オレキシン、MBP、MOG、PLP、MAG；シュワン細胞ミエリンタンパク質；ストリアチン、Rhes；Gadd45a；ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；PH8、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、およびピシニン。

30

【請求項15】

生物マーカーが、SCG10、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、H-2Z1、CD15、オレキシン受容体、オレキシン、シュワン細胞ミエリンタンパク質、Rhesタンパク質、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリンのうち任意の1つまたは複数を含む、請求項1記載の方法。

40

【請求項16】

1つまたは複数の生物マーカーの検出が細胞型を区別する、請求項1記載の方法。

【請求項17】

生物マーカーが、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1

50

タンパク質；GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シユワン細胞ミエリタンパク質；ならびにテネインのうち任意の1つまたは複数を含む、請求項16記載の方法。

【請求項18】

1つまたは複数の生物マーカーの検出が細胞内傷害の診断となる、請求項1記載の方法。

【請求項19】

生物マーカーが神経系細胞内タンパク質生物マーカー、軸索タンパク質：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：II-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体、mGluR、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、およびa-/b-SNAP、のうち任意の1つまたは複数を含む、請求項18記載の方法。

10

20

【請求項20】

生物マーカーの複数検出される、請求項1記載の方法。

【請求項21】

生物マーカーの少なくとも2つが検出される、請求項1記載の方法。

30

【請求項22】

生物マーカーの少なくとも3つが検出される、請求項1記載の方法。

【請求項23】

生物マーカーの少なくとも4つが検出される、請求項1記載の方法。

【請求項24】

タンパク質、それらのペプチドまたは誘導体が検出される、請求項1記載の方法。

【請求項25】

少なくとも2つの生物マーカーの任意の組み合わせが神経系傷害および/またはニューロンの障害を診断するために用いられる、請求項1記載の方法。

【請求項26】

マーカーの複数、神経系傷害および/またはニューロンの障害を診断するために組み合わせ用いられる、請求項1記載の方法。

40

【請求項27】

試料が、脳脊髄液、血液、血漿、血清、尿、組織、細胞および器官からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項28】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーが、神経系傷害および/もしくはニューロンの障害に罹りやすい、または罹っている患者からのタンパク質プロファイルと正常な被験体と比較することにより検出される、請求項1記載の方法。

【請求項29】

50

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーがイムノアッセイを用いて検出される、請求項1記載の方法。

【請求項30】

イムノアッセイがELISAである、請求項29記載の方法。

【請求項31】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーがバイオチップアレイを用いて検出される、請求項1記載の方法。

【請求項32】

バイオチップアレイがタンパク質チップアレイである、請求項31記載の方法。

【請求項33】

バイオチップアレイが核酸アレイである、請求項31記載の方法。

【請求項34】

1つまたは複数のマーカーがバイオチップアレイ上に固定化されている、請求項31記載の方法。

【請求項35】

固定化された1つまたは複数のマーカーが、マーカーの分子量を検出するためにレーザーイオン化に供される、請求項34記載の方法。

【請求項36】

1つまたは複数のマーカーの分子量が、総イオン電流に対して標準化されている閾値強度に対して分析される、請求項35記載の方法。

【請求項37】

対数変換が、検出されるマーカーの数を制限するためにピーク強度範囲を縮小させるために用いられる、請求項36記載の方法。

【請求項38】

以下の段階を含む、請求項31記載の方法：

バイオチップアレイ上に固定化された被験体試料に関するデータを、バイオチップをレーザーイオン化に供し、質量/電荷比についてのシグナルの強度を検出することにより発生させる段階；ならびに、

データをコンピュータ読み取り可能な形式へ変換する段階；

ならびに、神経系傷害および/またはニューロンの障害に罹っている患者に存在し、かつ正常な被験体対照において欠けているマーカーを表すシグナルを検出するために、ユーザー入力パラメーターによりデータを分類するアルゴリズムを実行する段階。

【請求項39】

バイオチップアレイの表面が1つまたは複数の抗体を含む、請求項38記載の方法。

【請求項40】

バイオチップアレイの表面が一本鎖または二本鎖核酸を含む、請求項38記載の方法。

【請求項41】

バイオチップアレイの表面がタンパク質、それらのペプチドまたは断片を含む、請求項38記載の方法。

【請求項42】

バイオチップアレイの表面がアミノ酸プローブを含む、請求項38記載の方法。

【請求項43】

バイオチップアレイの表面がファージディスプレイライブラリーを含む、請求項38記載の方法。

【請求項44】

1つまたは複数のマーカーが、以下の段階を含むレーザー脱離/イオン化質量分析法を用いて検出される、請求項38記載の方法：

付着した吸着剤を含む質量分析計による使用に適応したプローブを提供する段階、および；

被験体試料を吸着剤と接触させる段階、および；

10

20

30

40

50

プローブからマーカ―を脱離しかつイオン化し、脱イオン化/イオン化マーカ―を質量分析計で検出する段階。

【請求項 4 5】

レーザー脱離/イオン化質量分析法が以下の段階を含む、請求項44記載の方法：

付着した吸着剤を含む基質を提供する段階；

被験体試料を吸着剤と接触させる段階；

付着した吸着剤を含む質量分析計による使用に適応したプローブ上に基質を置く段階；および、

プローブからマーカ―を脱離しかつイオン化し、脱離/イオン化マーカ―を質量分析計で検出する段階。

10

【請求項 4 6】

吸着剤が、抗体、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、そのペプチドまたは断片である、請求項44記載の方法。

【請求項 4 7】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―を検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカ―の検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカ―が以下の軸索タンパク質から選択される、段階：

20

IIスペクトリン、SPDB、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を考慮する、段階。

【請求項 4 8】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

30

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―を検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカ―の検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカ―がアミロイド前駆体タンパク質、そのペプチドまたは断片である、段階、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を考慮する、段階。

【請求項 4 9】

40

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―を検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカ―の検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカ―の検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカ―が以下の樹状突起タンパク質から選択される、段階：

III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コ

50

フィリン1、2、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項50】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下の細胞体タンパク質から選択される、段階：

UCH-L1(Q00981)-1、グリコゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(P42655)、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項51】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のシナプス前性タンパク質から選択される、段階：

シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シクタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項52】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のシナプス後性タンパク質から選択される、段階：

PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体、mGluR、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項53】

10

20

30

40

50

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下の脱髄タンパク質から選択される、段階：

ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項54】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のグリアタンパク質およびミクログリアタンパク質から選択される、段階：

GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項55】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のコリン作動性タンパク質から選択される、段階：

アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項56】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパ

10

20

30

40

50

ク質マーカーが以下のドーパミン作動性タンパク質から選択される、段階：

チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ドーパミン-ヒドロキシラーゼ (Ddh)、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項57】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のアドレナリン作動性タンパク質から選択される、段階：

アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ (PNMT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ (TrH)、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項58】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下の各神経系細胞型由来の少なくとも1つの生物マーカーから選択される、段階：

IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン (P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および断片、GFAP (P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2 (Pcp2)、コルテキシン-1 (P60606)、オレキシン受容体、OX-1R、OX-2R、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22 (AAH91499)、ニューロカルシン (NC)、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項59】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のグルタミン酸作動性タンパク質から選択される、段階：

グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABAトランスアミナーゼ [GABAT]、GABA-B-R2、そ

これらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項60】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下のGABA作動性タンパク質から選択される、段階：

GABAトランスアミナーゼ(4-アミノブチレート-2-ケトグルタレートトランスアミナーゼ[GABAT])、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD25、44、65、67)、GABA-B-R2、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項61】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下の神経伝達物質受容体から選択される、段階：

NMDA受容体サブユニット、NR1A2B、グルタミン酸受容体サブユニット、AMPA、カイニン酸受容体、GluR1、GluR4、 α -アドレナリン受容体サブタイプ、(2)、 β -アドレナリン受容体サブタイプ、(2c)、GABA受容体、GABA(B)、代謝調節型グルタミン酸受容体、mGluR3、5-HTセロトニン受容体、5-HT(3)、ドーパミン受容体、D4、ムスカリン性ACh受容体、M1、ニコチン性アセチルコリン受容体、 α -7、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項62】

以下の段階を含む、神経系傷害および/またはニューロンの障害を検出ならびに診断する方法：

被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、および；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが以下の神経伝達物質輸送体から選択される、段階：

ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質、VMAT1、VMAT2、GABA輸送体、小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、VGLUT1；BNP1、VGLUT2、コリン輸送体、CHT1、それらのペプチド、断片または誘導体、ならびに；

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と関連させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断にお

10

20

30

40

50

ける1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出を考慮する、段階。

【請求項63】

以下を含む生物マーカーの組成物/パネル：

IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160、NF-M、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質、14-3-3- σ (P42655)、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22、NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バズーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)、PSD95-1、NMDA受容体、NMDA受容体サブタイプ-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体、AMPA-カイニン酸受容体サブタイプ、mGluR、mGluRサブタイプ、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMKK-IV、SNAP-25、 α -/b-SNAP、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質、GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100 β 、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、ヒポカルシン、SCG10、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルビンジンD9K、カルビンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物、CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ、オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)、MBP、MOG、PLP、MAG、シュワン細胞ミエリンタンパク質、ストリアチン、Rhes、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、PH8、セロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン、NMDA受容体サブユニット、NR1A2B、グルタミン酸受容体サブユニット、AMPA、カイニン酸受容体、GluR1、GluR4、 α -アドレナリン受容体サブタイプ、(2)、 β -アドレナリン受容体サブタイプ、(2c)、GABA受容体、GABA(B)、代謝調節型グルタミン酸受容体、mGluR3、5-HTセロトニン受容体、5-HT(3)、ドーパミン受容体、D4、ムスカリン性ACh受容体、M1、ニコチン性アセチルコリン受容体、 α -7、ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体、GLT1、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体、CHT1、アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32、ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ(DbH)、フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)、グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素、GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、ならびにGABA-B-R2。

【請求項64】

生物マーカーが以下を含む、請求項63記載の組成物：

IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シ

ナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【請求項65】

以下を含む、被験体において神経系傷害および/またはニューロンの障害を診断するためのキット：

(a) 損傷した神経細胞を有すると疑われるヒト被験体から単離された生体試料を保持するための基質、 10

(b) 神経タンパク質の少なくとも1つまたは複数の特異的に結合する作用物質；および

(c) 生体試料において少なくとも1つのマーカーの存在または量を検出するために生体試料または生体試料の一部を作用物質と反応させることに関しての、印刷された使用説明書。

【請求項66】

基質が、疎水性の、親水性の、荷電した、極性の、または金属のイオンである、請求項65記載のキット。

【請求項67】

作用物質が、抗体、一本鎖または二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、そのペプチドまたは断片である、請求項65記載のキット。 20

【請求項68】

1つまたは複数のタンパク質生物マーカーがイムノアッセイを用いて検出される、請求項65記載のキット。

【請求項69】

生物マーカーが以下である、請求項68記載のキット： IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200、NF-H、NF-160、NF-M、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質、14-3-3-(P42655)、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22、NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)、PSD95-1、NMDA受容体、NMDA受容体サブタイプ-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体、AMPA-カイニン酸受容体サブタイプ、mGluR、mGluRサブタイプ、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaM 40
PK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、突起神経膠細胞NS-1タンパク質、GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD 40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体、CX3CR1、5-d-4抗原、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、ヒポカルシン、SCG10、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物、CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ、オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、 50

オレキシン(視床下部特異的ペプチド)、MBP、MOG、PLP、MAG、シュワン細胞ミエリンタンパク質、ストリアチン、Rhes、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、PH8、セロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカパリン、ビシニン、NMDA受容体サブユニット、NR1A2B、グルタミン酸受容体サブユニット、AMPA、カイニン酸受容体、GluR1、GluR4、 α -アドレナリン受容体サブタイプ、 α 2、 β -アドレナリン受容体サブタイプ、 β 2c、GABA受容体、GABA(B)、代謝調節型グルタミン酸受容体、mGluR3、5-HTセロトニン受容体、5-HT(3)、ドーパミン受容体、D4、ムスカリン性Ach受容体、M1、ニコチン性アセチルコリン受容体、 α 7、ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体、GLT1、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1;BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体、CHT1、アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32、ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH)、フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)、グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素、GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、ならびにGABA-B-R2。

【請求項70】

生物マーカーが以下を含む、請求項65記載のキット：

IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【請求項71】

イムノアッセイがELISAである、請求項65記載のキット。

【請求項72】

生物マーカーとして特異的な抗体を含む、請求項65記載のキット。

【請求項73】

抗体が、以下に対して特異的である、請求項72記載のキット： IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200、NF-H、NF-160、NF-M、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質、14-3-3- σ (P42655)、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP22、NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)、PSD95-1、NMDA受容体、NMDA受容体サブタイプ-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体、AMPA-カイニン酸受容体サブタイプ、mGluR、mGluRサブタイプ、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMKK-IV、SNAP-25、 α - β -SNAP、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(

10

20

30

40

50

MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質、GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、ヒポカルシン、SCG10、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35; コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物、CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ、オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)、MBP、MOG、PLP、MAG、シュワン細胞ミエリンタンパク質、ストリアチン、Rhes、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、PH8、セロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン、NMDA受容体サブユニット、NR1A2B、グルタミン酸受容体サブユニット、AMPA、カイニン酸受容体、GluR1、GluR4、 α -アドレナリン受容体サブタイプ、(2)、 β -アドレナリン受容体サブタイプ、(2c)、GABA受容体、GABA(B)、代謝調節型グルタミン酸受容体、mGluR3、5-HTセロトニン受容体、5-HT(3)、ドーパミン受容体、D4、ムスカリン性Ach受容体、M1、ニコチン性アセチルコリン受容体、 α -7、ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体、GLT1、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1; BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体、CHT1、アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]、チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32、ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ(DbH)、フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)、トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)、グルタミンナーゼ、グルタミン合成酵素、GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、ならびにGABA-B-R2。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、神経系(中枢神経系(CNS)および末梢神経系(PNS))への損傷、脳傷害および神経系障害の診断ならびに予後にとって重要な、生物マーカーの信頼性のある検出および同定を提供する。神経および脳細胞への損傷を有する患者におけるタンパク質/ペプチドプロファイルは、安価な技術を用いて正常な個体と区別される。これらの技術は、生物体液を用いて中枢神経系への損傷、脳傷害およびニューロンの障害を診断することへの単純だが、感度の高いアプローチを提供する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

米国における外傷性脳損傷(TBI)の罹患率は、毎年約500,000人の入院があって、控えめに見積もっても、2百万人より多い。これらのうち、約70,000人~90,000人の頭部傷害生存者は永久的に障害がある。頭部傷害患者の介護のための社会への年間経済費用は、250億ドルに見積もられる。これらの数字は、一般市民の集団のみについてであり、罹患率は、戦闘負傷者が含まれる場合、ずっと高くなる。近代戦(1993~2000)において、TBIは、医療施設に達した負傷者の中での死亡の主な原因(53%)である。

【0003】

TBI直後の病理学および神経学的障害の評価は、適切な臨床管理の決定にとって、および長期転帰を予測することにとって、重大である。頭部傷害に最もよく用いられる転帰測定は、グラスゴー昏睡尺度(Glasgow Coma Scale)(GCS)、グラスゴー転帰尺度(Glasgow Outcome Scale)(GOS)、頭蓋内病変を検出し得るコンピュータ断層撮影法および磁気共鳴映像法(MRI)である。しかしながら、これらの転帰測定に基づいた、劇的に向上した緊急

トリアージシステムにもかかわらず、たいていのTBIは長期障害を被り、多数のTBI生存者は、GOSにおける「良い回復」の予測にもかかわらず、重篤に冒されている。さらに、CTおよびMRIは高価であり、緊急治療室環境において迅速に用いられることができない。さらになお、戦闘に関連した簡素な医学的環境において、TBIの正確な診断は、負傷者の適切なトリアージにとって必須の前提条件である。

【0004】

哺乳動物の神経系は、末梢神経系(PNS)および中枢神経系(CNS、脳および脊髄を含む)を含み、細胞の2つの主要なクラス：ニューロンおよびグリア細胞、から構成される。グリア細胞は、ニューロン間の間隙を満たし、それらを養いつつそれらの機能を調節する。PNSにおけるシュワン細胞のような特定のグリア細胞、およびCNSにおける乏突起神経膠細胞のような特定のグリア細胞はまた、ニューロン細胞体から伸長する突起であり、かつそれを通してニューロンの電気インパルスが輸送される、ニューロン軸索を囲みつつ保護する保護性ミエリン鞘を提供する。末梢神経系において、複数ニューロンの長い軸索は、いっしょに束にされ、神経または神経線維を形成する。次には、これらは、束へ結合され得、神経線維は、保護性多重膜鞘により結合された緩い膠原マトリックスにおいて、神経内血管供給と共に埋め込まれた束を形成する。中枢神経系において、神経細胞体は、それらのミエリンを鞘で覆われた突起と視覚的に区別でき、当技術分野において、それぞれ、灰色質および白質と呼ばれている。

10

【0005】

発生中、中枢神経系および末梢神経系から分化中のニューロンは、成長して、特定の標的細胞と接触しなければならない軸索を出す。場合によっては、成長中の軸索は、巨大な距離を網羅しなければならない；末梢へ成長するものもあるし、中枢神経系内に限定されて留まるものもある。哺乳動物において、この神経発生の段階は、生涯の胚性相中に完了し、神経細胞は、いったんそれらが完全に分化したならば、増加しない。

20

【0006】

従って、哺乳動物の神経経路は、ニューロンが、機械的もしくは化学的外傷を、または経路を限定するニューロンを死ぬ危険にさらすのに十分な神経障害性変性を受けた場合には、特に危険にさらされている。多数の神経障害が、今日まで同定されており、それらの一部は末梢または中枢神経系における分集団またはニューロンの系のみを冒す。ニューロンそれら自身または関連したグリア細胞を冒し得る神経障害は、細胞代謝機能不全、感染、毒性作用物質への曝露、自己免疫不全、栄養失調、または虚血に起因し得る。ある場合では、細胞機能不全は、細胞死を直接的に誘導すると考えられている。他の場合では、神経障害が、身体の免疫/炎症系、および最初の神経傷害に対する身体の免疫応答の機構を刺激するのに十分な組織壊死を誘導し得、その後、ニューロンおよびこれらのニューロンにより限定される経路を破壊する。

30

【0007】

CNSへのもう一つの一般的な傷害は、脳卒中、脳内出血または梗塞の結果としての脳組織の破壊、である。脳卒中は、先進国世界において死亡の主な原因である。それは、結果として脳の1つの領域において不足した血液供給および組織の死(梗塞)を生じる血流の低下または虚血により引き起こされ得る。虚血性脳卒中の原因は、脳における血管に形成される血餅(血栓)、および別の場所から脳へ移動するアテローム斑もしくは他の物質の血餅または小片(塞栓)を含む。脳内の出血(bleeding)(出血(hemorrhage))もまた、脳卒中によく似た症状を引き起こし得る。そのような傷害を検出する能力は、従来技術において欠けている。

40

【0008】

哺乳動物の神経経路はまた、腫瘍性病変により引き起こされる損傷による危険にさらされる。ニューロンおよびグリア細胞の両方の腫瘍形成は同定されている。神経起源の癌化細胞は、一般的に、正常な分化細胞のように振る舞う能力を喪失し、機能の喪失により神経経路を破壊することができる。さらに、増殖する腫瘍は、正常な神経組織構造をゆがめること、神経を圧縮することにより経路を阻害すること、脳脊髄液または血液供給流れを

50

阻害することにより、および/または身体の免疫応答を刺激することにより、病変を生じ得る。転移性腫瘍は、脳および脊髄における腫瘍性病変の重大な原因であるが、また同様に、神経経路を損壊し、神経細胞死を誘導し得る。

【0009】

このように、神経系傷害重症度および治療的処置の効力の適切、特異的、安価かつ単純な診断臨床評価の当技術分野における必要性がある。従って、神経系(CNS(脳および脊髄)およびPNS)に、特異的である、または主に見出される神経化学的マーカーの同定は、結果の予測および標的療法的送達の誘導の両方に非常に有益であると思われる。

【発明の開示】

【0010】

概要

本発明は、対照被験体の試料と比較して神経系傷害および/またはニューロンの障害を患っている患者の試料に異なって存在するニューロンタンパク質マーカーを提供する。本発明はまた、これらのマーカーを検出することにより神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断のための助けとして用いられ得る感度が高く、迅速な方法およびキットを提供する。患者試料における単独または組み合わせでのこれらのマーカーの測定は、診断者が、外傷性脳損傷(TBI)および脳卒中においてのような神経系傷害の程度の推定診断と関連させることができる情報を提供する。

【0011】

好ましい態様において、本発明は、外傷性脳損傷、ニューロンの損傷、神経系障害、脳損傷、薬物またはアルコール依存症による神経系損傷、脳または中枢神経系のような神経系に関連した疾患を示す生物マーカーを提供する。好ましくは、生物マーカーは、タンパク質、それらの断片または誘導体であり、神経細胞、脳細胞、または脳および中枢神経系に存在する任意の細胞と関連している。

【0012】

好ましい態様において、生物マーカーは、好ましくは、神経タンパク質、それらのペプチド、断片または誘導体である。神経タンパク質の例は、非限定的に、軸索タンパク質、アミロイド前駆体タンパク質、樹状突起タンパク質、細胞体タンパク質、シナプス前性タンパク質、シナプス後性タンパク質、および神経核タンパク質を含む。

【0013】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーは、下の表1に列挙されたタンパク質のような、少なくとも1つのタンパク質、そのペプチド、変異体または断片から選択される。例えば、軸索タンパク質： IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、 I、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、 インターネキシン；樹状突起タンパク質： III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 -チューブリン(P02551)、 -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質： UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3- (P42655))、SM22- 、カルグラヌリンAB、 -シヌクレイン(P37377)、 -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質： NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質： シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シクタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質： PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- 、 、 、 CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞： ミエリン塩基性タンパ

10

20

30

40

50

ク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア痕跡：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリリン、ピシニン)；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_1 (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_1 (2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7 (7))；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0014】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーは、下の表1に列挙されたタンパク質のような、少なくとも2つもしくはそれ以上のタンパク質、それらのペプチド、変異体または断片由来である。例えば、軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 β -チューブリン(P02551)、 γ -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3- σ (P42655))、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 β -シヌクレイン(P37377)、 α -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、

ピッコロ (Piccolo) (アクゾニン) (NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1 (NP_001626)、アンフィフィシン-2 (NP_647477) ; シナプス後性タンパク質 : PSD95-1、NMDA受容体 (およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体 (すべてのサブタイプ)、mGluR (すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼ II (CaMK)- 、 、 CaMK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP ; ミエリン乏突起神経膠細胞 : ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質 (MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質 (MOG)、ミエリン関連タンパク質 (MAG)、乏突起神経膠細胞 NS-1 タンパク質 ; グリアタンパク質生物マーカー : GFAP (P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI) -P04785、ニューロカルシン 、 S100 ; ミクログリアタンパク質生物マーカー : Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ (CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン (CX3CL1) およびフラクタルキン受容体 (CX3CR1)、5-d-4抗原 ; シュワン細胞マーカー : シュワン細胞ミエリンタンパク質 ; グリア痕跡 : テネイシン ; 海馬 : スタスミン、ヒポカルシン、SCG10 ; 小脳 : プルキンエ細胞タンパク質-2 (Pcp2)、カルピンジン D9K、カルピンジン D28K (NP_14190)、小脳 CaBP、スポット 35 ; 脳皮質 : コルテキシン-1 (P60606)、H-2Z1 遺伝子産物 ; 視床 : CD15 (3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン) エピトープ ; 視床下部 : オレキシン受容体 (OX-1R および OX-2R) -食欲、オレキシン (視床下部特異的ペプチド) ; 脳梁 : MBP、MOG、PLP、MAG ; 脊髄 : シュワン細胞ミエリンタンパク質 ; 線条体 : ストリアチン、Rhes (線条体に濃縮された Ras 相同体) ; 末梢性神経節 : Gadd45a ; 末梢神経線維 (感覚 + 運動) : ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質 22 (AAH91499) ; 他のニューロン特異的タンパク質 : PH8 (S セロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン (NC)、ニューロン特異的 EF ハンド Ca^{2+} 結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカパリン、ピシニン ; 神経伝達物質受容体 : NMDA 受容体サブユニット (例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット (AMPA、カイニン酸受容体 (例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ (例えば、 α_2 (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ (例えば、 β_2 (2c))、GABA 受容体 (例えば、GABA (B))、代謝調節型グルタミン酸受容体 (例えば、mGluR3)、5-HT セロトニン受容体 (例えば、5-HT (3))、ドーパミン受容体 (例えば、D4)、ムスカリン性 Ach 受容体 (例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体 (例えば、 α_7 (7)) ; 神経伝達物質輸送体 : ノルエピネフリン輸送体 (NET)、ドーパミン輸送体 (DAT)、セロトニン輸送体 (SERT)、小胞輸送体タンパク質 (VMAT1 および VMAT2)、GABA 輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体 (VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体 (例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体 1、[VGLUT1 ; BNPI] および VGLUT2、コリン輸送体 (例えば、CHT1) ; コリン作動性生物マーカー : アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ [ChAT] ; ドーパミン作動性生物マーカー : チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、ホスホ-TH、DARPP32 ; ノルアドレナリン作動性生物マーカー : ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ (DbH) ; アドレナリン作動性生物マーカー : フェニルエタノールアミン N-メチルトランスフェラーゼ (PNMT) ; セロトニン作動性生物マーカー : トリプトファンヒドロキシラーゼ (TrH) ; グルタミン酸作動性生物マーカー : グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素 ; GABA 作動性生物マーカー : GABA トランスアミナーゼ [GABAT]、GABA-B-R2。

【 0 0 1 5 】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーは、各神経系細胞型由来の少なくとも 1 つの生物マーカーを含む。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。組成物は、以下を含む : II スペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24 微小管関連タンパク質-2、UCH-L1 (Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン (P21707)、シナプトジャニン-1 (Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA 受容体-2 およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および断片、GFAP (P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2 (Pcp2)、コルテキシン-1 (P60606)、オレキシン受容体 (OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質 22 (AAH91499)

10

20

30

40

50

、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0016】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーの拡張されたパネルは、傷害の機構、細胞死の様式(壊死対アポトーシス)、傷害の部位、神経系における異なる細胞型の部位および状態、ならびに向上した診断(より良い感度および特異性)の高濃縮された情報を提供するために用いられる。本発明は、小さなパネル上に集中した既存の技術(例えば、4マーカーパネル: Syn X Pharma(Mississauga, Canada)からの-MBP-トロンボモジュリン-S100B-NSEまたは単一マーカー(例えば、DiaSorin(Sweden)からのS100B)に対して重要かつ有意な進歩である。

【0017】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーは、異なる宿主の解剖学的領域間を区別するために選択される。例えば、少なくとも1つの生物マーカーは、神経系細胞内タンパク質生物マーカー、海馬タンパク質生物マーカーおよび小脳タンパク質生物マーカーのような神経系解剖学的マーカーから選択され得る。神経系細胞内タンパク質生物マーカーの例は、NF-200、NF-160、NF-68である。海馬タンパク質生物マーカーの例は、SCG10、スタスミンである。小脳タンパク質生物マーカーの例は、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)である。

【0018】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーは、細胞レベルにおいて傷害間を区別し、それにより、どの細胞型が傷害されたかを検出するために選択される。例えば、少なくとも1つの生物マーカータンパク質は、その細胞型に特異的なタンパク質生物マーカーの代表的なパネルから選択される。細胞型に特異的な生物マーカーについての例は、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)のようなミエリン乏突起神経膠細胞生物マーカーを含む。シュワン細胞に特異的な生物マーカーの例は、非限定的に、シュワン細胞ミエリンタンパク質を含む。グリア細胞タンパク質生物マーカーの例は、非限定的に、GFAP(タンパク質アクセッション番号P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785を含む。このように、1つまたは複数の特異的生物マーカーを検出することにより、傷害された特定の細胞型が決定され得る。

【0019】

もう一つの好ましい態様において、細胞の異なる細胞内構造に特異的な生物マーカーは、傷害の細胞内レベルを決定するために用いられ得る。例は、非限定的に、NF-200、NF-160、NF-68のような神経系細胞内タンパク質生物マーカー; 例えば、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B、MAP-2C、タウ、ダイナミン-1(P212575)、フォエシン、ダイナクチン(Q13561)、P24微小管関連タンパク質、ビメンチン(P31000)のような樹状突起生物マーカー; 例えば、UCH-L1(Q00981)、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、14-3-3タンパク質のような細胞体タンパク質; 例えば、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、NeuNのような神経核タンパク質を含む。このように、特定の生物マーカーの検出は、傷害の程度および細胞内局在性を決定する。

【0020】

もう一つの好ましい態様において、細胞の異なる解剖学的領域、異なる細胞型、および/または異なる細胞内構造に特異的な生物マーカーは、解剖学的傷害の位置、傷害された細胞型の位置、および細胞内レベルにおける傷害の位置に関する情報を提供するために選択される。各セットからの任意の数の生物マーカーは、傷害の機構、様式および細胞内部位、傷害の解剖学的位置、ならびに神経系における異なる細胞型(ニューロンのサブタイプ、神経幹細胞、星状膠細胞、乏突起神経膠細胞およびミクログリア細胞)の状態の非常に濃縮されかつ詳細な情報を提供するために用いられ得る。

【0021】

好ましい態様において、細胞の解剖学的領域のような異なる位置、異なる細胞型および

10

20

30

40

50

/または異なる細胞内構造に特異的な少なくとも1つの生物マーカーは、傷害の機構、様式、細胞内部位、傷害の解剖学的位置、および神経系における異なる細胞型の状態を決定するために用いられ、より好ましくは、少なくとも2つの生物マーカーのパネルは、各所望の位置から選択される、より好ましくは、少なくとも3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個、約100個までの生物マーカーが各位置から選択される。

【0022】

好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害ならびに/または神経系障害の診断および検出のための細胞内ニューロンの生物マーカーは、好ましくは、軸索タンパク質、樹状突起タンパク質、細胞体タンパク質、神経核タンパク質、シナプス前性タンパク質、シナプス後性タンパク質の少なくとも1つである。

10

【0023】

好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された軸索タンパク質は、好ましくは以下である：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン、それらのペプチド、断片または誘導体。

【0024】

好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された樹状突起タンパク質は、好ましくは以下である：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2、それらのペプチド、断片または誘導体。

20

【0025】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された神経核タンパク質は、好ましくは以下である：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン、それらのペプチドまたは断片。

【0026】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された細胞体タンパク質は、好ましくは以下である：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22、それらのペプチド、断片または誘導体。

30

【0027】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたシナプス前性タンパク質は、好ましくは以下である：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シンタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)、それらのペプチド、断片または誘導体。

40

【0028】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたシナプス後性タンパク質は、好ましくは以下である：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP、それらのペプチド、断片または誘導体。

50

【0029】

もう一つの好ましい態様において、同定された生物マーカーは、例えば、ミエリン乏突起神経膠細胞、グリア細胞、ミクログリア細胞、シュワン細胞、グリア瘢痕のような損傷した神経系細胞サブタイプを区別する。

【0030】

好ましい態様において、ミエリン乏突起神経膠細胞生物マーカーは以下である：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア瘢痕：テネイシン。

10

【0031】

もう一つの好ましい態様において、神経系傷害および/または神経系損傷の解剖学的位置を同定する生物マーカーは、非限定的に、以下を含む：海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロブシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、およびピシニン。

20

【0032】

もう一つの好ましい態様において、損傷した神経系サブタイプを同定する生物マーカーは、非限定的に、以下を含む：神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_1 (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_2 (2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7 -7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミンヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

30

40

【0033】

脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された脱髄タンパク質は、好ましくは以下である：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンプロテオリピドタンパク質、それらのペプチド、断片または誘導体。

50

【0034】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたグリアタンパク質は、好ましくは以下である：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI-P04785)、それらのペプチド、断片または誘導体。

【0035】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたコリン作動性タンパク質は、好ましくは以下である：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ、それらのペプチド、断片または誘導体。

10

【0036】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたドーパミン作動性タンパク質は、好ましくは以下である：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32、それらのペプチド、断片または誘導体。

【0037】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたノルアドレナリン作動性タンパク質は、好ましくは以下である：ドーパミン-ヒドロキシラーゼ(DbH)、そのペプチド、断片または誘導体。

20

【0038】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたセロトニン作動性タンパク質は、好ましくは以下である：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)、そのペプチド、断片または誘導体。

【0039】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたグルタミン酸作動性タンパク質は、好ましくは以下である：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素、それらのペプチド、断片または誘導体。

30

【0040】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定されたGABA作動性タンパク質は、好ましくは以下である：GABAトランスアミナーゼ(4-アミノブチレート-2-ケトグルタレートトランスアミナーゼ[GABAT])、グルタミン酸脱炭酸酵素(GAD25、44、65、67)、それらのペプチド、断片または誘導体。

【0041】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された神経伝達物質受容体は、好ましくは以下である： α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_2)、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_2)、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(例えば、GluR4)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7)、それらのペプチド、断片または誘導体。

40

【0042】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された神経伝達物質輸送体は、好ましくは以下である：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送

50

体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、コリン輸送体(例えば、CHT1)、それらのペプチド、断片または誘導体。

【0043】

もう一つの好ましい態様において、脳および/もしくはCNS傷害または神経系障害の診断ならびに検出のための生物マーカーとして同定された他のタンパク質は、非限定的に、ピメンチン(P31000)、CK-BB(P07335)、14-3-3- (P42655)、MMP2、MMP9、それらのペプチド、断片または誘導体を含む。

【0044】

マーカーは、分子量、酵素消化フィンガープリントにより、およびそれらの既知のタンパク質アイデンティティにより、特徴付けられる。マーカーは、様々な分画技術、例えば、質量分析法と連結されたクロマトグラフ分離法、により、または伝統的なイムノアッセイ法により、他のタンパク質から分解され得る。好ましい態様において、分解の方法は、質量分析プローブの表面がマーカーを結合する吸着剤を含んでいる、表面増強レーザー脱離/イオン化(「SELDI」)質量分析法を含む。

【0045】

他の好ましい態様において、生物マーカーの複数が検出される、好ましくは、生物マーカーの少なくとも2つが検出される、より好ましくは、生物マーカーの少なくとも3つが検出される、最も好ましくは、生物マーカーの少なくとも4つが検出される。

【0046】

一つの局面において、各生物マーカーの量は、被験体試料において測定され、マーカー間の量の比が決定される。好ましくは、被験体試料における各生物マーカーの量および生物マーカー間の量の比は、正常な健康個体と比較される。健康な個体と傷害を患っている個体間の生物マーカーの量の比における増加は、臨床的に意義のあるデータと比較した、傷害の大きさ、障害進行を示す。

【0047】

好ましくは、傷害および臨床的疾患の異なる段階で検出される生物マーカーは、解剖学的傷害、細胞傷害の型、傷害の細胞内局在性を評価するために相関される。疾患における傷害または肉体的傷害の程度を、どの段階で、どの生物マーカーが検出されるかをモニターすることは、傷害の機構に関する特定の情報を提供する、傷害の複数の細胞内部位を同定する、疾患関連傷害に関連した複数の細胞型を同定する、および傷害の解剖学的位置を同定する、生物マーカーのパネルを提供する。

【0048】

もう一つの局面において、好ましくは、単一の生物マーカーが、傷害、傷害の位置、ならびに疾患および/または神経系傷害の進行を診断するために正常な健康個体からの1つまたは複数の生物マーカーと組み合わせて用いられる、より好ましくは、マーカーの複数が、傷害、傷害の位置、ならびに疾患および/または神経系傷害の進行を診断するために、正常な健康個体からの1つまたは複数の生物マーカーと組み合わせて用いられる。1つまたは複数のタンパク質生物マーカーが、疾患および/もしくは神経系傷害に罹りやすい、または罹っている患者からのタンパク質プロファイルと正常な被験体と比較することにおいて用いられる。

【0049】

好ましい検出方法は、バイオチップアレイの使用を含む。本発明に有用なバイオチップアレイは、タンパク質および核酸アレイを含む。1つまたは複数のマーカーは、バイオチップアレイ上に固定化され、マーカーの分子量を検出するためにレーザーイオン化に供される。マーカーの分析は、例えば、総イオン電流に対して標準化される閾値強度に対する1つまたは複数のマーカーの分子量による。好ましくは、対数変換が、検出されるマーカーの数を制限するためにピーク強度範囲を縮小させるために用いられる。

【0050】

もう一つの好ましい方法において、データは、バイオチップアレイ上に固定化された被験体試料について、バイオチップをレーザーイオン化に供し、質量/電荷比についてのシ

10

20

30

40

50

グナルの強度を検出することにより生じる；ならびに、そのデータをコンピュータ読み取り可能な形式へ変換する；ならびに、傷害されたおよび/または罹患した患者に存在するマーカーを表し、かつ傷害されていないおよび/または罹患していない被験体対照に欠けているシグナルを検出するために、ユーザー入力パラメーターによりデータを分類するアルゴリズムを実行する。

【0051】

好ましくは、バイオチップ表面は、例えば、イオン性であり、陰イオン性であり、固定化ニッケルイオンで構成され、陽イオンおよび陰イオンの混合物で構成され、1つまたは複数の抗体、一本鎖または二本鎖核酸を含み、タンパク質、それらのペプチドまたは断片、アミノ酸プローブを含み、ファージディスプレイライブラリーを含む。

10

【0052】

他の好ましい方法において、マーカーの1つまたは複数は、付着した吸着剤を含む質量分析計に用いるのに適応したプローブを供給する段階、および；被験体試料を吸着剤と接触させる段階、および；プローブからマーカーを脱離して、イオン化し、脱イオン化/イオン化マーカーを質量分析計で検出する段階を含む、レーザー脱離/イオン化質量分析法を用いて検出される。

【0053】

好ましくは、レーザー脱離/イオン化質量分析法は、付着した吸着剤を含む基質を供給する段階；被験体試料を吸着剤と接触させる段階；付着した吸着剤を含む質量分析計に用いるのに適応したプローブ上に基質を置く段階；および、プローブからマーカーを脱離して、イオン化し、脱離/イオン化マーカーを質量分析計で検出する段階を含む。

20

【0054】

吸着剤は、例えば、疎水性、親水性、イオン性、またはニッケルのような金属キレート吸着剤、または抗体、一本鎖もしくは二本鎖オリゴヌクレオチド、アミノ酸、タンパク質、それらのペプチドもしくは断片であり得る。

【0055】

もう一つの態様において、生物マーカーの精製のための過程は、1つもしくは複数のタンパク質生物マーカーを含む試料をサイズ排除クロマトグラフィーにより分画する段階、および1つもしくは複数の生物マーカーを含む画分を収集する段階；ならびに/または1つもしくは複数の生物マーカーを含む試料を陰イオンクロマトグラフィーにより分画する段階、および1つまたは複数の生物マーカーを含む画分を収集する段階を含む。分画は、順相および固定化ニッケルアレイ上で純度についてモニターされる。アレイ上の固定化マーカー画分に関するデータの発生は、そのアレイをレーザーイオン化にかけ、質量/電荷比についてのシグナルの強度を検出する段階；ならびに、そのデータをコンピュータ読み取り可能な形式へ変換する段階；ならびに、傷害されたおよび/または罹患した患者に存在するマーカーを表し、かつ傷害されていないおよび/または罹患していない被験体対照に欠けているシグナルを検出するために、ユーザー入力パラメーターによりデータを分類するアルゴリズムを実行する段階、により達成される。好ましくは、画分は、ゲル電気泳動に供され、質量分析法により生じたデータと関連させられる。一つの局面において、可能性のあるマーカーを示すゲルバンドは、切除され、酵素処理に供され、ペプチドマッピングのためにバイオチップアレイに適用される。

30

40

【0056】

もう一つの好ましい態様において、特定の生物マーカーの存在は、CNSおよび/または脳傷害の程度を示す。例えば、1つまたは複数の樹状突起損傷マーカー、細胞体傷害マーカー、脱髄マーカー、軸索傷害マーカーの検出が、CNS傷害を示し、1つまたは複数の存在が、神経傷害の程度を示すものと思われる。

【0057】

もう一つの好ましい態様において、特定の生物マーカーの存在は、神経学的障害を示す。すなわち、樹状突起損傷マーカー、細胞体傷害マーカー、脱髄マーカー、軸索傷害マーカー、シナプス終末マーカー、シナプス後性マーカー。

50

【 0 0 5 8 】

CNS/PNSおよび/または脳傷害の検出ならびに診断のための好ましい方法は、被験体試料において少なくとも1つまたは複数のタンパク質生物マーカーを検出する段階、ならびに；1つまたは複数のタンパク質生物マーカーの検出をCNSおよび/または脳傷害の診断と相関させる段階であって、相関が、正常な被験体と比較した、各診断における1つまたは複数の生物マーカーの検出を考慮し、1つまたは複数のタンパク質マーカーが、例えば以下の神経タンパク質から選択される、段階を含む：軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア痕跡：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、-アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2))、-アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、-7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例

例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1; BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1);コリン作動性生物マーカー:アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT];ドーパミン作動性生物マーカー:チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32;ノルアドレナリン作動性生物マーカー:ドーパミン-ヒドロキシラーゼ(DbH);アドレナリン作動性生物マーカー:フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT);セロトニン作動性生物マーカー:トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH);グルタミン酸作動性生物マーカー:グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素;GABA作動性生物マーカー:GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0059】

もう一つの好ましい態様において、本発明は、被験体において細胞損傷を分析するためのキットを提供する。キットは、好ましくは以下を含む:(a)1つまたは複数の生物マーカー、(b)損傷した神経細胞を有すると疑われるヒト被験体から単離された生体試料を保持するための基質、(c)神経タンパク質の少なくとも1つまたは複数の特異的に結合する作用物質;および(d)生体試料において少なくとも1つのマーカーの存在または量を検出するために生体試料または生体試料の一部と作用物質を反応させることに関する印刷された使用説明書。生物マーカーは、非限定的に、以下を含む:軸索タンパク質:IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン;樹状突起タンパク質:III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2;細胞体タンパク質:UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22;神経核タンパク質:NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン;シナプス前性タンパク質:シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRM P1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477);シナプス後性タンパク質:PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP;ミエリン乏突起神経膠細胞:ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質;グリアタンパク質生物マーカー:GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100;ミクログリアタンパク質生物マーカー:Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原;シュワン細胞マーカー:シュワン細胞ミエリンタンパク質;グリア痕跡:テネイシン;海馬:スタスミン、ヒポカルシン、SCG10;小脳:プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35;脳皮質:コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物;視床:CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ;視床下部:オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド);脳梁:MBP、MOG、PLP、MAG;脊髄:シュワン細胞ミエリンタンパク質;線条体:ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体);末梢性神経節:Gadd45a;末梢神経線維(感覚+運動):ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499);他のニューロン特異的タンパク質:PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロ

10

20

30

40

50

カルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

10

20

30

40

50

【0060】

もう一つの好ましい態様において、キットは、以下を含む生物マーカーの組成物またはパネルを含む： IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、 III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0061】

好ましくは、生体試料は、被験体から単離される前に被験体の神経系と情報交換している液体；例えば、CSFまたは血液、であり、作用物質は、神経タンパク質の少なくとも1つまたは複数を特異的に結合する抗体、アプタマーまたは他の分子であり得る。キットはまた、作用物質に連結したものの、または作用物質に特異的に結合する物質(例えば、二次抗体)に連結したもののような検出可能な標識を含み得る。

【0062】

本発明の他の局面は下に記載されている。

【0063】

詳細な説明

本発明は、神経細胞傷害および/またはニューロンの障害の診断となる生物マーカーを同定する。本発明の異なる生物マーカーの検出はまた、神経傷害の重症度の程度、傷害に関与する細胞、および傷害の細胞内局在性の診断となる。特に、本発明は、1つまたは複数の神経タンパク質の存在または量を神経細胞傷害の重症度および/または型と相関させる段階を用いる。神経タンパク質、その断片または誘導体の量は、傷害損傷が重症であれば重症であるほど今度はより多い量の神経タンパク質を生体試料(例えば、CSF)に蓄積させる神経細胞の数が多くなるというように、神経組織傷害の重症度に直接的に関連する。

【0064】

本発明を示す前に、下に用いられる特定の用語の定義を示すことは、その理解の助けになり得る。

【0065】

本発明の文脈における「マーカー」とは、対照被験体(例えば、陰性診断を有する人、正常または健康な被験体)から採取された比較試料と比較して、神経系傷害および/またはニューロンの障害を有する患者から採取された試料に異なって存在するポリペプチド(特定の見かけの分子量の)を指す。

【0066】

本発明の関連における「相補的な」とは、いっしょに検出される場合、1つの生物マーカーのみの検出と比較して感度および特異性の増加を与える少なくとも2つの生物マーカーの検出を指す。

【0067】

句「異なって存在する」とは、対照被験体と比較した、例えば、神経傷害を有する患者から採取された試料に存在するマーカーの量および/または頻度における違いを指す。例えば、マーカーは、対照被験体の試料と比較して、神経傷害を有する患者の試料において上昇したレベルで、または減少したレベルで、存在するポリペプチドであり得る。または、マーカーは、対照被験体の試料と比較して、患者の試料において、より高い頻度で、またはより低い頻度で検出されるポリペプチドであり得る。マーカーは、量、頻度または両方に関して異なって存在し得る。

【0068】

ポリペプチドは、一方の試料におけるポリペプチドの量が、他方の試料におけるポリペプチドの量と統計学的に有意に異なる場合には、2つの試料間で異なって存在する。例えば、ポリペプチドは、それが他方の試料に存在しているよりも、それが少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、または少なくとも約1000%、多く存在する場合または、一方の試料において検出され、他方において検出可能でない場合には、2つの試料間で異なって存在する。

【0069】

代替としてまたは追加として、ポリペプチドは、神経傷害および/またはニューロンの障害を患っている患者の試料においてポリペプチドを検出する頻度が対照試料においてより統計学的に有意に高いまたは低い場合には、試料の2セット間で異なって存在する。例えば、ポリペプチドは、それが、試料の一方のセットにおいて、試料の他方のセットより、少なくとも約120%、少なくとも約130%、少なくとも約150%、少なくとも約180%、少なくとも約200%、少なくとも約300%、少なくとも約500%、少なくとも約700%、少なくとも約900%、または少なくとも約1000%、多い頻度でまたは少ない頻度で観察される場合には、試料の2つのセット間で異なって存在する。

【0070】

「診断の」とは、病的状態の存在または性質を同定することを意味する。診断方法は、それらの感度および特異性において異なる。診断アッセイの「感度」は、検査で陽性と出た罹患した個体のパーセンテージである(「真の陽性」のパーセント)。アッセイにより検出されなかった罹患した個体は「偽陰性」である。罹患しておらず、かつアッセイで陰性と出た被験体は、「真の陰性」と呼ばれる。診断アッセイの「特異性」は、1引く(minus)偽陽性率であり、「偽陽性」率は、検査で陽性と出た疾患を有さないものの割合として定義される。特定の診断方法は、状態の明確な診断を提供しない場合があるが、方法が診断の助けとなる陽性表示を提供する場合には、それは十分である。

【0071】

マーカーの「検査量」は、検査されることになっている試料に存在するマーカーの量を指す。検査量は、絶対量(例えば、 $\mu\text{g/ml}$)か、または相対量(例えば、シグナルの相対的強度)かのいずれかであり得る。

【0072】

マーカーの「診断量」は、神経傷害および/またはニューロンの障害の診断と一致している被験体の試料におけるマーカーの量を指す。診断量は、絶対量(例えば、 $\mu\text{g/ml}$)かま

10

20

30

40

50

たは相対量(例えば、シグナルの相対的強度)かのいずれかであり得る。

【0073】

マーカの「対照量」は、マーカの検査量に対して比較されることになっている任意の量または量の範囲であり得る。例えば、マーカの対照量は、神経傷害および/またはニューロンの障害を有さない人におけるマーカの量であり得る。対照量は、絶対量(例えば、 $\mu\text{g/ml}$)かまたは相対量(例えば、シグナルの相対的強度)かのいずれかであり得る。

【0074】

「プローブ」は、気相イオン分光計へ除去可能に挿入できる装置を指し、検出のためにマーカを提示するための表面を有する基質を含む。プローブは、単一の基質または複数の基質を含み得る。

10

【0075】

「基質」または「プローブ基質」は、吸着剤が提供され得る(例えば、付着、沈着などにより)固相を指す。

【0076】

「吸着剤」は、マーカを吸着することができる任意の物質を指す。用語「吸着剤」は、マーカが曝される単一の物質(「一重吸着剤」)(例えば、1つの化合物または官能基)、およびマーカが曝される複数の異なる物質(「多重吸着剤」)の両方を指すように本明細書において用いられる。多重吸着剤における吸着物質は「吸着剤種」と称される。例えば、プローブ基質上のアドレス指定できる位置が、異なる結合特性を有する多くの異なる吸着剤種(例えば、陰イオン交換物質、金属キレート剤、または抗体)を特徴とする多重吸着剤を含み得る。基質物質自身はまた、マーカを吸着することに寄与し得、「吸着剤」の一部とみなされる場合がある。

20

【0077】

「吸着」または「保持」は、溶離液(選択性閾値調節剤)または洗浄溶液での洗浄前か後のいずれかでの吸着剤とマーカの間の検出可能な結合を指す。

【0078】

「溶離液」または「洗浄溶液」は、マーカの吸着剤への吸着を仲介するために用いられ得る作用物質を指す。溶離液および洗浄溶液はまた、「選択性閾値調節剤」とも呼ばれる。溶離液および洗浄溶液は、プローブ基質表面から結合していない物質を洗浄および除去するために用いられ得る。

30

【0079】

「分解する(resolve)」、「分解(resolution)」、または「マーカの分解」は、試料における少なくとも1つのマーカの検出を指す。分解は、分離およびその後の示差的検出による試料における複数のマーカの検出を含む。分解は、混合物におけるすべての他の生体分子からの1つまたは複数のマーカの完全な分離を必要としない。むしろ、少なくとも1つのマーカと他の生体分子の間での区別を可能にする任意の分離で十分である。

【0080】

「気相イオン分光計(gas phase ion spectrometer)」とは、試料が揮発させられ、イオン化される場合に形成されるイオンの質量対電荷比へ変換され得るパラメーターを測定する機械を指す。一般的に、対象となるイオンは、単一の電荷を有し、質量対電荷比は、しばしば、単に質量と呼ばれる。気相イオン分光計は、例えば、質量分析計、イオン移動度分光計、および総イオン電流測定装置を含む。

40

【0081】

「質量分析計」とは、吸気装置、イオン化源、イオン光学アセンブリー、質量分析器、および検出器を含む気相イオン分光計を指す。

【0082】

「レーザー脱離質量分析計」は、分析物を脱離させ、揮発させ、かつイオン化するための手段としてレーザーを用いる質量分析計を指す。

50

【0083】

「検出する」とは、検出されるべき対象の存在、非存在、または量を同定することを指す。

【0084】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書において交換可能に用いられる。その用語は、1つまたは複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の類似体または模倣体であるアミノ酸ポリマーに、および天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用する。ポリペプチドは、例えば、糖タンパク質を形成するための糖質残基の付加により、修飾され得る。用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、糖タンパク質および非糖タンパク質を含む。

10

【0085】

「検出可能な部分」または「標識」とは、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、または化学的手段により検出できる組成物を指す。例えば、有用な標識は、 ^{32}P 、 ^{35}S 、蛍光色素、高電子密度試薬、酵素(例えば、ELISAで一般的に用いられるような)、ビオチン-ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン(dioxigenin)、ハプテンおよび抗血清もしくはモノクローナル抗体が入手できるタンパク質、または標的に相補的な配列を有する核酸分子を含む。検出可能な部分は、しばしば、試料において結合した検出可能な部分の量を定量化するために用いられ得る、放射性、色素生産性、または蛍光性シグナルのような測定可能なシグナルを発生する。シグナルの定量化は、例えば、シンチレーション計数、濃度測定、またはフローサイトメトリーにより達成される。

20

【0086】

「抗体」は、エピトープ(例えば、抗原)を特異的に結合し、かつ認識する、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされるポリペプチドリガンドまたはその断片を指す。認められている免疫グロブリン遺伝子は、および軽鎖定常領域遺伝子、および μ 重鎖定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。抗体は、例えば、無傷免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼでの消化により生成されるいくつかのよく特徴付けられた断片として存在する。これは、例えば、Fab'およびF(ab)'₂断片を含む。本明細書において用いられる場合の用語「抗体」はまた、抗体全体の改変により生成される抗体断片か、または組換えDNA方法を用いて新たに合成されたものかのいずれかを含む。それはまた、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、または一本鎖抗体を含む。抗体の「Fc」部分は、1つまたは複数の重鎖定常領域ドメイン、CH₁、CH₂、およびCH₃、を含むが、重鎖可変領域を含まない、免疫グロブリン重鎖のその部分を指す。

30

【0087】

「イムノアッセイ」は、抗原(例えば、マーカー)を特異的に結合する抗体を用いるアッセイである。イムノアッセイは、抗原を単離する、標的にするおよび/または定量化する特定の抗体の特異的結合性質の使用により特徴付けられる。

【0088】

タンパク質またはペプチドに言及する場合、抗体に「特異的に(または選択的に)結合する」、または「特異的(または選択的)免疫反応性の」という句は、タンパク質の不均一な集団および他の生物製剤においてそのタンパク質の存在を決定する結合反応を指す。従って、指定されたイムノアッセイ条件下で、特定された抗体は、バックグラウンドの少なくとも2倍、特定のタンパク質に結合し、かつ試料に存在する他のタンパク質に有意な量で実質的には結合しない。そのような条件下での抗体への特異的結合は、特定のタンパク質へのその特異性について選択される抗体を必要とし得る。例えば、ラット、マウスまたはヒトのような特定の種由来のマーカーNF-200に対して産生されたポリクローナル抗体は、マーカーNF-200に対し特異的免疫反応性であり、かつマーカーNF-200の多型変異体および対立遺伝子を除いて、他のタンパク質と免疫反応性ではないポリクローナル抗体のみを得るように選択され得る。この選択は、他の種からマーカーNF-200分子と交差反応する抗

40

50

体を引き出すことにより達成され得る。様々なイムノアッセイ型が、特定のタンパク質と特異的免疫反応性である抗体を選択するために用いられ得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質と特異的免疫反応性である抗体を選択するために日常的に用いられる(特異的免疫反応性を測定するために用いられ得るイムノアッセイの型および条件の説明について、例えば、Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (1988)を参照)。典型的には、特異的または選択的反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、およびより典型的には、バックグラウンドの10倍より多く100倍までである。

【0089】

「エネルギー吸収分子」または「EAM」は、質量分析計においてイオン化源からエネルギーを吸収し、それによりプローブ表面からマーカのような分析物の脱離を助ける、分子を指す。分析物のサイズおよび性質に依存して、エネルギー吸収分子は任意で用いられ得る。MALDIに用いられるエネルギー吸収分子は、しばしば、「マトリックス」と呼ばれる。桂皮酸誘導体、シナピン酸(sinapinic acid)、「SPA」、シアノヒドロキシ桂皮酸(「CHCA」)およびジヒドロキシ安息香酸は、しばしば、生物有機分子のレーザー脱離においてエネルギー吸収分子として用いられる。

10

【0090】

「試料」は、その最も広い意味において、本明細書において用いられる。ポリヌクレオチド、ポリペプチド、ペプチド、抗体などを含む試料は、体液；細胞調製物の可溶性画分、細胞が増殖した培地；細胞から単離または抽出された染色体、細胞小器官、または膜；溶液中または基質に結合した、ゲノムDNA、RNAまたはcDNA、溶液中または基質に結合したポリペプチドもしくはペプチド；細胞；組織；組織プリント；フィンガープリント、皮膚または毛髪；その他を含み得る。

20

【0091】

「実質的に精製された」とは、それらの天然の環境から取り出され、単離または分離され、かつそれらが天然で付随している他の成分を少なくとも約60%含まない、好ましくは約75%含まない、および最も好ましくは約90%含まない、核酸分子またはタンパク質を指す。

【0092】

「基質」とは、核酸分子またはタンパク質が結合する任意の剛体または半剛体の支持体を指し、ウェル、溝、ピン、チャネル、および孔を含む様々な表面型を有する、膜、フィルター、チップ、スライド、ウェハー、繊維、磁気または非磁気ビーズ、ゲル、キャピラリーまたは他の管類、プレート、ポリマー、および微粒子を含む。

30

【0093】

本明細書において用いられる場合、用語「傷害または神経系傷害」は、CNSの正常な機能に直接的または間接的に影響を及ぼす損傷を含むことを意図される。例えば、傷害は、網膜神経節細胞の損傷；外傷性脳傷害；脳卒中関連傷害；脳動脈瘤関連傷害；単麻痺、両麻痺、対麻痺、片麻痺および四肢麻痺を含む脊髄傷害；神経増殖性障害または神経障害性疼痛症候群であり得る。CNS障害または疾患の例は、TBI、脳卒中、震盪症(震盪後症候群を含む)、脳虚血、パーキンソン病、拳闘家認知症、ハンチントン病およびアルツハイマー病、クロイツフェルト・ヤコブ病、のような脳の神経変性疾患、放射能、電離または鉄プラズマへの曝露、神経系に作用する因子、シアン化物、毒性濃度の酸素により引き起こされる発作に続く脳傷害、CNSマラリアまたは抗マラリア剤での処置による神経毒性、トリパノゾーマ、マラリア病原体、ならびに他のCNS外傷を含む。

40

【0094】

本明細書において用いられる場合、用語「脳卒中」は、当技術分野において認められており、突然の意識、感覚の減退または喪失、および恍惚または脳の動脈の閉塞(例えば、血餅による)により引き起こされる随意運動を含むことが意図される。

【0095】

本明細書において用いられる場合、用語「外傷性脳損傷」は、当技術分野において認識

50

されており、頭への外傷性打撃が、しばしば頭蓋骨を貫通することなく、脳へ損傷を引き起こす状態を含むことが意図される。通常には、最初の外傷は、結果として、拡大する血腫、クモ膜下出血、脳水腫、頭蓋内圧亢進(ICP)、次に低脳血流(CBF)による重篤な二次事象へと導き得る脳低酸素症を生じ得る。

【0096】

本明細書において定義される場合の「神経系細胞」は、非限定的に、神経細胞、グリア細胞、乏突起膠細胞、ミクログリア細胞または神経幹細胞を含む、脳、中枢および末梢神経系に存在する細胞である。

【0097】

「ニューロン特異的またはニューロン濃縮化タンパク質」とは、神経系細胞に存在し、かつ、例えば、心筋細胞、骨格筋における筋細胞、肝細胞、腎細胞、および精巣における細胞のような非神経細胞に存在しないタンパク質として本明細書において定義される。神経タンパク質の非限定的例は、下の表1に示されている。

【0098】

本明細書において用いられる場合の「神経の(ニューロンの)欠陥、障害または疾患」は、非限定的に、中枢神経系の神経変性障害(パーキンソン;アルツハイマー)または自己免疫疾患(多発性硬化症);記憶喪失;長期および短期記憶障害;学習障害;自閉症、鬱病、良性健忘症、児童学習障害、閉鎖性頭部損傷(close head injury)および注意力欠如障害;脳の自己免疫疾患、ウイルス感染に対するニューロンの反応;脳損傷;鬱病;躁鬱病、統合失調症のような精神障害など;ナルコプレシー/睡眠障害(概日リズム障害、不眠症およびナルコレプシーを含む);神経の切断または神経損傷;脳脊髄神経索(CNS)の切断および脳または神経細胞への任意の損傷;AIDSに関連した神経学的欠損;チック(例えば、ジル・ド・ラ・トゥレット症候群(Gilles de la Tourette's syndrome));ハンチントン舞蹈病、統合失調症、外傷性脳損傷、耳鳴り、神経痛、特に三叉神経痛、神経障害性疼痛、糖尿病のような疾患における神経知覚不全を結果として生じる不適当なニューロン活性、MSおよび運動ニューロン疾患、運動失調、筋固縮(痙攣)および顎関節機能不全;対象における報酬欠乏症候群(Reward Deficiency Syndrome)(RDS)行動を含む、任意の神経学的障害を指す。

【0099】

本明細書において用いられる場合、「RDS」行動は、不安、怒りまたは物質に対する渴望を伴う個体の幸福の感情に関連した1つまたは複数の行動障害として現れる行動である。RDS行動は、アルコール依存症、SUD、喫煙、BMIまたは肥満症、病的賭博、炭水化物過食症、軸(axis)11診断、SAB、ADD/ADHD、CD、TS、SUDの家族歴、および肥満症を含む。すべてのこれらの行動、およびRDS行動、またはRDSに関連した神経学的経路に關与する遺伝子に関連しているとして本明細書において記載された他のものは、本発明の一部として、RDS行動として含まれる。さらに、RDS障害である多くの特定の障害について本明細書において用いられる臨床的用語の多くは、Diagnostic Criteria From DSM-IV(商標)、The American Psychiatric Association, Washington, D.C., 1994に見出される。

【0100】

大鬱病および双極性躁鬱病を含む情動障害は、一次臨床症状として気分の変化により特徴付けられる。大鬱病は、最も一般的な重大な精神病であり、正常な悲嘆、悲しみおよび失望、ならびに内科的疾患にしばしば伴う関連した不快または士気喪失と臨床的に区別されなければならない。鬱病は、激しい悲しみおよび絶望の感情、精神的緩慢さおよび集中力の喪失、悲観的心配、動揺および自己卑下により特徴付けられる。肉体的変化もまた生じ、不眠、食欲不振および体重減少、エネルギーおよび性欲の減少、ならびにホルモンの概日リズムの崩壊を含む。

【0101】

鬱病と同様に躁病も、一次症状として気分の変化により特徴付けられる。気分のこれらの2つの極端な状態のどちらも、混乱した思考および妄想知覚を有する精神病と同時に起こり得る。精神病は、二次症状として、気分の変化を有し得、診断における大きな混同を

10

20

30

40

50

引き起こすのは、この鬱病との重複である。精神病を含まない激しい気分の変化は、鬱病において頻繁に起こり、しばしば、不安を伴う。

【0102】

特定の病因とは無関係のパーキンソン病は、通常、人生の後半数十年に知らぬ間に現れる、慢性進行性中枢神経系障害である。その疾患は、徐々に増加する、意図的な動きにおける能力の欠如を生じる。それは、ふるえ、運動緩慢、硬直および姿勢の障害の4つの主要な臨床的特徴により特徴付けられる。しばしば、患者は付随する認知症を有する。特発性パーキンソン病において、通常、黒質、青斑における細胞、および他の脳の色素性ニューロンの損失、ならびに黒質から突き出す細胞の神経軸索末端におけるドーパミン含有量の減少がある。パーキンソン病がドーパミン欠乏の症候群であるという理解、およびその疾患の処置についての重要な薬物としてレボドパの発見は、薬物処置の原理としての役割を果たす、一連の関連した基本的かつ臨床的観察の論理的集大成であった。

10

【0103】

本明細書に用いられる場合、用語「統合失調症」とは、以下の少なくとも2つを含む精神医学的障害を指す：妄想、幻覚、支離滅裂な言語行動、極めて無秩序なまたは緊張病性行動、または陰性症状。(APA, 1994, Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (Fourth Edition), Washington, D.C.)。

【0104】

用語「アルツハイマー病」は、中年後半に始まり、典型的には5年～10年間で死に至る、記憶喪失、錯乱および見当識障害を呈する進行性精神衰退を指す。病理学的には、アルツハイマー病は、細胞内神経原線維、神経原線維濃縮体、およびアミロイドコアを有する顆粒状または繊維状好銀性塊から構成される老人斑の肥厚、膠着ならびにゆがみにより特徴付けられ得る。アルツハイマー病の診断の方法は当技術分野で公知である。例えば、Diagnosing Alzheimer's Disease: the National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke-Alzheimer's Disease and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (NINCDS-ADRDA)基準が、アルツハイマー病を診断するために用いられ得る(McKhann et al., 1984, Neurology 34:939-944)。患者の認知機能は、Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscaleにより評価され得る(ADAS-cog; Rosen et al., 1984, Am. J. Psychiatry 141:1356-1364)。

20

【0105】

本明細書において用いられる場合、用語「自閉症」は、病的な自己専念、社会的落伍、言語発達遅滞、常同的行為に特徴付けられる精神的内向型の状態を指す。

30

【0106】

本明細書において用いられる場合、用語「鬱病」は、処置の非存在下において少なくとも2週間続く、持続性の悲しい気分または活動における興味の喪失を含む臨床的症候群を指す。

【0107】

本明細書において用いられる場合、用語「良性健忘症」は、一度、理解され、覚えられ、かつ記憶に保存された情報を引き出すまたは思い出すことができない(例えば、自分が自分の鍵を置いた、または自分の車を駐車した場所を思い出すことができないこと)軽い傾向を指す。良性健忘症は、典型的には、年齢40歳後に個体に影響を及ぼし、Wechsler Memory Scaleのような標準評価手段により認知され得る(Russell, 1975, J. Consult Clin. Psychol. 43:800-809)。

40

【0108】

本明細書において用いられる場合、用語「児童学習障害」は、特定の子どもにより経験されるような、正常に機能しない学習能力を指す。

【0109】

本明細書において用いられる場合、用語「閉鎖性頭部損傷」は、状態が認知および記憶障害により特徴付けられ得る、頭部傷害または外傷後の臨床的状态を指す。そのような状態は、「一般的な医学的状态による健忘障害」としてDSM-IVに従って診断され得る。

50

【0110】

本明細書において用いられる場合、用語「注意力欠如障害」は、最も一般的には子どもに現れ、運動活動の増加および注意持続時間の減少により特徴付けられ得る障害を指す。注意力欠如障害(「ADD」)は、学校活動および家族関係に有害に影響を及ぼす、子どもにおいてよくある行動的学習障害である。症状および徴候は、活動過多(例えば、ADDHおよびAD/HD、DSM-IV)、衝動性、情動不安定、運動協調不能およびいくつかの知覚困難を含む。処置は、精神刺激薬を含んでいるが、それは、効果があるとはいえ、賛否両論であり、かつ不快、頭痛および発育遅延のような厄介な副作用を引き起こし得る。三環系抗鬱薬を含む他の薬物は、注意力を向上させるように思われるが、精神刺激薬より効果は少ない可能性がある。

10

【0111】

本明細書において用いられる場合、「細胞内局在性」とは、単一の神経細胞内の確定した細胞内構造を指す。図2において例示されるように、これらの細胞内で確定した構造は、例えば、樹状突起、軸索、髓鞘、シナプス前終末およびシナプス後部位由来の固有の神経タンパク質と適合している。それゆえに、これらの領域のそれぞれに固有のタンパク質の放出をモニターすることにより、脳傷害後の細胞内損傷をモニターかつ限定することができる。さらに、成熟ニューロンは、コリン作動性(ニコチン性およびムスカリン性(muca rinic))、グルタミン酸作動性、gaba作動性、セロトニン作動性、ドーパミン作動性のような一次神経伝達物質を融合する専用サブタイプに分化する。このニューロンサブタイプのそれぞれは、各固有の神経伝達物質系の合成、代謝ならびに輸送体および受容体に向けられるもののような固有の神経タンパク質を発現させる(表1)。

20

【0112】

本明細書において用いられる場合、「薬学的に許容される」成分とは、妥当な利益/リスク比と釣り合った、過度の副作用(毒性、刺激およびアレルギー性応答)なしのヒトおよび/または動物での使用に適しているものである。

【0113】

用語「患者」または「個体」は、本明細書において交換可能に用いられ、処置されるべき哺乳動物被験体を意味し、ヒト患者が好ましい。一部の場合では、本発明の方法は、実験動物に、獣医学適用に、ならびに、非限定的に、マウス、ラットおよびハムスターを含む齧歯類；ならびに霊長類を含む、疾患についての動物モデルの開発に見出す。

30

【0114】

本明細書において用いられる場合、「寛解する」または「処置」は、標準化された値にほぼ等しい、例えば、標準化された値と50%未満異なる、好ましくは、標準化された値と約25%未満異なる、より好ましくは、標準化された値と10%未満異なる、およびさらにより好ましくは、日常的な統計学的検定を用いて決定されるような標準化された値と有意には異なる、症状を指す。例えば、鬱病の寛解または処置は、例えば、非限定的に、気分の変化、激しい悲しみおよび絶望の感情、精神的緩慢、集中力の喪失、悲観的心配、動揺および自己卑下を含む鬱病の症状の軽減を含む。不眠、食欲不振および体重減少、エネルギーおよび性欲の減少を含む肉体的変化もまた、軽減され得、正常なホルモンの概日リズムが回復する。もう一つの例、本明細書において用いられる場合、用語「パーキンソン病を処置する」または「寛解させる」を用いる時、非限定的に、ふるえ、動作緩慢、硬直および姿勢の障害を含むパーキンソン病の症状の軽減を意味する。

40

【0115】

タンパク質生物マーカー

好ましい態様において、1つまたは複数の神経生物マーカーの検出は、神経系損傷および/またはニューロン疾患の診断となる。神経生物マーカーの例は、非限定的に、以下を含む：例えば、軸索タンパク質 - NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、NF-68(NF-L)；アミロイド前駆体タンパク質；樹状突起タンパク質 - -チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B、MAP-2C、タウ、ダイナミン-1(P21575)、ダイナクチン(Q13561)、P24；細胞体タンパク質 - UCH-L1(Q00981)、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、Thy

50

1.1、プリオン、ハンチントン；シナプス前性タンパク質 - シナプシン-1、シナプシン-2、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、GAP43、シナプトフィシン、シナプトタグミン(P21707)、シタキシン；シナプス後性タンパク質 - PSD95、PSD93、NMDA受容体(すべてのサブタイプを含む)；脱髄生物マーカー - ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、ミエリンプロテオリピドタンパク質；グリアタンパク質 - GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI-P04785)；神経伝達物質生物マーカー - コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ；ドーパミン作動性生物マーカー - チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー - ドーパミン - ヒドロキシラーゼ(DbH)；セロトニン作動性生物マーカー - トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー - グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー - GABAトランスアミナーゼ(4-アミノブチレート-2-ケトグルタレートトランスアミナーゼ[GABAT])、グルタミン酸カルボキシラーゼ(GAD25、44、65、67)；神経伝達物質受容体 - α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_2)、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_2)、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(例えば、GluR4)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT $_3$)、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7)；神経伝達物質輸送体 - ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、コリン輸送体(例えば、CHT1)、のような神経タンパク質；他のタンパク質生物マーカーは、非限定的に、ビメンチン(P31000)、CK-BB(P07335)、14-3-3- σ (P42655)、MMP2、MMP9を含む。

【0116】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーの組成物またはパネルは以下を含む：
 軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 β -チューブリン(P02551)、 γ -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ビメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3- σ (P42655))、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMPK-IV、SNAP-25、 α - β -SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100 β ；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX

3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア瘢痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン)；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_2)、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン-ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0117】

もう一つの好ましい態様において、生物マーカーのパネルは、各神経系細胞型からの少なくとも1つの生物マーカーを含む。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。組成物は以下を含む：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0118】

理論に拘束されることを望まないが、傷害に際して、細胞膜および血液脳関門の構造的ならびに機能的完全性が損なわれる。脳特異的および脳濃縮タンパク質は、細胞外間隙へ、続いて、CSFおよび血液へ、放出される。これは、図1における概略図に示されている。

【0119】

好ましい態様において、CSF、血液または他の生物体液における少なくとも1つの神経タンパク質の検出は、脳傷害の重症度および/または治療の進行のモニタリングの診断となる。好ましくは、神経タンパク質は、傷害の初期中に検出される。正常な健康個体と比較した、神経系傷害、ニューロンの障害を患っている患者における神経タンパク質、それらの断片または誘導体の量の増加は、神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断と

なる。

【0120】

もう一つの好ましい態様において、CSF、血液または他の生物体液における少なくとも一つの神経タンパク質の検出は、例えば、脳卒中、脊髄損傷、またはアルコールもしくは薬物乱用(例えば、エクスタシー、メタンフェタミンなど)により引き起こされる神経毒性のような様々なCNS侵襲後の傷害の重症度の診断となる。

【0121】

好ましい態様において、脳傷害、神経系傷害および/または神経系障害の生物マーカーは、神経系(CNSおよびPNS)由来のタンパク質を含む。CNSは、脳傷害、神経系傷害、神経系障害などの診断において好ましい生物マーカーである、多くの脳特異的および脳濃縮化タンパク質を含む。非限定的例は、表1および図2に示されている。例えば、神経特異的生物マーカーは、軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMKP-IV、SNAP-25、 α - β -SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100 β ；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア瘢痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3- β コシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β (2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば

、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7) ; 神経伝達物質輸送体 : ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1; BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1) ; コリン作動性生物マーカー : アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT] ; ドーパミン作動性生物マーカー : チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32 ; ノルアドレナリン作動性生物マーカー : ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH) ; アドレナリン作動性生物マーカー : フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT) ; セロトニン作動性生物マーカー : トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH) ; グルタミン酸作動性生物マーカー : グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素 ; GABA作動性生物マーカー : GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2を含み得る。さらになお、GFAPおよびタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)のようなタンパク質は、CNSのグリア細胞において合成されるのみであり、CNSへの損傷の程度をさらに検出および診断するために用いられる特徴である。

10

【0122】

もう一つの好ましい態様において、本発明は、細胞内レベルにおけるCNS、PNSおよび/または脳傷害への損傷の量的検出を提供する。傷害の型および重症度に依存して、ニューロンは、特定の細胞領域において損傷を起こし得る。例として、例えば、軸索タンパク質、それらの断片および誘導体のような特定の生物マーカーの検出は、非限定的に、以下を含み、軸索の損傷と樹状突起の損傷との間を区別する : NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、NF-68(NF-L)など。樹状突起タンパク質、それらのペプチド、断片および誘導体の非限定的な例は以下を含むが、それらに限定されない : α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B、MAP-2C、タウ、ダイナミン-1(P21575)、ダイナクチン(Q13561)、P24(神経特異的MAP)。さらになお、異なる生物マーカーの検出は、例えば、軸索または樹状突起の損傷間を区別するだけでなく、シナプス性病態、シナプス前終末およびシナプス後肥厚の要素への特異的傷害、の評価を可能にする。検出が傷害の位置を検出する、各細胞、細胞内および解剖学的位置からの生物マーカーの例について、表1を参照されたい。

20

30

【0123】

好ましい態様において、異なる解剖学的インピボの位置における神経系傷害を示す生物マーカーは、非限定的に、以下を含む : 海馬 : スタスミン、ヒポカルシン、SCG10 ; 小脳 : プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35 ; 脳皮質 : コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物 ; 視床 : CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ ; 視床下部 : オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド) ; 脳梁 : MBP、MOG、PLP、MAG ; 脊髄 : シュワン細胞ミエリタンパク質 ; 線条体 : ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体) ; 末梢性神経節 : Gadd45a ; 末梢神経線維(感覚+運動) : ペリフェリン、末梢性ミエリタンパク質22(AAH91499) ; 他のニューロン特異的タンパク質 : PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンド Ca^{2+} 結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン。例えば、特定の解剖学的位置における傷害を測定するために、スタスミンおよび/またはヒポカルシンおよび/またはSCG10の検出は、海馬における傷害の診断となる。プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)および/またはカルピンジンD9Kおよび/またはカルピンジンD28K(NP_114190)および/または小脳CaBP、スポット35の検出は、小脳における傷害の診断となる。スタスミンおよび/またはヒポカルシンおよび/またはSCG10プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)および/またはカルピンジンD9Kおよび/またはカルピンジンD28K(NP_114190)および/または小脳CaBP、スポット35のような生物マーカーの組み合わせの検出は、海馬および小脳における傷害の診断となる。このように、生物マーカー

40

50

の1つまたは複数の組み合わせの検出は、神経系傷害の位置の診断となる。

【0124】

もう一つの好ましい態様において、例えば $\mu\text{g/ml}$ で、検出されるマーカーの量は、損傷または傷害の程度の診断となる。各生物マーカーの定量化は、明細書および後に続く実施例に記載されている。アッセイ法は、イムノアッセイ法(ELISAのような)、分光測光法、HPLC、SELDI、バイオチップなどを含む。それゆえに、例えば、10 $\mu\text{g/ml}$ のスタスミンおよび0.001 $\mu\text{g/ml}$ のCaBPは、主要な傷害が海馬に対してであり、いくらかの傷害が小脳に対してであることの診断となる。細胞内位置からの生物マーカーの検出は、どの細胞が傷害されているかの診断となる。例えば、軸索生物マーカーおよび樹状突起生物マーカーおよびミクログリア生物マーカーの検出は、傷害された細胞の型の診断となる。下記に考察されているように、正常な個体と比較したそれぞれの定量化は、傷害の程度の診断となる。

10

【0125】

もう一つの好ましい態様において、特定の生物マーカーの検出は、ニューロンおよびグリアは異なるタンパク質を有するため、傷害後に冒された特定の細胞型の診断となる。例えば、グリアタンパク質、それらのペプチド、断片および誘導体の検出は、グリア細胞損傷の診断となる。グリアタンパク質の例は、非限定的に、以下を含む：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100。

【0126】

CNS傷害後にこれらのタンパク質のレベルを検出およびモニターする能力は、臨床医が(1)様々なCNS傷害を有する患者における傷害重症度のレベルを測定すること、(2)これらの細胞性変化を誘発し得る二次CNS傷害の徴候について患者をモニターすること、および(3)CSFまたは血液におけるこれらのタンパク質の検査により治療の効果をモニターすることを可能にすることにより、診断能力の向上を提供する。代用の生物マーカーについての迅速な診断が疾患を処置するためにとられる手順にとって貴重であることが立証される、他の器官に基づいた疾患と違って、傷害の重症度、傷害の解剖学的および細胞性病態、適切な医学的管理および処置の実施を決定するのに助けるために定量化できる神経化学的マーカーを医師に提供し得る、そのような迅速で、最も信頼のおける診断検査は、外傷性または虚血性脳傷害については存在しない。

20

【0127】

例証的例において、決して本発明を限定または解釈するつもりはないが、外傷性脳損傷(TBI)後にCSFにおいてどの脳特異的および脳濃縮化タンパク質が上昇しているかの同定は、例えば、脳傷害、脳傷害の程度、細胞性損傷の型、および細胞性損傷の程度の診断となる。さらになお、特定の脳特異的および脳濃縮化タンパク質、それらの断片および誘導体の検出は、細胞性損傷の型および程度の診断となる。例えば、傷害後48時間目のCSFにおける様々な脳特異的および脳濃縮化タンパク質のレベルの増加が検出された。具体的には、細胞体タンパク質ユビキチンC末端加水分解酵素L1(UCH-L1)、樹状突起タンパク質p24、および α -シヌクレイン、シナプス前性タンパク質のレベルの上昇が傷害後検出された。

30

【0128】

現在のところ存在している製品と比較して、本発明は、いくつかの優れた利点および利益を提供する。第一に、ニューロンの生物マーカーの同定は、コンピュータ断層撮影法(CT)および磁気共鳴映像法(MRI)のような既存の診断装置より、傷害重症度のより迅速およびより安価な診断を提供する。本発明はまた、細胞内レベル(すなわち、軸索対樹状突起)におけるCNSへの損傷の定量的検出およびハイコンテンツ(high content)評価を可能にする。本発明はまた、冒された特定の細胞型(例えば、ニューロン対グリア)の同定を可能にする。さらに、これらの脳特異的および脳濃縮化タンパク質のレベルは、市場におけるものに比べ、傷害重症度のレベルに関するより正確な情報を提供する。

40

【0129】

もう一つの好ましい態様において、被験体における神経細胞損傷は、(a)損傷した神経細胞を有すると疑われる被験体から単離された生体試料を供給する段階；(b)1つまたは複

50

数の神経タンパク質から選択される少なくとも1つのマーカーの存在または量を試料において検出する段階；および(c)マーカーの存在または量を、被験体における神経細胞損傷の存在または型と関連させる段階により分析される。好ましくは、インビトロ培養物における、またはインサイチューの動物被験体における、神経細胞、グリア細胞、乏突起神経膠細胞、ミクログリア細胞または神経幹細胞を含む中枢および末梢神経系に存在する細胞のような神経系細胞は、心筋細胞、骨格筋における筋細胞、肝細胞、腎細胞、および睾丸における細胞のような非ニューロンの細胞と比較して、より高いレベルの神経タンパク質(「ニューロン特異的またはニューロンに濃縮された」タンパク質；例は表1に概要を示されている)を発現させる。好ましくは、試料は、神経系細胞を含む、例えば、中枢神経系または末梢神経系組織の生検は、本発明に用いるのに適した生体試料である。さらに、神経系への傷害(脳傷害のような)後、神経系細胞膜が損なわれ、これらの神経タンパク質の流出をまず、細胞外液または間隙へ、ならびに脳脊髄液へ、ならびに最終的には、循環血液(損なわれた血液脳関門により援助されるような)および他の生物体液(例えば、尿、汗、唾液など)に、導く。従って、他の適した生体試料は、非限定的に、そのような細胞またはこれらの細胞から分泌された液体を含む。被験体由来の脳脊髄液、血液、血漿、血清、唾液および尿のような生物体液を得ることは、典型的には、固形組織生検試料を得ることより、ずっと侵襲性および外傷性は少ない。このように、生物体液である試料が本発明に用いるのに好ましい。特に、CSFは、神経系に直接接触しており、かつ容易に得られるため、被験体において神経損傷を検出することにとって好ましい。

10

20

30

40

50

【0130】

好ましい態様において、神経細胞損傷の検出は、以下を含む1つまたは複数の生物マーカーの検出を含む：軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3 σ (P42655))、SM22 α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPKII) α 、 β 、 γ 、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100 β ；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア癩痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：ブルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX

-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド);脳梁:MBP、MOG、PLP、MAG;脊髄:シュワン細胞ミエリンタンパク質;線条体:ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体);末梢性神経節:Gadd45a;末梢神経線維(感覚+運動):ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499);他のニューロン特異的タンパク質:PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン);神経伝達物質受容体:NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7);神経伝達物質輸送体:ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1;BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1);コリン作動性生物マーカー:アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT];ドーパミン作動性生物マーカー:チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32;ノルアドレナリン作動性生物マーカー:ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH);アドレナリン作動性生物マーカー:フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT);セロトニン作動性生物マーカー:トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH);グルタミン酸作動性生物マーカー:グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素;GABA作動性生物マーカー:GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

10

20

30

40

50

【0131】

もう一つの好ましい態様において、神経系損傷の検出は、各神経系細胞型からの少なくとも1つの生物マーカーを含む1つまたは複数の生物マーカーの検出を含む。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。生物マーカーの組成物またはパネルは以下を含む: IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、IIIチューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0132】

生体試料は、通常の技術により被験体から得られ得る。例えば、CSFは、腰椎穿刺により得られ得る。血液は、静脈穿刺により得られ得るが、血漿および血清は、公知の方法により全血を分画することにより得られ得る。固形組織試料を得るための外科的技術は、当該技術分野において周知である。例えば、神経系組織試料を得るための方法は、F. Meyer, Churchill Livingstone, 1999によるAtlas of Neurosurgery: Basic Approaches to Cranial and Vascular Procedures; David G.T. Thomas, WB Saunders Co., 1993によるStereotactic and Image Directed Surgery of Brain Tumors, 1st ed.; およびL.N. Sekhar and E. De Oliveira, 1st ed., Thieme Medical Publishing, 1999によるCranial Microsurgery: Approaches and Techniquesのような標準的な神経外科学テキストに記載されている。脳組織を得て、分析するための方法は、Belay et al., Arch. Neurol. 58: 1673-1678 (2001); およびSeijo et al., J. Clin. Microbiol. 38:3892-3895 (2000)にも記載されている。

【0133】

例えば、表1に列挙されているもののような神経タンパク質を発現させる任意の動物は、生体試料が得られる被験体として用いられ得る。好ましくは、被験体は、例えば、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、霊長類、ラット、マウスのような哺乳動物、ならびに魚、鳥および爬虫類のような他の脊椎動物である。より好ましくは、被験体はヒトである。特に好ましいのは、外傷性侵襲(銃創、自動車事故、スポーツ事故、揺さぶられっ子症候群)により引き起こされる脳傷害、虚血性事象(例えば、脳卒中、脳出血、心臓停止)、脊髄損傷、神経変性障害(アルツハイマー病、ハンチントン病およびパーキンソン病；プリオン関連疾患；痴呆の他の型および脊髄変性のような)、癲癇、薬物乱用(例えば、アンフェタミン、メタンフェタミン/覚醒剤(Speed)、エクスタシー/MDMA、またはエタノールおよびコカインから)、ならびに糖尿病性神経障害、化学療法による神経障害および神経障害性疼痛、末梢神経損傷または萎縮症(ALS)、多発性硬化症(MS)のような末梢神経系病態の犠牲者のような、外傷性もしくは非外傷性神経系傷害を有していると疑われる、または発症するリスクがある被験体である。

10

【 0 1 3 4 】

細胞内ニューロンマーカー

軸索タンパク質

- α IIスペクトリン(およびSPDB)-1
- NF-68 (NF-L) - 2
- タウ-3
- β II、IIIスペクトリン
- NF-200 (NF-H)
- NF-160 (NF-M)
- アミロイド前駆体タンパク質
- α インターネキシン

10

樹状突起タンパク質

- β III-チューブリン-1
- p24微小管関連タンパク質-2
- α -チューブリン(P02551)
- β -チューブリン(P04691)
- MAP-2A/B - 3
- MAP-2C -3
- スタスミン-4
- ダイナミン-1(P21575)
- フォセイン
- ダイナクチン(Q13561)
- ビメンチン(P31000)
- ダイナミン
- プロフィリン
- コフィリン1、2

20

30

40

細胞体タンパク質

- UCH-L1 (Q00981)-1
- グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2
- PEBP (P31044)
- NSE (P07323)
- CK-BB (P07335)
- Thy 1.1
- プリオンタンパク質
- ハンチンチン
- 14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-エプソロン(P42655))
- SM22- α
- カルグラヌリンAB
- α -シヌクレイン(P37377)
- β -シヌクレイン(Q63754)
- HNP 22

神経核タンパク質

- NeuN - 1
- S/G(2)核自己抗原(SG2NA)
- ハンチンチン

シナプス前性タンパク質

- シナプトフィシン-1
- シナプトタグミン(P21707)
- シナプトジャニン-1(Q62910)
- シナプトジャニン-2
- シナプシン1(シナプシン-Ia)
- シナプシン2(Q63537)
- シナプシン3
- GAP43

10

20

30

40

- バスーン (Bassoon) (NP_003449)
- ピッコロ (Piccolo) (アクゾニン) (NP_149015)
- シンタキシン
- CRMP1, 2
- アンフィフィシン-1 (NP_001626)
- アンフィフィシン-2 (NP_647477)

シナプス後性タンパク質

- PSD95 - 1
- NMDA-受容体 (およびすべてのサブタイプ)-2
- PSD93
- AMPA-カイニン酸受容体 (すべてのサブタイプ)
- mGluR (すべてのサブタイプ)
- カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII (CAMPK) - α 、 β 、 γ
- CaMPK-IV
- SNAP-25
- a-/b-SNAP

10

20

30

神経細胞サブタイプバイオマーカー

ミエリン乏突起神経膠細胞

- ミエリン塩基性タンパク質 (MBP) および断片
- ミエリンプロテオリピドタンパク質 (PLP)
- ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質 (MOSP)
- ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質 (MOG)
- ミエリン関連タンパク質 (MAG)
- 乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質
-

40

グリアタンパク質バイオマーカー

- GFAP (P47819)
- タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ (PDI)-P04785
- ニューロカルシン δ
- S100 β

ミクログリアタンパク質バイオマーカー

- Iba1
- OX-42
- OX-8
- OX-6
- ED-1
- PTPアーゼ (CD45)
- CD40; CD68
- CD11b
- フラクタルキン (CX3CL1) およびフラクタルキン受容体 (CX3CR1)
- 5-d-4抗原

シュワン細胞マーカー

- シュワン細胞ミエリンタンパク質

グリア瘢痕

- テネイシン

解剖学的脳バイオマーカー (CNS + PNS)

海馬

- スタスミン
- ヒポカルシン
- SCG10

小脳

10

20

30

40

- プルキンエ細胞タンパク質-2 (Pcp2)
- カルビンジンD9K
- カルビンジンD28K (NP_114190)
- 小脳CaBP、スポット35

脳皮質

- コルテキシン-1 P60606
- H-2Z1遺伝子産物

10

視床

- CD15 (3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン) エピトープ

視床下部

- オレキシン受容体 (OX-1RおよびOX-2R)-食欲
- オレキシン (視床下部特異的ペプチド)

20

脳梁

- MBP,
- MOG,
- PLP
- MAG

30

脊髄

- シュワン細胞ミエリンタンパク質

線条体

- ストリアチン
- Rhes (線条体に濃縮されたRas相同体)

40

末梢性神経節

- Gadd45a

末梢神経線維 (感覚+運動)

- ペリフェリン

- 末梢性ミエリタンパク質22(AAH91499)

他のニューロン特異的タンパク質

- PH8(S セロトニン作動性、ドーパミン作動性)
- PEP-19、ニューロン特異的タンパク質
- ニューロカルシン(NC)
- ニューロン特異的EF-ハンドCa²⁺-結合タンパク質
- エンセファロプシン
- ストリアチン
- SG2NA
- ジネジン
- リカバリン
- ビシニン
-

10

20

神経伝達物質受容体および輸送体に基づいたニューロンサブタイプ

神経伝達物質受容体

- NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)
- グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4))
- β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β (2))
- α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α (2c))
- GABA受容体(例えば、GABA(B))
- 代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)
- 5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))
- ドーパミン受容体(例えば、D4)
- ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)
- ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7)

30

40

神経伝達物質輸送体

- ノルエピネフリン輸送体 (NET)
- ドーパミン輸送体 (DAT)
- セロトニン輸送体 (SERT)
- 小胞輸送体タンパク質 (VMAT1およびVMAT2)
- GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体
(VIAAT/VGAT)
- グルタミン酸輸送体 (例えば、GLT1)
- 小胞アセチルコリン輸送体
- 小胞グルタミン酸輸送体1
[VGLUT1; BNPI] および VGLUT2
- コリン輸送体 (例えば、CHT1)

10

20

神経伝達物質系に基づいたニューロンサブタイプ

コリン作動性バイオマーカー

- アセチルコリンエステラーゼ
- コリンアセチルトランスフェラーゼ [ChAT]

30

ドーパミン作動性バイオマーカー

- チロシンヒドロキシラーゼ (TH)
- ホスホ-TH
- DARPP32
- ノルアドレナリン作動性バイオマーカー
- ドーパミンβ-ヒドロキシラーゼ (DbH)

40

アドレナリン作動性バイオマーカー

- フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ (PNMT)
- セロトニン作動性バイオマーカー

- トリプトファンヒドロキシラーゼ (TrH)

グルタミン酸作動性バイオマーカー

- グルタミンナーゼ
- グルタミン合成酵素

GABA作動性バイオマーカー

- GABAトランスアミナーゼ [GABAT]
- GABA-B-R2

10

【0135】

上記のように、本発明は、1つもしくは複数の神経タンパク質の存在または量を神経細胞傷害の重症度および/または型と関連させる段階を提供する。神経タンパク質、それらのペプチド、断片、誘導体または改変型の量は、傷害損傷が重症であればあるほど、次により多量の神経タンパク質を生体試料(例えば、CSF)に蓄積させる神経細胞の数が多いように、神経組織傷害の重症度に直接関連する。神経細胞傷害が、アポトーシス性、腫脹性(壊死性)または2型(自己貧食性)のいずれの細胞死を引き起こすかは、異なる細胞死表現型にตอบสนองして生物体液へ放出される固有のタンパク質を検査することにより決定され得る。固有のタンパク質は、神経系を含む多くの細胞型から検出される。例えば、アストログリア、乏突起神経膠細胞、ミクログリア細胞、シュワン細胞、線維芽細胞、神経芽細胞、神経幹細胞および成熟ニューロンである。さらになお、成熟ニューロンは、コリン作動性(ニコチン性およびムスカリン性)、グルタミン酸作動性、GABA作動性、セロトニン作動性、ドーパミン作動性のような一次神経伝達物質を融合する専用サブタイプへ分化する。このニューロンのサブタイプのそれぞれは、各固有の神経伝達物質系の合成、代謝ならびに輸送体および受容体についての専用のものである固有の神経タンパク質を発現させる(表1)。最後に、単一神経細胞内において、固有の神経タンパク質と適合した細胞内に限定された構造がある(樹状突起、軸索、髄鞘、シナプス前終末およびシナプス後肥厚)。これらの領域のそれぞれに固有のタンパク質の放出をモニターすることにより、細胞内損傷は、脳傷害後、モニターされ、限定され得る(図2)。

20

30

【0136】

本発明の生物マーカーは、任意の手段により試料において検出され得る。生物マーカーを検出するための方法は、後に続く材料および方法ならびに実施例において詳細に記載されている。例えば、イムノアッセイは、非限定的に、ウェスタンブロットのような技術を用いる競合および非競合アッセイ系、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着検定法)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫拡散アッセイ、蛍光イムノアッセイなどを含む。そのようなアッセイ法は、当技術分野において、日常的であり、かつ周知である(例えば、Ausubel et al, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New Yorkを参照、これは全体が参照により本明細書に組み入れられる)。例示的なイムノアッセイは、以下で簡単に記載されている(しかし、限定することを意図しない)。

40

【0137】

免疫沈降プロトコールは、一般的に、細胞の集団を、タンパク質ホスファターゼおよび/またはプロテアーゼインヒビター(例えば、EDTA、PMSF、アプロチニン、バナジウム酸ナトリウム)を追加したRIPA緩衝液(1%NP-40またはトリトンX-100、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%SDS、0.15 M NaCl、pH 7.2における0.01 M リン酸ナトリウム、1%トラシロール(Trasylol))のような溶解緩衝液に溶解する段階、対象となる抗体を細胞可溶化液へ添加する段階、4 で一定時間(例えば、1~4時間)、インキュベートする段階、プロテ

50

ンAおよび/またはプロテインGセファロースビーズを細胞可溶化液へ添加する段階、4で約1時間またはそれ以上、インキュベートする段階、溶解緩衝液においてビーズを洗浄する段階、ビーズをSDS/試料緩衝液に再懸濁する段階を含む。特定の抗原を免疫沈降する抗体の能力は、例えば、ウェスタンブロット分析により評価され得る。当業者は、抗体の抗原への結合を増加させ、かつバックグラウンドを減少させるために改変され得るパラメーターに関して精通しているものと思われる(例えば、細胞可溶化液をセファロースビーズで事前にクリアランスする)。免疫沈降プロトコールに関するさらなる考察について、例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 10.16.1を参照されたい。

【0138】

ウェスタンブロット分析は、一般的に、タンパク質試料を調製する段階、ポリアクリルアミドゲル(例えば、抗原の分子量に依存して8%~20%SDS-PAGE)におけるタンパク質試料の電気泳動、タンパク質試料をポリアクリルアミドゲルからニトロセルロース、PVDFまたはナイロンのような膜へ転写する段階、膜をブロッキング溶液(例えば、3%BSAまたは脱脂乳を含むPBS)においてブロッキングする段階、膜を洗浄緩衝液(例えば、PBS-Tween20)において洗浄する段階、ブロッキング緩衝液に希釈された一次抗体(対象となる抗体)で膜をブロッキングする段階、膜を洗浄緩衝液において洗浄する段階、ブロッキング緩衝液に希釈された、酵素基質(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)または放射性分子(例えば、 ^{32}P または ^{125}I)に結合した二次抗体(一次抗体を認識する、例えば、抗ヒト抗体)で膜をブロッキングする段階、膜を洗浄緩衝液において洗浄する段階、および抗原の存在を検出する段階を含む。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように、およびバックグラウンドノイズを低下させるように、改変され得るパラメーターに関して精通しているものと思われる。ウェスタンブロットプロトコールに関するさらなる考察について、例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 10.8.1を参照されたい。

【0139】

ELISAは、抗原(すなわち、神経生物マーカー)を調製する段階、96ウェルのマイクロタイタープレートのウェルを抗原でコーティングする段階、酵素基質(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ)のような検出可能な化合物に結合した対象となる抗体をウェルに添加し、一定時間インキュベートする段階、および抗原の存在を検出する段階を含む。ELISAにおいて、対象となる抗体は、検出可能な化合物に結合している必要はない;その代わりとして、検出可能な化合物に結合した二次抗体(対象となる抗体を認識する)がウェルに添加され得る。さらに、ウェルを抗原でコーティングする代わりに、抗体がウェルへコーティングされ得る。この場合、検出可能な化合物に結合した二次抗体は、対象となる抗原のコーティングされたウェルへの添加後、加えられ得る。当業者は、検出されるシグナルを増加させるように改変され得るパラメーター、および当技術分野において公知のELISAの他のバリエーションに関して精通しているものと思われる。ELISAに関するさらなる考察について、例えば、Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York 11.2.1を参照されたい。

【0140】

新しいマーカーの同定およびマーカーの定量

好ましい態様において、生体試料は、神経系傷害を有する患者から得られる。他の患者および対照被験体(すなわち、類似した年齢、性別、身体的状態の正常な健康個体)由来の生物マーカーを含む生体試料は、比較として用いられる。生体試料は、上で考察されているように抽出される。好ましくは、試料は、生物マーカーの検出の前に調製される。典型的には、調製は、試料の分画、および生物マーカーを含むことが決定された画分の収集を含む。事前分画の方法は、例えば、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ヘパリンクロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逐次抽出、ゲル電気泳動および液体クロマトグラフィーを含む。分析物はまた、検出の前に修飾

10

20

30

40

50

され得る。これらの方法は、さらなる分析のために試料を単純化するために有用である。例えば、分析の前に血液からアルブミンのような高存在量のタンパク質を除去するために有用であり得る。

【0141】

一つの態様において、試料は、サイズ排除クロマトグラフィーを用いて試料におけるタンパク質のサイズによって事前分画され得る。利用できる試料の量が少ない生体試料について、好ましくは、サイズ選択スピンカラムが用いられる。一般的に、カラムから溶出される第一画分(「画分1」)は、最高パーセンテージの高分子量タンパク質を有する；画分2は、より低いパーセンテージの高分子量タンパク質を有する；画分3はよりいっそう低いパーセンテージの高分子量タンパク質を有する；画分4は最低量の大きなタンパク質を有する；などである。各画分は、その後、マーカーの検出のために、イムノアッセイ、気相イオン分光測定法などにより分析され得る。

10

【0142】

もう一つの態様において、試料は、陰イオン交換クロマトグラフィーにより事前分画され得る。陰イオン交換クロマトグラフィーは、それらの電荷特性に従っておおむね試料におけるタンパク質の事前分画を可能にする。例えば、Q陰イオン交換樹脂が用いられ得(例えば、Q HyperD F, Biosepra)、試料は、異なるpHを有する溶離液で連続的に溶出され得る。陰イオン交換クロマトグラフィーは、より負に帯電している試料における生物マーカーの、他の型の生物マーカーからの分離を可能にする。高pHを有する溶離液で溶出されるタンパク質は、弱く負に帯電している可能性が高く、低pHを有する溶離液で溶出される画分は、強く負に帯電している可能性が高い。従って、試料の複雑性を低減することに加えて、陰イオン交換クロマトグラフィーは、それらの結合特性に従ってタンパク質を分離する。

20

【0143】

さらにもう一つの態様において、試料は、ヘパリンクロマトグラフィーにより事前分画され得る。ヘパリンクロマトグラフィーは、ヘパリンとの親和性相互作用および電荷特性に基づいて、同様に、試料におけるマーカーの事前分画を可能にする。硫酸化ムコ多糖であるヘパリンは、正に帯電した部分を有するマーカーを結合し、試料は、異なるpHまたは塩濃度を有する溶離液で連続的に溶出され得る。低pHを有する溶離液で溶出されたマーカーは、弱く正に帯電している可能性がより高い。高pHを有する溶離液で溶出されたマーカーは、強く正に帯電している可能性がより高い。従って、ヘパリンクロマトグラフィーもまた、試料の複雑性を低減し、それらの結合特性に従ってマーカーを分離する。

30

【0144】

さらにもう一つの態様において、試料は、特定の特性を有する、例えば、グリコシル化されている、タンパク質を単離することにより事前分画され得る。例えば、CSF試料は、レクチンクロマトグラフィーカラム(糖への高親和性を有する)に試料を通すことにより分画され得る。グリコシル化タンパク質は、レクチンカラムに結合し、非グリコシル化タンパク質は、流れを通過する。グリコシル化タンパク質は、その後、糖、例えば、N-アセチル-グルコサミン、を含む溶離液でレクチンカラムから溶出され、さらなる分析に利用できる。

40

【0145】

このように、試料におけるタンパク質の結合性質、または試料におけるタンパク質の特性に基づいて試料の複雑性を低減させるための多くの方法がある。

【0146】

さらにもう一つの態様において、試料は、逐次抽出プロトコルを用いて分画され得る。逐次抽出において、試料は、試料から異なる型の生物マーカーを抽出するために一連の吸着剤に曝される。例えば、試料は、特定のタンパク質を抽出するために第一吸着剤に適用され、非吸着性タンパク質(すなわち、第一吸着剤に結合しなかったタンパク質)を含む溶離液が収集される。その後、画分は、第二吸着剤に曝される。これはさらに、画分から様々なタンパク質を抽出する。この第二画分は、その後、第三吸着剤に曝されるなどする

50

。

【0147】

任意の適した材料および方法が、試料の逐次抽出を行うために用いられ得る。例えば、異なる吸着剤を含む一連のスピンカラムが用いられ得る。もう一つの例において、底に異なる吸着剤を含むマルチウェルが用いられ得る。もう一つの例において、逐次抽出は、気相イオン分光計における使用に適応したプローブ上で行われ得、プローブ表面は、生物マーカーを結合するための吸着剤を含む。この態様において、試料は、プローブ上の第一吸着剤に適用され、その後、溶離液で洗浄される。第一吸着剤に結合しないマーカーは、溶離液で除去される。画分にあるマーカーは、プローブ上の第二吸着剤に適用され得るなどする。気相イオン分光計プローブ上で逐次抽出を行う利点は、逐次抽出プロトコルのあらゆる段階における様々な吸着剤に結合するマーカーが、気相イオン分光計を用いて直接的に分析され得ることである。

10

【0148】

さらにもう一つの態様において、試料における生物マーカーは、高分解能電気泳動、例えば、一次元または二次元ゲル電気泳動、により分離され得る。マーカーを含む画分は、単離され、気相イオン分光測定法によりさらに分析され得る。好ましくは、二次元ゲル電気泳動が、1つまたは複数のマーカーを含む生物マーカーのスポットの二次元アレイを作成するために用いられ得る。例えば、Jungblut and Thiede, Mass Spectr. Rev. 16:145-162 (1997)を参照。

【0149】

二次元ゲル電気泳動は、当技術分野において公知の方法を用いて行われ得る。例えば、Deutscher ed., Methods In Enzymology vol. 182を参照。典型的には、試料における生物マーカーは、試料における生物マーカーが、例えば、それらの正味荷電がゼロであるスポット(すなわち、等電点)に達するまで、pH勾配において分離される等電点電気泳動法により、分離される。この第一分離段階は、結果として、生物マーカーの一次元アレイを生じる。一次元アレイにおける生物マーカーは、第一分離段階に用いられたものとは一般的に異なる技術を用いてさらに分離される。例えば、第二次元において、等電点電気泳動法により分離された生物マーカーは、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下でのポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)のようなポリアクリルアミドゲルを用いてさらに分離される。SDS-PAGEゲルは、生物マーカーの分子量に基づいたさらなる分離を可能にする。典型的には、二次元ゲル電気泳動法は、複雑な混合物内の1000 Da~200,000 Daの範囲である分子量において化学的に異なる生物マーカーを分離できる。

20

30

【0150】

二次元アレイにおける生物マーカーは、当技術分野において公知の任意の適した方法を用いて検出され得る。例えば、ゲルにおける生物マーカーは、標識または染色され得る(例えば、クマーシーブルーまたは銀染色)。ゲル電気泳動が本発明の1つまたは複数のマーカーの分子量に対応するスポットを生じる場合には、スポットは、濃度測定分析または気相イオン分光測定法によりさらに分析され得る。例えば、スポットは、ゲルから切除され、気相イオン分光測定法により分析され得る。または、生物マーカーを含むゲルは、電界を加えることにより不活性膜へ転移され得る。その後、マーカーの分子量におよそ対応する膜上のスポットは、気相イオン分光測定法により分析され得る。気相イオン分光測定法において、スポットは、MALDIまたはSELDIのような任意の適した技術を用いて分析され得る。

40

【0151】

気相イオン分光測定法分析の前に、スポットにおける生物マーカーを、プロテアーゼ(例えば、トリプシン)のような切断試薬を用いてより小さな断片へ切断することが望ましい可能性がある。生物マーカーの小さな断片への消化は、必要に応じてマーカーのアイデンティティを決定するために用いられ得る、スポットにおける生物マーカーの質量フィンガープリントを提供する。

【0152】

50

さらにもう一つの態様において、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)は、試料における生物マーカーの混合物を極性、電荷およびサイズのようなそれらの異なる物理的性質に基づいて分離するために用いられ得る。HPLC機器は、典型的には、移動相の容器、ポンプ、注射器、分離カラム、および検出器からなる。試料における生物マーカーは、カラム上に試料のアリコート注入することにより分離される。混合物における異なる生物マーカーは、移動性液体相と固定相の間でのそれらの分配する挙動における違いにより、異なる速度でカラムを通過する。1つまたは複数のマーカーの分子量および/または物理的性質に対応する画分が収集され得る。画分は、その後、マーカーを検出するために気相イオン分光測定法により分析され得る。

【0153】

任意で、マーカーは、その分解能を向上させるため、またはそのアイデンティティを決定するために、分析の前に修飾され得る。例えば、マーカーは、分析の前にタンパク質分解消化を受け得る。任意のプロテアーゼが用いられ得る。マーカーを別々の数の断片へ切断する可能性が高いトリプシンのようなプロテアーゼが特に有用である。消化の結果として生じる断片は、マーカーについてのフィンガープリントとして機能し、それにより、それらの検出を間接的に可能にする。これは、問題になっているマーカーについて混同される可能性がある類似した分子量を有するマーカーがある場合、特に有用である。また、タンパク質分解断片化は、より小さなマーカーが質量分析法により、より容易に分解されるため、高分子量マーカーについて有用である。もう一つの例において、生物マーカーは、検出分解能を向上させるために修飾され得る。例えば、ノイラミニダーゼは、陰イオン性吸着剤への結合を向上させるために、および検出分解能を向上させるために、糖タンパク質から末端シアル酸残基を除去するために用いられ得る。もう一つの例において、マーカーは、分子マーカーに特異的に結合し、さらにそれらを区別する、特定の分子量のタグの付着により修飾され得る。任意で、そのような修飾されたマーカーを検出した後に、マーカーのアイデンティティは、タンパク質データベース(例えば、SwissProt)において、修飾されたマーカーの物理的および化学的特徴を合わせるによりさらに決定され得る。

【0154】

調製後、試料における生物マーカーは、典型的には、検出のための基質上に捕獲される。従来の基質は、続いてタンパク質の存在について探索される、抗体コーティング化96ウェルプレートまたはニトロセルロース膜を含む。好ましくは、生物マーカーは、上記のようなイムノアッセイを用いて同定される。しかしながら、好ましい方法はまた、バイオチップの使用を含む。好ましくは、バイオチップは、タンパク質の捕獲および検出のためのタンパク質バイオチップである。多くのタンパク質バイオチップは、当技術分野において記載されている。これらは、例えば、Packard BioScience Company(Meriden CT)、Zyomyx(Hayward, CA)およびPhylos(Lexington, MA)により製造されたタンパク質バイオチップを含む。一般的に、タンパク質バイオチップは、表面を有する基質を含む。捕獲試薬または吸着剤は、基質の表面に付着している。しばしば、表面は、複数のアドレス指定できる位置を含み、それらの位置のそれぞれには、そこに捕獲試薬が結合されている。捕獲試薬は、ポリペプチドまたは核酸のような生体分子であり得、特異的様式で他の生物マーカーを捕獲する。または、捕獲試薬は、陰イオン性交換物質または親水性物質のようなクロマトグラフィーの物質であり得る。そのようなタンパク質バイオチップの例は、以下の特許または特許出願に記載されている：米国特許第6,225,047号(Hutchens and Yip, 「Use of retentate chromatography to generate difference maps」、2001年5月1日)、国際公開WO 99/51773(Kuimelis and Wagner, 「Addressable protein arrays」、1999年10月14日)、国際公開WO 00/04389(Wagner et al., 「Arrays of protein-capture agents and methods of use thereof」、2000年7月27日)、国際公開WO 00/56934(Englert et al., 「Continuous porous matrix arrays」、2000年9月28日)。

【0155】

一般的に、生物マーカーを含む試料は、結合を可能にするのに十分な時間、バイオチップの活性表面上に置かれる。その後、結合していない分子は、適した溶離液を用いて表面

10

20

30

40

50

から洗浄される。一般的に、溶離液がストリンジェントであればあるほど、タンパク質は、洗浄後保持されるためにしっかりと結合していなければならない。保持されたタンパク質生物マーカーは、次に、適切な手段により検出され得る。

【0156】

タンパク質バイオチップの表面上に捕獲された分析物は、当技術分野において公知の任意の方法により検出され得る。これは、例えば、質量分析法、蛍光、表面プラズモン共鳴法、偏光解析法、および原子間力顕微鏡法を含む。質量分析法、および特にSELDI質量分析法は本発明の生物マーカーの検出に特に有用な方法である。

【0157】

好ましくは、レーザー脱離飛行時間型質量分析計が本発明の態様に用いられる。レーザー脱離質量分析法において、マーカーを含む基質またはプローブが吸気装置へ導入される。マーカーは、イオン化源からのレーザーにより、脱離され、気相へイオン化される。発生したイオンは、イオン光学アセンブリーにより収集され、その後、飛行時間型質量分析器において、イオンは短い高電圧場を通して加速され、高真空チャンバーへ流れ込むようにされる。高真空チャンバーの遠端において、加速されたイオンは、異なる時間で高感度の検出器表面に衝突する。飛行時間は、イオンの質量の関数であるから、イオン形成とイオン検出器衝撃の間の経過時間は、特定の質量対電荷比のマーカーの存在または非存在を同定するために用いられ得る。

【0158】

マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析法、すなわち、MALDI-MS、はタンパク質をプローブ表面から無傷で脱離させるための、しばしば、マトリックスと呼ばれる、エネルギー吸収分子の使用を含む質量分析の方法である。MALDIは、例えば、米国特許第5,118,937号(Hillenkamp et al.)および米国特許第5,045,694号(Beavis and Chait)に記載されている。MALDI-MSにおいて、試料は、典型的には、マトリックス材料と混合され、不活性プローブの表面上に置かれる。例示的なエネルギー吸収分子は、桂皮酸誘導体、シナピン酸(「SPA」)、シアノヒドロキシ桂皮酸(「CHCA」)およびジヒドロキシ安息香酸を含む。他の適したエネルギー吸収分子は、当業者に公知である。マトリックスは乾燥し、分析物分子をカプセル化する結晶を形成する。その後、分析物分子は、レーザー脱離/イオン化質量分析法により検出される。MALDI-MSは、試料の複雑性が上記の調製方法を用いて実質的に低下している場合には、本発明の生物マーカーを検出するために有用である。

【0159】

表面増強レーザー脱離/イオン化質量分析法、すなわちSELDI-MS、は複雑な混合物においてタンパク質のような生体分子の分画および検出についてMALDIに対して改善を示す。SELDIは、タンパク質のような生体分子が、タンパク質バイオチップの表面上に、そこに結合している捕獲試薬を用いて捕獲される、質量分析の方法である。典型的には、結合していない分子は、調査の前にプローブ表面から洗浄される。SELDIは、例えば、以下に記載されている：米国特許第5,719,060号(「Method and Apparatus for Desorption and Ionization of Analytes」、Hutchens and Yip、1998年2月17日)、米国特許第6,225,047号(「Use of Retentate Chromatography to Generate Difference Maps」、Hutchens and Yip、2001年5月1日)、およびEncyclopedia of Analytical Chemistry, R.A. Meyers, ed., p 11915-11918 John Wiley & Sons Chichester, 2000におけるWeinberger et al., 「Time-of-flight mass spectrometry」。

【0160】

基質表面上のマーカーは、気相イオン分光測定法を用いて、脱離され、イオン化され得る。基質上のマーカーが分解されるのを可能にする限り、任意の適した気相イオン分光計が用いられ得る。好ましくは、気相イオン分光計はマーカーの定量化を可能にする。

【0161】

一つの態様において、気相イオン分光計は、質量分析計である。典型的な質量分析計において、表面上にマーカーを含む基質またはプローブは、質量分析計の吸気装置へ導入される。マーカーは、その後、レーザー、高速原子衝撃、高エネルギープラズマ、エレクト

ロスプレーイオン化、サーモスプレーイオン化、液体二次イオンMS、電界脱離などのような脱離源により脱離される。発生、脱離、揮発した種は、脱離事象の直接的結果としてイオン化される、前もって形成されたイオンまたは中性のものからなる。発生したイオンは、イオン光学的アセンブリーにより収集され、その後、質量分析器は、通過したイオンを分散させて、分析する。質量分析器から出たイオンは、検出器により検出される。検出器は、その後、検出されたイオンの情報を質量対電荷比へ変換する。マーカーまたは他の物質の存在の検出は、典型的には、シグナル強度の検出を含む。これは、次に、基質に結合したマーカーの量および特性を反映することができる。質量分析計の構成要素(例えば、脱離源、質量分析器、検出器など)のいずれも、本発明の態様において、本明細書に記載された他の適した構成要素または当技術分野において公知の他のものと組み合わせられ得る。 10

【0162】

もう一つの態様において、イムノアッセイが、試料においてマーカーを検出および分析するために用いられ得る。この方法は以下の段階を含む：(a)マーカーへ特異的に結合する抗体を供給する段階；(b)試料を抗体と接触させる段階；および(c)試料におけるマーカーに結合した抗体の複合体の存在を検出する段階。

【0163】

マーカーへ特異的に結合する抗体を調製するために、精製されたマーカーまたはそれらの核酸配列が用いられ得る。マーカーについての核酸およびアミノ酸配列は、これらのマーカーのさらなる特徴付けにより得られ得る。例えば、各マーカーはいくつかの酵素(例えばトリプシン、V8プロテアーゼなど)によりペプチドマップされ得る。各マーカーからの消化断片の分子量は、様々な酵素により生成された消化断片の分子量に合う配列について、SwissProtデータベースのようなデータベースを検索するために用いられ得る。この方法を用いて、他のマーカーの核酸およびアミノ酸配列は、これらのマーカーがデータベースにおいて既知のタンパク質であるかどうか、同定され得る。 20

【0164】

または、タンパク質は、タンパク質ラダーシーケンシングを用いてシーケンシングされ得る。タンパク質ラダーは、例えば、分子を断片化し、断片を酵素的消化に供すること、または逐次的に、断片の末端から単一アミノ酸を除去する他の方法により、作製され得る。タンパク質ラダーを調製する方法は、例えば、国際公開W0 93/24834(Chait et al. 30)および米国特許第5,792,664号(Chait et al.)に記載されている。ラダーは、その後、質量分析法により分析される。ラダー断片の質量における差は、分子の末端から除去されたアミノ酸を同定する。

【0165】

マーカーがデータベースにおいて既知のタンパク質ではない場合、核酸およびアミノ酸配列は、マーカーのアミノ酸配列の一部の知識によっても決定され得る。例えば、縮重したプローブは、マーカーのN末端アミノ酸配列に基づいて作製され得る。これらのプローブは、その後、マーカーが最初に検出された試料から作成されたゲノムまたはcDNAライブラリーをスクリーニングするために用いられ得る。陽性クローンが同定、増幅され、それらの組換えDNA配列が、周知である技術を用いてサブクローニングされ得る。例えば、Current Protocols for Molecular Biology(Ausubel et al., Green Publishing Assoc. and Wiley-Interscience 1989)およびMolecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版(Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory, NY 2001)を参照。 40

【0166】

精製されたマーカーまたはそれらの核酸配列を用いて、マーカーへ特異的に結合する抗体が、当技術分野において公知の任意の適した方法を用いて調製され得る。例えば、Coligan, Current Protocols in Immunology (1991); Harlow & Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1988); Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice (第2版、1986); およびKohler & Milstein, Nature 256:495-497 (1975)を参照。そのような技術は、非限定的に、ファージまたは類似したベクターにおける組換え抗体のライブラリー 50

ーからの抗体の選択による抗体調製、加えてウサギまたはマウスを免疫することによるポリクローナルおよびモノクローナル抗体の調製を含む(例えば、Huse et al., Science 246:1275-1281 (1989); Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)参照)。

【0167】

抗体が供給された後、マーカーは、当技術分野において公知の適した免疫学的結合アッセイ法のいずれかを用いて検出および/または定量化され得る(例えば、米国特許第4,366,241号;第4,376,110号;第4,517,288号;および第4,837,168号参照)。有用なアッセイ法は、例えば、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)のような酵素免疫アッセイ(EIA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、ウェスタンブロットアッセイ、またはスロットブロットアッセイを含む。これらの方法はまた、例えば、Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology, 37巻(Asai ed. 1993); Basic and Clinical Immunology (Stites & Terr, eds., 第7版, 1991); およびHarlow & Lane、前記に記載されている。生物マーカーの検出および定量は、以下の実施例に詳細に記載される。

【0168】

一般的に、被験体から得られた試料は、マーカーと特異的に結合する抗体と接触させられ得る。任意で、抗体は、抗体を試料に接触させる前に、洗浄およびその後の複合体の単離を容易にするために固体支持体に固定され得る。固体支持体の例は、例えば、マイクロタイタープレート、棒、ビーズもしくはマイクロビーズの形をとったガラスまたはプラスチックを含む。抗体はまた、上で記載されたプローブ基質またはProteinChip(登録商標)アレイに付着し得る。試料は、好ましくは、被験体から採取された生物体液試料である。生物体液試料の例は、脳脊髄液、血液、血清、血漿、神経細胞、組織、尿、涙、唾液などを含む。好ましい態様において、生物体液は、脳脊髄液を含む。試料は、試料を抗体に接触させる前に、適した溶離液で希釈され得る。

【0169】

試料を抗体とインキュベートした後、混合物は洗浄され、形成された抗体-マーカー複合体が検出され得る。これは、洗浄された混合物を検出試薬とインキュベートすることにより達成され得る。この検出試薬は、例えば、検出可能な標識で標識されている二次抗体であり得る。例示的な検出可能な標識は、磁気ビーズ(例えば、DYNABEADS(商標))、蛍光色素、放射標識、酵素(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAに一般的に用いられる他のもの)、およびコロイド金または色ガラスまたはプラスチックビーズのような比色標識を含む。または、試料におけるマーカーは、例えば、二次標識抗体が結合したマーカー特異的抗体を検出するように用いられる間接的アッセイ法を用いて、および/または、例えば、マーカーの明確なエピトープに結合するモノクローナル抗体が混合物と同時にインキュベートされる、競合もしくは阻害アッセイ法において、検出され得る。

【0170】

アッセイを通して、インキュベーションおよび/または洗浄段階は、試薬の各結合後に必要とされ得る。インキュベーション段階は、約5秒間から数時間まで、好ましくは約5分から約24時間まで、変わり得る。しかしながら、インキュベーション時間は、アッセイ形式、マーカー、溶液の容量、濃度などに依存する。通常、アッセイは、それらが10 ~ 40 °Cのような温度の範囲に渡って行われ得るとはいえ、周囲温度で行われるであろう。

【0171】

イムノアッセイは、試料におけるマーカーの存在または非存在、および試料におけるマーカーの量を測定するために用いられ得る。第一に、試料におけるマーカーの検査量は、上記のイムノアッセイ法を用いて検出され得る。マーカーが試料に存在する場合には、それは、上記の適したインキュベーション条件下でマーカーを特異的に結合する抗体との抗体-マーカー複合体を形成する。抗体-マーカー複合体の量は、標準と比較することにより決定され得る。標準は、例えば、試料に存在することが知られている既知の化合物または別のタンパク質であり得る。上で述べられているように、マーカーの検査量は、測定単位が対照と比較され得る限り、絶対的単位で測定される必要はない。

【0172】

試料においてこれらのマーカーを検出するための方法は、多くの適用を有する。例えば、1つまたは複数のマーカーは、脊髄傷害、脳傷害、傷害の程度、ニューロンの障害、アルコールおよび薬物乱用による神経系傷害、妊娠中の母親によるアルコールおよび/または薬物乱用による胎児の傷害などの診断を助けるために測定され得る。もう一つの例において、マーカーの検出のための方法は、処置に対する被験体における応答をモニターするために用いられ得る。もう一つの例において、マーカーを検出するための方法は、インビボまたはインビトロでこれらのマーカーの発現を調節する化合物をアッセイし、および同定するために用いられ得る。

【0173】

マーカーの脱離および検出により生じたデータは、任意の適した手段を用いて解析され得る。一つの態様において、データは、プログラム可能なデジタルコンピュータの使用で解析される。コンピュータプログラムは、一般的に、コードを保存する読み取り可能な媒体を含む。特定のコードは、プローブ上の各フィーチャーの位置、そのフィーチャーにおける吸着剤の同定、および吸着剤を洗浄するために用いられる溶出条件を含むメモリーに当てられ得る。コンピュータはまた、プローブ上の特定のアドレス指定できる位置から受け取られた様々な分子量におけるシグナルの強度に関するデータを入力として受けるコードを含む。このデータは、各マーカーにより発生したシグナルの強度を含む、検出されたマーカーの数を示し得る。

【0174】

データ解析は、検出されたマーカーのシグナル強度(例えば、ピークの高さ)を決定する段階、および「アウト라이어」(あらかじめ決定された統計学的分布からはずれたデータ)を除去する段階を含み得る。観察されたピークは標準化され得、何らかの参照に対する各ピークの高さが計算される過程であり得る。例えば、参照は、尺度においてゼロとして設定される、機器および化学物質(例えば、エネルギー吸収分子)により発生したバックグラウンドノイズであり得る。その後、各マーカーまたは他の生体分子について検出されたシグナル強度は、望まれる尺度(例えば、100)における相対的強度の形で表示され得る。または、標準物質(例えば、CSFタンパク質)は、標準物質由来のピークが、検出される各マーカーまたは他のマーカーについて観察されるシグナルの相対的強度を計算するための参照として用いられ得るように、試料と共に入れられ得る。

【0175】

コンピュータは、結果として生じたデータを表示のために様々な形式へ変換し得る。「スペクトルビューまたは保持マップ」と呼ばれる一つの形式において、標準スペクトルビューが表示され得、ビューは、各特定の分子量において検出器に達したマーカーの量を描く。「ピークマップ」と呼ばれるもう一つの形式において、ピークの高さおよび質量情報のみが、スペクトルビューから保持され、よりきれいな画像を生じ、ほとんど同一の分子量を有するマーカーがより容易に見られるのを可能にする。「ゲルビュー」と呼ばれるさらにもう一つの形式において、ピークビューからの各質量は、各ピークの高さに基づいた濃淡画像へ変換され得、結果として、電気泳動ゲル上のバンドに類似した外観を生じる。「3Dオーバーレイ」と呼ばれるさらにもう一つの形式において、いくつかのスペクトルが、相対的ピークの高さにおけるわずかな変化を研究するためにオーバーレイされ得る。「差マップビュー」と呼ばれるさらにもう一つの形式において、2つ以上のスペクトルが比較されて、便利なことに、固有のマーカーおよび試料間で上方または下方制御されるマーカーを強調し得る。任意の2つの試料からのマーカープロファイル(スペクトル)は、視覚的に比較され得る。さらにもう一つの形式において、Spotfire Scatter Plotが用いられ得、検出されるマーカーが、プロットにおける点としてプロットされており、プロットの一方の軸は、検出されたマーカーの見かけの分子量を示し、もう一つの軸は、検出されたマーカーのシグナル強度を示す。各試料について、検出されるマーカーおよび試料に存在するマーカーの量は、コンピュータ読み取り可能な媒体に保存され得る。このデータは、その後、対照(例えば、対照、例えば、神経系傷害が検出されない正常な健康被験体、に

10

20

30

40

50

検出されるマーカーのプロファイルまたは量)と比較され得る。

【0176】

神経系傷害の診断

もう一つの局面において、本発明は、1つまたは複数のマーカーを用いて、ヒト神経系傷害および/または神経系障害診断を助けるための方法を提供する。例えば、表1に同定されるタンパク質、それらのペプチド、断片または誘導体。これらのマーカーは、単独で、または任意のセット、例えば、軸索および樹状突起、における他のマーカーと組み合わせ、用いられ得る。マーカーは、ヒト患者、例えば、TBI患者、および神経系傷害が検出されない正常な被験体の試料に異なって存在する。例えば、マーカーの一部は、正常な被験体においてより、神経系傷害および/またはニューロンの障害を有するヒト患者において、上昇したレベルで発現される、および/または、より高い頻度で存在する。それゆえに、人におけるこれらのマーカーの1つまたは複数の検出は、その人が神経系傷害および/またはニューロンの障害をもち得る可能性に関する有用な情報を提供する。

10

【0177】

本発明の組成物(例えば、ポリペプチド、ポリヌクレオチドおよび/またはアゴニストもしくはアンタゴニスト)で処置、予防および/または診断され得る、神経系疾患、ニューロンの障害および/または状態は、非限定的に、神経系傷害、ならびに結果として、軸索の断絶、ニューロンの減少もしくは変性、または脱髄のいずれかを生じる疾患、障害および/または状態を含む。本発明により患者(ヒトおよび非ヒト哺乳動物患者を含む)において処置、予防および/または診断され得る神経系病変は、非限定的に、中枢神経系(脊髄、脳を含む)かまたは末梢神経系のいずれかの以下の病変を含む：(1)脳梗塞もしくは虚血、または脊髄梗塞もしくは虚血を含む、神経系の一部における酸素の不足が結果としてニューロンの傷害または死を生じる、虚血性病変；(2)物理的傷害により引き起こされたまたは手術に関連した病変を含む外傷性病変、例えば、神経系の一部を切断する病変、または圧縮性傷害；(3)神経系関連悪性腫瘍かまたは非神経系組織由来の悪性腫瘍のいずれかである悪性組織により神経系の一部が破壊または傷害されている悪性病変；(4)例えば、膿瘍による、または、ヒト免疫不全ウイルス、帯状ヘルペスもしくは単純ヘルペスウイルスによる感染またはライム病に関連した、感染の結果として、神経系の一部が破壊または傷害されている感染性病変；(5)非限定的に、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン舞踏病または筋萎縮性側索硬化症(ALS)に関連した変性を含む、変性過程の結果として、神経系の一部が破壊または傷害されている変性病変；(6)非限定的に、ビタミンB12欠乏症、葉酸欠乏症、ウェルニッケ病、タバコ-アルコール性弱視、マルキアファ-ヴァ-ビニャーミ病(脳梁の一次変性)およびアルコール依存性小脳変性を含む栄養障害または代謝の障害により、神経系の一部が破壊または傷害されている、栄養上の疾患、障害および/または状態に関連した病変；(7)非限定的に、糖尿病(糖尿病性神経障害、ベル麻痺)、全身性エリテマトーデス、癌腫またはサルコイドーシスを含む全身性疾患に関連した神経学的病変；(8)アルコール、鉛または特定の神経毒を含む毒性物質により引き起こされる病変；ならびに(9)非限定的に、多発性硬化症、ヒト免疫不全ウイルス関連脊髄症、横断性脊髄症または様々な病因、進行性多病巣性白質脳症、および橋中央ミエリン溶解を含む、脱髄性疾患により、神経系の一部が破壊または傷害されている脱髄化病変。

20

30

40

【0178】

従って、本発明の態様は、以下の段階を含む、ヒト神経系傷害および/またはニューロンの障害の診断を助けるための方法を含む：(a)試料において少なくとも1つのマーカーを検出する段階であって、マーカーが表1に列挙されたマーカー、そのペプチド、断片および誘導体の任意の1つより選択される、段階、および(b)マーカーの検出を、ヒト神経系傷害および/またはニューロンの障害の推定診断と関連させる段階。相関は、マーカーの対照量(マーカーの上方または下方制御)(例えば、ヒト神経系傷害が検出されない正常な被験体における)と比較した試料におけるマーカーの量を考慮に入れ得る。相関は、検査試料におけるマーカーの存在または非存在、対照における同じマーカーの検出の頻度を考慮に入れ得る。相関は、被験体が神経系傷害を有しているかどうか、神経系傷害の重症度の

50

程度、および傷害の細胞内の位置の測定を促進するためにそのような因子の両方を考慮に入れ得る。

【0179】

好ましい態様において、神経系傷害および/または神経系障害を診断ならびに検出する方法は、以下の1つまたは複数の生物マーカーを検出する段階を含む：軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ビメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シンタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMKK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン α 、S100 β ；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア痕跡：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_1 (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_1 (2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7 -7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：ア

セチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン-ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0180】

もう一つの好ましい態様において、神経系傷害および/または神経系障害を診断ならびに検出する方法は、各神経系細胞型から少なくとも1つの生物マーカーを検出する段階を含む。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。組成物は以下を含む：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

10

20

【0181】

任意の適した試料は、マーカーを検出されるべき被験体から得られ得る。好ましくは、試料は、被験体由来の脳脊髄液試料である。必要に応じて、試料は、マーカーの検出能を増強するために上記のように調製され得る。例えば、マーカーの検出能を増加させるために、被験体由来の血清は、好ましくは、例えば、シバクロンブルー(Cibacron blue)アガロスクロマトグラフィーおよび一本鎖DNAアフィニティークロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーなどにより、分画され得る。事前分画プロトコールのような試料調製は、任意であり、用いられる検出の方法に依存してマーカーの検出能を増強させる必要はない場合がある。例えば、試料調製は、マーカーを特異的に結合する抗体が、試料においてマーカーの存在を検出するために用いられる場合には、不必要であり得る。

30

【0182】

任意の適した方法が、試料においてマーカーを検出するために用いられ得る。例えば、イムノアッセイ法または気相イオン分光測定法が、上記のように用いられ得る。これらの方法を用いて、1つまたは複数のマーカーが検出され得る。好ましくは、試料は、複数のマーカーの存在について検査される。単一のマーカー単独よりむしろ、複数のマーカーの存在を検出することは、診断医に対し多くの情報を提供する。具体的には、試料における複数のマーカーの検出は、真の陽性および真の陰性診断のパーセンテージを増加させ、偽陽性または偽陰性診断のパーセンテージを減少させる。

【0183】

マーカーの検出は、その後、神経系傷害および/またはニューロンの障害の推定診断と関連させられる。いくつかの態様において、マーカーの量を定量化することなく、単なるマーカーの存在または非存在の検出が有用であり、神経系傷害および/またはニューロンの障害の推定診断と関連され得る。例えば、神経タンパク質、その断片または誘導体、例えば、軸索タンパク質 - NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、NF-68(NF-L)などが、正常な被験者と比べ神経傷害を有する患者においてより頻繁に検出され得る。

40

【0184】

他の態様において、マーカーの検出は、マーカーの検出を、神経系傷害の推定診断、神経系傷害の重症度の程度、神経系障害の診断などと関連させるためにマーカーを定量化する段階を含み得る。従って、検査されることになっている被験体において検出されるマーカーの量が対照量と比較してより高い場合には、検査されることになっている被験体は、

50

そのような傷害および/または神経系障害を有する、より高い確率を有する。

【0185】

同様に、もう一つの態様において、マーカーの検出はさらに、マーカーの検出を、神経系傷害の推定診断、神経系傷害の重症度の程度、神経系障害の診断などと相関させるためにマーカーを定量化する段階であって、マーカーが、正常な被験体の血清試料においてより、患者由来のCSFまたは血清試料において、より低い量で存在する段階を含み得る。従って、検査されることになっている被験体において検出されるマーカーの量が対照量と比較してより低い場合には、検査されることになっている被験体は、神経系傷害および/または神経系障害を有する、より高い確率を有する。

【0186】

マーカーが定量化される場合、それは対照と比較され得る。対照は、例えば、神経系傷害および/または神経系障害が検出されない正常な被験体の比較できる試料に存在するマーカーの平均または中央値量、であり得る。対照量は、検査量を測定する際と同じ、または実質的に類似した、実験条件下で測定される。例えば、検査試料が、被験体の脳脊髄液および/または血清試料から得られ、マーカーが特定のプローブを用いて検出される場合には、マーカーの対照量は、好ましくは、同じプローブを用いて患者の血清試料から測定される。マーカーの対照量は、それがその集団におけるマーカー量の変動を反映するように、神経系傷害および/またはニューロンの障害を有さない正常な被験体由来の試料の有意な数に基づいて決定されることが好ましい。

【0187】

質量分析法により生じたデータは、その後、コンピュータソフトウェアにより解析され得る。ソフトウェアは、質量分析計からのシグナルをコンピュータ読み取り可能な形へ変換するコードを含み得る。ソフトウェアはまた、本発明のマーカー、または他の有用なマーカーに対応するシグナルにおいてシグナルが「ピーク」を表すかどうかを決定するためのシグナルの解析にアルゴリズムを適用するコードを含み得る。ソフトウェアはまた、検査試料からのシグナルを「正常」およびヒト神経系傷害の典型的シグナル特性と比較し、その2つのシグナル間の適合の近似性を決定するアルゴリズムを実行するコードを含み得る。ソフトウェアはまた、検査試料がどれに最も近いかを示すコードを含み得、それにより有望な診断を与える。

【0188】

神経生物マーカーを検出するための抗体の作製

様々な神経系傷害、傷害の重症度の程度、ニューロンの障害などを患っている患者における試料から得られる神経生物マーカーは、上記のように調製され得る。さらになお、神経生物マーカーは、ペプチド対タンパク質全体に存在し得る異なる抗原性エピトープに対する抗体の産生のために生物マーカーの断片またはペプチドを得るように酵素消化に曝され得る。抗原性エピトープは、例えば、エピトープを特異的に結合する、モノクローナル抗体を含む抗体を産生させるのに有用である。抗原性エピトープは、イムノアッセイにおける標的分子として用いられ得る。(例えば、Wilson et al., Cell 37:767-778 (1984); Sutchliffe et al., Science 219:660-666 (1983)参照)。

【0189】

好ましい態様において、抗体は、生物マーカー軸索タンパク質： IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、 II、 IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、 インターネキシン；樹状突起タンパク質： III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 -チューブリン(P02551)、 -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイリン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3- (P42655))、SM22-、カルグラヌリンAB、 -シヌクレイン(P37377)、 -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S

10

20

30

40

50

/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMKK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン)；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性ACh受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン-ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2のエピトープ(特異的に結合する)に対して方向づけられる。

【0190】

もう一つの好ましい態様において、本発明の抗体は、各神経系細胞型からの少なくとも1つの生物マーカーに結合する。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。組成物は以下を含む：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2お

よびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、ブルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0191】

神経生物マーカーエピトープは、例えば、当技術分野において周知の方法により抗体を誘導するために、用いられ得る。(例えば、Sutcliffe et al., 前記; Wilson et al., 前記; Chow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:910-914; および Bittle et al., J. Gen. Virol. 66:2347-2354 (1985)を参照)。1つまたは複数の免疫原性エピトープを含む神経ポリペプチドは、アルブミンのような担体タンパク質と共に動物系(ウサギまたはマウスのような)へ抗体応答を誘発するために提示され得る、または、ポリペプチドが十分な長さ(少なくとも約25アミノ酸)である場合には、ポリペプチドは担体なしで提示され得る。しかしながら、わずか8~10アミノ酸を含む免疫原性エピトープが、最低限でも変性ポリペプチドにおける(例えば、ウェスタンブロットングにおいて)線状エピトープに結合する能力がある抗体を産生させるのに十分であることが示されている。

10

【0192】

本発明のエピトープ所有ポリペプチドは、非限定的に、インビボ免疫化、インビトロ免疫化、およびファージディスプレイ方法を含む当技術分野において周知の方法により抗体を誘導するために用いられ得る。例えば、Sutcliffe et al., 前記; Wilson et al., 前記; および Bittle et al., J. Gen. Virol., 66:2347-2354 (1985)を参照。インビボ免疫化が用いられる場合には、動物は遊離ペプチドで免疫され得る; しかしながら、抗ペプチド抗体力価は、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)または破傷風トキソイドのような高分子担体へペプチドを連結することによりブーストされ得る。例えば、システイン残基を含むペプチドは、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)のようなリンカーを用いる担体に連結され得、他のペプチドは、グルタルアルデヒドのようなより一般的な連結剤を用いる担体に連結され得る。ウサギ、ラットおよびマウスのような動物は、遊離ペプチドかまたは担体連結ペプチドのいずれかで、例えば、約100 µgのペプチドまたは担体タンパク質およびフロイントのアジュバントまたは免疫応答を刺激することについて公知の任意の他のアジュバントを含む乳濁液の腹腔内および/または皮内注射により、免疫される。数回のブースター注射は、例えば、固体表面に吸着した遊離ペプチドを用いるELISAアッセイ法により、検出され得る抗ペプチド抗体の有用な力価を与えるために、例えば、約2週間の間隔で、必要とされ得る。免疫された動物由来の血清における抗ペプチド抗体の力価は、例えば、当技術分野において周知の方法に従ったペプチドの固体支持体上への吸着および選択された抗体の溶出による、抗ペプチド抗体の選択により増加され得る。

20

30

【0193】

核酸神経生物マーカーエピトープはまた、発現されたポリペプチドの検出および精製を助けるためにエピトープタグ(例えば、ヘムアグルチニン(「HA」)タグまたはフラッグ(flagタグ)として対象となる遺伝子と再結合され得る。例えば、Janknecht et al.により記載された系は、ヒト細胞系に発現された非変性融合タンパク質の即座の精製を可能にする(Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897)。この系において、対象となる遺伝子は、遺伝子のオープンリーディングフレームが6個のヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳で融合されるように、ワクシニア組換えプラスミドへサブクローニングされる。タグは、融合タンパク質についてのマトリックス結合ドメインとしての役割を果たす。組換えワクシニアウイルスに感染した細胞からの抽出物は、Ni²⁺ニトリロ酢酸-アガロースカラム上へ添加され、ヒスチジンタグ付きタンパク質は、イミダゾール含有緩衝液で選択的に溶出され得る。

40

【0194】

本発明の抗体は、当技術分野において公知の任意の適した方法により作製され得る。本

50

発明の抗体は、ポリクローナル抗体を含み得る。ポリクローナル抗体を調製する方法は当業者に公知である(Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (全体として参照により本明細書に組み入れられている、Cold spring Harbor Laboratory Press, 第2版(1988))。例えば、本発明のポリペプチドは、非限定的に、ウサギ、マウス、ラットなどを含む様々な宿主動物に、抗原に特異的なポリクローナル抗体を含む血清の生成を誘導するように投与され得る。本発明のポリペプチドの投与は、免疫剤、および必要に応じてアジュバント、の1回または複数回の注入を必要とし得る。様々なアジュバントが、宿主種に依存して免疫学的応答を増加させるために用いられ得、非限定的に、フロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニック(pluronic)ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメット・ゲラン桿菌(*bacille Calmette-Guerin*))およびコリネバクテリウム・パルブム(*Corynebacterium parvum*)のような有用である可能性のあるヒトアジュバントを含む。そのようなアジュバントもまた、当技術分野において周知である。本発明の目的のために、「免疫剤」は、異種性ポリペプチドとの融合体および本明細書に記載され得るようなポリペプチドの他の型に加えて、断片、変異体および/または誘導体を含む、本発明のポリペプチドと定義され得る。

10

【0195】

典型的には、免疫剤および/またはアジュバントは、複数回の皮下または腹腔内注射により哺乳動物に注入されるが、それらはまた、筋肉内におよび/または静脈内を通して与えられ得る。免疫剤は、本発明のポリペプチド、それらの融合タンパク質もしくは変異体を含み得る。ポリペプチドの性質(すなわち、パーセント疎水性、パーセント親水性、安定性、正味荷電、等電点など)に依存して、免疫されることになっている哺乳動物において免疫原性であることが知られているタンパク質に免疫剤を結合させることが有用であり得る。そのような結合は、共有結合が形成されるように活性化学官能基を本発明のポリペプチドおよび免疫原性タンパク質の両方へ誘導することによる化学的結合か、または融合タンパク質に基づいた方法もしくは当業者に公知の他の方法を通してかのいずれかを含む。そのような免疫原性タンパク質の例は、非限定的に、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシチログロブリンおよびダイズトリプシンインヒビターを含む。様々なアジュバントが、宿主種に依存して免疫学的応答を増加させるために用いられ得、非限定的に、フロイント(完全および不完全)、水酸化アルミニウムのようなミネラルゲル、リゾレシチンのような界面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳濁液、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノール、ならびにBCG(カルメット・ゲラン桿菌(*bacille Calmette-Guerin*))およびコリネバクテリウム・パルブムのような有用である可能性のあるヒトアジュバントを含む。用いられ得るアジュバントの追加の例は、MPL-TDMアジュバント(モノホスホリルリピドA、合成トレハロースジコリノミコレート)を含む。免疫化プロトコールは、過度の実験なしに当業者により選択され得る。

20

30

【0196】

本発明の抗体はまた、モノクローナル抗体を含み得る。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)および米国特許第4,376,110号により、Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold spring Harbor Laboratory Press, 第2版, (1988)により、Hammerling, et al., *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* (Elsevier, N.Y., (1981))により記載されたもののようなハイブリドーマ方法、または当業者に公知の他の方法を用いて調製され得る。モノクローナル抗体を作製するために用いられ得る方法の他の例は、非限定的に、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kosbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72; Cole et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:2026-2030) およびEBV-ハイブリドーマ技術(Cole et al., 1985, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)を含む。そのような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDおよびそれらのサブクラスを含む任意の免疫グロブリンクラス

40

50

であり得る。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養され得る。インビボでのモノクローナル抗体の高力価の産生は、これを産生の現在好ましい方法にさせている。

【0197】

ハイブリドーマ方法において、マウス、ヒト化マウス、ヒト免疫系を有するマウス、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、典型的には、免疫剤に特異的に結合する抗体を産生する、または産生する能力があるリンパ球を誘発するように免疫剤で免疫される。または、リンパ球はインビトロで免疫され得る。

【0198】

免疫剤は、典型的には、神経ポリペプチド、それらの断片または融合タンパク質を含む。一般的に、ヒト起源の細胞が望ましい場合には末梢血リンパ球(「PBL」)が用いられるか、または非ヒト哺乳動物源が望ましい場合には脾臓細胞もしくはリンパ節細胞が用いられるかのいずれかである。リンパ球は、その後、ハイブリドーマ細胞を形成するために、ポリエチレングリコールのような適した融合剤を用いて不死化細胞系と融合される(Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986), pp. 59-103)。不死化細胞系は、通常、形質転換された哺乳動物細胞、特に、齧歯類、ウシおよびヒト起源の骨髓腫細胞、である。通常には、ラットまたはマウスの骨髓腫細胞系が用いられる。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、融合されていない不死化細胞の増殖または生存を阻害する1つまたは複数の物質を含む適した培地において培養され得る。例えば、親細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPRT)を欠損する場合には、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、物質がHGPRT欠損細胞の増殖を妨げる、ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(「HAT培地」)を含む。

【0199】

好ましい不死化細胞系は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定的な高レベル発現を維持し、かつHAT培地のような培地に感受性があるものである。より好ましい不死化細胞系は、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif.およびAmerican Type Culture Collection, Manassas, Vaから入手され得るマウス骨髓腫系である。明細書中を通して推論されるように、ヒト骨髓腫およびマウス-ヒトヘテロ骨髓腫細胞系もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生について記載されている(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)。

【0200】

ハイブリドーマ細胞が培養される培地は、その後、本発明の神経ポリペプチドに対して方向づけられたモノクローナル抗体の存在についてアッセイされ得る。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法により、またはラジオイムノアッセイ(RIA)もしくは酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)のようなインビトロ結合アッセイ法により、測定される。そのような技術は当技術分野において公知であり、当業者の技術範囲内である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson and Pollart, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)のスキヤッチャード(Scatchard)分析により測定される。

【0201】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンは、限界希釈手順によりサブクローニングされ、標準的方法(Goding、前記)により増殖され得る。この目的のための適した培地は、例えば、ダルベッコの改変イーグル培地およびRPMI-1640を含む。または、ハイブリドーマ細胞は、哺乳動物における腹水のようなインビボで増殖され得る。

【0202】

サブクローンにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル排除クロマトグラフィー、ゲル電

10

20

30

40

50

気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーのような通常の免疫グロブリン精製手順により培地または腹水から単離または精製され得る。

【0203】

当業者は、様々な方法がモノクローナル抗体の産生について当技術分野に存在しており、従って、本発明は、それらのただ1つの、ハイブリドーマにおける産生に限定されないことを認識しているものと思われる。例えば、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載されたもののような組換えDNA方法により作製され得る。このような関係において、用語「モノクローナル抗体」は、単一の真核生物、ファージまたは原核生物のクローン由来の抗体を指す。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、通常の手順(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖、またはヒト、ヒト化もしくは他の起源由来のそのような鎖をコードする遺伝子に特異的に結合する能力があるオリゴヌクレオチドプローブを用いることにより)を用いて、容易に単離かつシーケンシングされ得る。本発明のハイブリドーマ細胞は、そのようなDNAの好ましい供給源としての役割を果たす。いったん単離されたならば、DNAは、発現ベクターへ配置され得、その後、組換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るように、そうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、または骨髄腫細胞のような宿主細胞へ形質転換される。

10

【0204】

ハイブリドーマテクノロジーを用いて特定の抗体について産生およびスクリーニングするための方法は、日常的で、当技術分野において周知である。非限定的例において、マウスは、生物マーカーポリペプチドまたはそのようなペプチドを発現させる細胞で免疫され得る。いったん免疫応答が検出されたならば、例えば、抗原に特異的な抗体が、マウス血清に検出され、マウス脾臓が採取されて、脾細胞が単離される。脾細胞は、その後、周知の方法により任意の適した骨髄腫細胞、例えばATCCから入手できる細胞系SP20由来の細胞、に融合される。ハイブリドーマは、限界希釈により選択かつクローニングされる。ハイブリドーマクローンは、その後、本発明のポリペプチドを結合する能力がある抗体を分泌する細胞について当技術分野において公知の方法によりアッセイされる。一般的に高レベルの抗体を含む腹水が、陽性ハイブリドーマクローンでマウスを免疫することにより産生され得る。

20

【0205】

従って、本発明は、モノクローナル抗体を作製する方法、加えて、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養する段階であって、ハイブリドーマが、本発明の抗原で免疫されたマウスから単離された脾細胞を骨髄腫細胞と融合することにより作製されている段階、およびその後、本発明のポリペプチドを結合する能力がある抗体を分泌するハイブリドーマクローンについて、融合の結果生じたハイブリドーマをスクリーニングする段階を含む方法により産生される抗体を提供する。神経生物マーカー、それらのペプチドおよび誘導体を検出する抗体は、新しい神経生物マーカーを同定するためのイムノアッセイ法および他の方法に用いられ得る、ならびに、神経系傷害、傷害の重症度の程度および/または神経学的障害の診断に用いられ得る。

30

【0206】

他の方法もまた、神経生物マーカー特異的抗体の大量生産に用いられ得る。例えば、抗体はまた、当技術分野において公知の様々なファージディスプレイ方法を用いて作製され得る。ファージディスプレイ方法において、機能性抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上にディスプレイされる。特定の態様において、そのようなファージは、レパートリーまたは組み合わせの抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から発現される抗原結合ドメインをディスプレイするために利用され得る。対象となる抗原を結合する抗原結合ドメインを発現させるファージは、抗原で、例えば、標識された抗原、または固体もしくはビーズに結合もしくは捕獲された抗原を用いて、選択または同定され得る。これらの方法に用いられるファージは、典型的には、Fab、Fv、またはファージ遺伝子IIIもしくは遺伝子VIIIタンパク質のいずれかに組換

40

50

え的に融合されたジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するファージから発現されるfdおよびM13結合ドメインを含む繊維状ファージである。本発明の抗体を作製するために用いられ得るファージディスプレイ方法の例は、それぞれ全体として参照により本明細書に組み入れられている、Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182:41-50 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24:952-958 (1994); Persic et al., Gene 187 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57:191-280 (1994); PCT出願第PCT/GB91/01134号; PCT公開 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; および米国特許第5,698,426号; 第5,223,409号; 第5,403,484号; 第5,580,717号; 第5,427,908号; 第5,750,753号; 第5,821,047号; 第5,571,698号; 第5,427,908号; 第5,516,637号; 第5,780,225号; 第5,658,727号; 第5,733,743号および第5,969,108号に開示されたものを含む。

【0207】

本発明の抗体は様々な有用性を有する。例えば、そのような抗体は、試料において本発明のポリペプチドの存在または定量化を検出するための診断アッセイ法に用いられ得る。そのような診断アッセイ法は、少なくとも2段階を含み得る。第一に、試料を抗体にさらす段階であって、試料が組織(例えば、ヒト、動物など)、生物体液(例えば、血液、尿、痰、精液、羊水、唾液など)、生物学的抽出物(例えば、組織または細胞のホモジネートなど)、タンパク質マイクロチップ(例えば、Arenkov P, et al., Anal Biochem., 278(2):123-131 (2000)参照)、またはクロマトグラフィーカラムなどである、段階。および、基質に結合した抗体の定量化を含む第二段階。または、方法は、追加として、抗体を固体支持体へ、共有結合的に、静電的に、または可逆的に、のいずれかで付着させる第一段階、および結合した抗体を、上記および本明細書の他所で定義されているような、試料にさらす第二段階を含み得る。

【0208】

競合結合アッセイ法、直接または間接サンドイッチアッセイ法、不均一または均一な相のいずれかにおいて行われる免疫沈降アッセイ法のような様々な診断アッセイ技術は、当技術分野において公知である(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc., (1987), pp. 147-158)。診断アッセイ法に用いられる抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、検出可能なシグナルを直接的に、または間接的に、のいずれかで発生する能力があるべきである。例えば、検出可能な部分は、²H、¹⁴C、³²Pまたは¹²⁵Iのような放射性同位元素、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンのような蛍光または化学ルミネセンス化合物、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、緑色蛍光タンパク質、または西洋ワサビペルオキシダーゼのような酵素であり得る。抗体を検出可能な部分に結合させるための当技術分野において公知の任意の方法が用いられ得、Hunter et al., Nature, 144:945 (1962); David et al., Biochem., 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Methods, 40:219 (1981); およびNygren, J. Histochem. and Cytochem., 30:407 (1982)により記載された方法を含む。

【0209】

キット

さらにもう一つの局面において、本発明は、神経系傷害、傷害の重症度の程度、細胞内局在性および/またはニューロンの障害の診断を助けるためのキットを提供し、ここでキットは本発明のマーカーを検出するために用いられ得る。例えば、キットは、マーカーが患者および正常な被験体の試料において異なって存在する、本明細書に記載されたマーカーの任意の1つまたは複数を検出するために用いられ得る。本発明のキットは多くの適用を有する。例えば、キットは、被験体が、例えば、樹状突起と対比して、軸索傷害を有するか、または陰性診断を有するかを区別するために用いられ得、それに従って、ニューロンの傷害診断を助ける。もう一つの例において、キットは、処置の効果を測定するためのインビトロまたはインビボの動物モデルにおいて、マーカーの1つまたは複数の発現を調

節する化合物を同定するために用いられ得る。

【0210】

一つの態様において、キットは、(a)マーカーに特異的に結合する抗体；および(b)検出試薬を含む。そのようなキットは、上記の材料から調製され得、材料(例えば、抗体、検出試薬、固定化支持体など)に関する前の考察は、この項へ完全に適用でき、繰り返されることはないと考えられる。任意で、キットはさらに、事前分画スピンカラムを含み得る。いくつかの態様において、キットはさらに、ラベルまたは別個の挿入物の形で、適した操作パラメーターについての使用説明書を含み得る。

【0211】

もう一つの態様において、キットは、(a)生物マーカーのパネルまたは組成物、(b)検出剤を含む。キットに含まれる生物マーカーのパネルまたは組成物は、神経系傷害のインピボの位置を診断するために少なくとも1つの生物マーカーおよび/または複数の生物マーカーを含む。これらの生物マーカーは以下を含む：軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、-チューブリン(P02551)、-チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3- (P42655))、SM22-、カルグラヌリンAB、-シヌクレイン(P37377)、-シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-Ia)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シntaxin、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)-、CaMPK-IV、SNAP-25、a-/b-SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン関連タンパク質(MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、-アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2))、-ア

ドレナリン受容体サブタイプ(例えば、(2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α -7)；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン- β -ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0212】

もう一つの好ましい態様において、キットにおける生物マーカーのパネルは、各神経系細胞型からの少なくとも1つの生物マーカーを含む。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。組成物は以下を含む：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0213】

もう一つの好ましい態様において、キットにおける抗体は、生物マーカーのパネルに特異的であり、1つまたは複数の抗体が用いられ得る。抗体は以下の生物マーカーに特異的である：軸索タンパク質：IIスペクトリン(およびSPDB)-1、NF-68(NF-L)-2、タウ-3、II、IIIスペクトリン、NF-200(NF-H)、NF-160(NF-M)、アミロイド前駆体タンパク質、インターネキシン；樹状突起タンパク質：III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、 α -チューブリン(P02551)、 β -チューブリン(P04691)、MAP-2A/B-3、MAP-2C-3、スタスミン-4、ダイナミン-1(P21575)、フォセイン、ダイナクチン(Q13561)、ピメンチン(P31000)、ダイナミン、プロフィリン、コフィリン1、2；細胞体タンパク質：UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、PEBP(P31044)、NSE(P07323)、CK-BB(P07335)、Thy 1.1、プリオンタンパク質、ハンチンチン、14-3-3タンパク質(例えば、14-3-3-(P42655))、SM22- α 、カルグラヌリンAB、 α -シヌクレイン(P37377)、 β -シヌクレイン(Q63754)、HNP 22；神経核タンパク質：NeuN-1、S/G(2)核自己抗原(SG2NA)、ハンチンチン；シナプス前性タンパク質：シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、シナプシン1(シナプシン-1a)、シナプシン2(Q63537)、シナプシン3、GAP43、バスーン(Bassoon)(NP_003449)、ピッコロ(Piccolo)(アクゾニン)(NP_149015)、シタキシン、CRMP1、2、アンフィフィシン-1(NP_001626)、アンフィフィシン-2(NP_647477)；シナプス後性タンパク質：PSD95-1、NMDA受容体(およびすべてのサブタイプ)-2、PSD93、AMPA-カイニン酸受容体(すべてのサブタイプ)、mGluR(すべてのサブタイプ)、カルモジュリン依存性タンパク質キナーゼII(CAMPK)- α 、 β 、 γ 、CaMKK-IV、SNAP-25、 α - β -SNAP；ミエリン乏突起神経膠細胞：ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、ミエリンプロテオリピドタンパク質(PLP)、ミエリン乏突起神経膠細胞特異的タンパク質(MOSP)、ミエリン乏突起神経膠細胞糖タンパク質(MOG)、ミエリン

関連タンパク質 (MAG)、乏突起神経膠細胞NS-1タンパク質；グリアタンパク質生物マーカー：GFAP(P47819)、タンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)-P04785、ニューロカルシン、S100；ミクログリアタンパク質生物マーカー：Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、PTPアーゼ(CD45)、CD40、CD68、CD11b、フラクタルキン(CX3CL1)およびフラクタルキン受容体(CX3CR1)、5-d-4抗原；シュワン細胞マーカー：シュワン細胞ミエリンタンパク質；グリア瘢痕：テネイシン；海馬：スタスミン、ヒポカルシン、SCG10；小脳：プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、カルピンジンD9K、カルピンジンD28K(NP_114190)、小脳CaBP、スポット35；脳皮質：コルテキシン-1(P60606)、H-2Z1遺伝子産物；視床：CD15(3-フコシル-N-アセチル-ラクトサミン)エピトープ；視床下部：オレキシン受容体(OX-1RおよびOX-2R)-食欲、オレキシン(視床下部特異的ペプチド)；脳梁：MBP、MOG、PLP、MAG；脊髄：シュワン細胞ミエリンタンパク質；線条体：ストリアチン、Rhes(線条体に濃縮されたRas相同体)；末梢性神経節：Gadd45a；末梢神経線維(感覚+運動)：ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)；他のニューロン特異的タンパク質：PH8(Sセロトニン作動性、ドーパミン作動性、PEP-19、ニューロカルシン(NC)、ニューロン特異的EFハンドCa²⁺結合タンパク質、エンセファロプシン、ストリアチン、SG2NA、ジネジン、リカバリン、ピシニン)；神経伝達物質受容体：NMDA受容体サブユニット(例えば、NR1A2B)、グルタミン酸受容体サブユニット(AMPA、カイニン酸受容体(例えば、GluR1、GluR4)、 α -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 α_2 (2))、 β -アドレナリン受容体サブタイプ(例えば、 β_2 (2c))、GABA受容体(例えば、GABA(B))、代謝調節型グルタミン酸受容体(例えば、mGluR3)、5-HTセロトニン受容体(例えば、5-HT(3))、ドーパミン受容体(例えば、D4)、ムスカリン性Ach受容体(例えば、M1)、ニコチン性アセチルコリン受容体(例えば、 α_7 (7))；神経伝達物質輸送体：ノルエピネフリン輸送体(NET)、ドーパミン輸送体(DAT)、セロトニン輸送体(SERT)、小胞輸送体タンパク質(VMAT1およびVMAT2)、GABA輸送体小胞阻害性アミノ酸輸送体(VIAAT/VGAT)、グルタミン酸輸送体(例えば、GLT1)、小胞アセチルコリン輸送体、小胞グルタミン酸輸送体1、[VGLUT1；BNPI]およびVGLUT2、コリン輸送体(例えば、CHT1)；コリン作動性生物マーカー：アセチルコリンエステラーゼ、コリンアセチルトランスフェラーゼ[ChAT]；ドーパミン作動性生物マーカー：チロシンヒドロキシラーゼ(TH)、ホスホ-TH、DARPP32；ノルアドレナリン作動性生物マーカー：ドーパミン β -ヒドロキシラーゼ(DbH)；アドレナリン作動性生物マーカー：フェニルエタノールアミンN-メチルトランスフェラーゼ(PNMT)；セロトニン作動性生物マーカー：トリプトファンヒドロキシラーゼ(TrH)；グルタミン酸作動性生物マーカー：グルタミナーゼ、グルタミン合成酵素；GABA作動性生物マーカー：GABAトランスアミナーゼ[GABAT]、GABA-B-R2。

【0214】

もう一つの好ましい態様において、抗体は、各神経系細胞型からの少なくとも1つの生物マーカーに特異的である。生物マーカーの組成物は、神経系傷害、損傷および/または神経系障害の診断となる。抗体は以下に結合する：IIスペクトリン、SPDB-1、NF-68、NF-L-2、タウ-3、III-チューブリン-1、p24微小管関連タンパク質-2、UCH-L1(Q00981)-1、グリコーゲンホスホリラーゼ-BB-2、NeuN-1、シナプトフィシン-1、シナプトタグミン(P21707)、シナプトジャニン-1(Q62910)、シナプトジャニン-2、PSD95-1、NMDA受容体-2およびサブタイプ、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)および断片、GFAP(P47819)、Iba1、OX-42、OX-8、OX-6、ED-1、シュワン細胞ミエリンタンパク質、テネイシン、スタスミン、プルキンエ細胞タンパク質-2(Pcp2)、コルテキシン-1(P60606)、オレキシン受容体(OX-1R、OX-2R)、ストリアチン、Gadd45a、ペリフェリン、末梢性ミエリンタンパク質22(AAH91499)、ならびにニューロカルシン(NC)。

【0215】

追加の態様において、本発明は、本発明のポリペプチドの抗原を含む血清をスクリーニングするのに用いる診断キットを含む。診断キットは、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド抗原と特異的免疫反応性の、実質的に単離された抗体、およびポリヌクレオチドまたはポリペプチド抗原の抗体への結合を検出するための手段を含む。一つの態様において、抗体は固体支持体に付着している。特定の態様において、抗体はモノクローナル抗体であ

り得る。キットの検出手段は、第二の標識されたモノクローナル抗体を含み得る。代替として、または追加として、検出手段は、標識された競合抗原を含み得る。

【0216】

一つの診断構成において、検査血清は、本発明の方法により得られる表面結合した抗原を有する固相試薬と反応させられる。特異的な抗原抗体で試薬に結合させ、洗浄により結合していない血清成分を除去した後、試薬は、固体支持体上の結合した抗-抗原の抗体の量に比例してレポーターを試薬に結合させるように、レポーター標識抗ヒト抗体と反応させられる。試薬は、結合していない標識抗体を除去するために再び洗浄され、試薬と会合したレポーターの量が測定される。典型的には、レポーターは、適した蛍光定量的、ルミネセンスの、または比色定量的の基質の存在下で固相をインキュベートすることにより検出される酵素である(Sigma, St. Louis, Mo.)。

10

【0217】

上記アッセイ法における固体表面試薬は、タンパク質材料を、重合ビーズ、ディップスティック、96ウェルプレートまたはフィルター材料のような固体支持体材料へ付着させるための公知の技術により調製される。これらの付着方法は、一般的に、タンパク質の支持体への非特異的吸着、または、典型的には、遊離アミノ基を通しての、活性化カルボキシル基、ヒドロキシル基もしくはアルデヒド基のような固体支持体上の化学反応性基へのタンパク質の共有結合性付着を含む。または、ストレプトアビジンコーティング化プレートが、ピオチン化抗原と共に用いられ得る。

【0218】

任意で、キットはさらに、試料で検出されたマーカの検査量が、神経系傷害、傷害の重症度の程度、細胞内局在性、ニューロンの障害および/または患者への処置の効果の診断と一致した診断量であるかどうかを決定するために対照情報標準と検査試料が比較され得るように、標準または対照情報を含み得る。

20

【0219】

もう一つの態様において、キットは以下を含む：(a)吸着剤がマーカを結合するのに適している、上に吸着剤を含む基質、および(b)試料を吸着剤と接触させ、吸着剤により保持されたマーカを検出することによりマーカを検出するための使用説明書。いくつかの態様において、キットは、溶離液(選択肢として、または使用説明書と組み合わせて)または溶離液を作製するための使用説明書を含み得、吸着剤および溶離液の組み合わせが、気相イオン分光測定法を用いるマーカの検出を可能にする。そのようなキットは、上記の材料から調製され得、これらの材料(例えば、プローブ基質、吸着剤、洗浄溶液など)の前の考察がこの項へ完全に適用でき、繰り返されることはないと考えられる。

30

【0220】

もう一つの態様において、キットは、上に吸着剤を含む第一基質(例えば、吸着剤で官能性をもたせた粒子)、および第一基質が気相イオン分光計へ取り外し可能に挿入できるプローブを形成するように配置され得る、第二基質を含み得る。他の態様において、キットは、基質の上に吸着剤を有する取り外し可能に挿入できるプローブの形をとる単一の基質を含み得る。さらにもう一つの態様において、キットはさらに、事前分画スピンカラム(例えば、シバクロンブルーアガロースカラム、抗HSAアガロースカラム、サイズ排除カラム、Q-陰イオン交換スピンカラム、一本鎖DNAカラム、レクチンカラムなど)を含み得る。

40

【0221】

任意で、キットはさらに、ラベルまたは別個の挿入物の形で、適した操作パラメーターについての使用説明書を含み得る。例えば、キットは、試料がプローブ上に接触した後にプローブを洗浄する方法を消費者に知らせる標準的な使用説明書を有し得る。もう一つの例において、キットは、試料においてタンパク質の複雑性を低減するために試料を事前分画することについての使用説明書を有し得る。もう一つの例において、キットは、分画または他の過程を自動化することについての使用説明書を有し得る。

【0222】

以下の実施例は、限定としてではなく、例証として、提供される。特定の例が提供され

50

ているが、上の記載は例証するものであり、制限するものではない。前に記載された態様の特徴の任意の1つまたは複数は、本発明における任意の他の態様の1つまたは複数の特徴と任意の様式で組み合わせられ得る。さらになお、本発明の多くのバリエーションが、本明細書の検討により当業者に明らかになるものと思われる。本発明の範囲は、それゆえに、上記の記載を参照してではなく決定されるべきで、その代わりとして、添付された特許請求の範囲をそれらの等価物の全範囲と共に参照して決定されるべきである。

【0223】

本出願に引用されたすべての刊行物および特許文書は、あたかも各個々の刊行物または特許文書がそのように個々に示されているのと同じ程度で、すべての目的のために全体として参照により組み入れられている。本文書における様々な参照文献の引用により、出願人らは、任意の特定の参照文献が彼らの発明の「先行技術」であることを認めない。

10

【0224】

実施例

材料および方法

略語：

AEBSF、4-(2-アミノエチル)-ベンゼンスルホニルフルオリド；EDTA、エチレンジアミン四酢酸；EGTA、エチレンビス(オキシエチレンニトリロ)四酢酸；DMEM、ダルベッコ改変イーグル培地；BSA、ウシ血清アルブミン；DPBS、ダルベッコリン酸緩衝食塩水；DTT、ジチオスレイトール；FDA、フルオレセインジアセテート；GFAP、グリア線維性酸性タンパク質；HBSS、ハックス平衡塩類溶液；MAP-2、微小管関連タンパク質-2；PI、ヨウ化プロピジウム；PMSF、フェニルメチルスルホニルフロリド；SDS、ドデシル硫酸ナトリウム；TEMED、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン；CalpInh-II、カルパインインヒビターII (N-アセチル-Leu-Leu-メチオニナル)；Z-D-DCB、パン-カパーゼインヒビター(カルボベンゾキシ-Asp-CH₂-OC(O)-2-6-ジクロロベンゼン)；PBS、リン酸緩衝食塩水；TLCK、N-p-トシル-L-リジンクロロメチル；TPCK、N-トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン。

20

【0225】

外科的手順

制御皮質衝撃外傷性脳損傷。皮質衝撃傷害装置が、齧歯類においてTBIを生じるために用いられた。皮質衝撃TBIは、結果として、打撲傷に関連した衝撃部材チップの周辺内の皮質変形、ならびに傷害の半球同側において抑圧されるニューロンおよび軸索損傷を生じる。成体雄(280~300 g)Sprague-Dawleyラット(Harlan: Indianapolis, IN)を最初に、1:1 O₂/N₂Oの同伴ガス中の4%イソフルランで麻酔をかけ(4分)、続いて、同じ同伴ガス中の2.5%イソフルランで麻酔状態を維持した。コア身体温度は、直腸サーミスタプローブにより連続的にモニターされ、ラットの下に調節可能温度制御加温パッドを置くことにより37 ± 1 に維持された。動物は、腹臥位で定位固定フレームに乗せられ、耳および切歯バーにより固定された。

30

【0226】

正中頭蓋切開がなされ、軟組織が映し出され、片側(衝撃の部位と同側の)開頭(7 mm直径)が、中央縫合線に隣接した、プレグマと人字縫合との中間で行われた。硬膜は皮質の上で無傷のままにしておかれた。脳外傷は、5 mm直径アルミニウム衝撃部材チップ(空気圧シリンダーに格納された)で、3.5 m/sの速度で、2.0 mm 圧縮および150 ms 滞留時間(圧縮持続時間)で、右皮質(同側皮質)に衝撃を与えることにより生じさせられた。速度は、空気圧シリンダーへ供給される圧力(圧縮N₂)を調整することにより制御された。速度および滞留時間は、記憶トレースオシロスコープ(BK Precision, model 2522B; Placentia, CA)により記録されるアナログシグナルを発生する線速度変位変換器(Lucas Shaevitz(商標)モデル500 HR; Detroit, MI)により測定された。偽性傷害対照動物は、衝撃傷害を受けないことを除いて、同一の外科的手順を受けた。適切な傷害前および傷害後管理は、維持された。

40

【0227】

50

皮質組織およびCSFの調製

CSFおよび脳皮質は、偽性傷害またはTBI後、様々な間隔において動物から収集された。適切な時点において、TBIまたは偽性傷害動物を、上記のように麻酔し、頭が縦軸に沿って自由に動くことを可能にして、定位固定フレームに固定した。頭は、首における外後頭隆起が突出するように動かされ、背側正中切開が、頸椎および後頭部の上になされた。環椎後頭膜は、鈍的切開に曝され、ポリエチレンチュービングに取り付けられた25G注射針は、大橋へ注意深く降ろされた。CSFの約0.1~0.15 mlが各ラットから収集された。CSF収集後、動物は、定位固定フレームから取り出され、すぐに断頭により殺された。

【0228】

同側性および対側性(衝撃部位に対して)皮質は、その後、迅速に切開され、氷冷のPBSでリンスされ、液体窒素中で急速凍結された。開頭の真下の皮質は、白質のレベルまで切除され、横方向へ~4 mmおよび体軸方向へ~7 mm、拡大された。CSF試料は、いずれの混入した赤血球もクリアランスするために、4 で4分、4000 gで遠心分離された。クリアランスされたCSFおよび凍結組織試料は、使える状態まで-80 で保存された。皮質は、広範囲プロテアーゼインヒビターカクテル(Roche Molecular Biochemicals、カタログ番号1-836-145)を含む氷冷の3連の界面活性剤溶解緩衝液(20 mM Hepes、1 mM EDTA、2 mM EGTA、150 mM NaCl、0.1% SDS、1.0% IGEPAL40、0.5% デオキシコール酸、pH 7.5)の15倍容量においてTEFLON加圧型ペッスル(dounce pestle)でガラスチューブ内でホモジナイズされた。

10

【0229】

ヒトCSF試料は、TBIを患っているヒト被験体から、およびTBIをもたず、水頭症を有する対照患者から、インフォームドコンセントを以て入手された。

20

【0230】

サンドイッチELISA

抗生物マーカー特異的ウサギポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体は実験室において作製される。抗体の反応性および特異性を測定するために、組織パネルがウェスタンブロットにより探索される。間接的ELISAは、アッセイに用いられる抗体の最適な濃度を決定するためにELISAプレートに付着した組換え生物マーカータンパク質と共に用いられる。このアッセイは、アッセイに用いられる抗生物マーカーの堅調な濃度を決定する。96ウェルマイクロプレートウェルは、50 ng/ウェルでコーティングされ、ウサギおよびマウス抗生物マーカー抗体は、アッセイに用いられ得る最適な濃度を決定するために1:250希釈から始め、1:10,000に至るまで段階的に希釈される。二次抗ウサギ(またはマウス)西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)標識検出抗体およびUltra-TMBが、その結果を評価するための検出基質として用いられる。

30

【0231】

いったん最大シグナルについての抗体の濃度が決定されたならば、各抗体についての間接的ELISAの最大検出限界が決定される。96ウェルマイクロプレートは、50 ng/ウェルから<1 pg/ウェルまで段階希釈された濃度でコーティングされる。検出について、抗体は、上で決定された濃度まで希釈される。これは、生物マーカーELISAアッセイについての感度範囲を提供し、どの抗体が捕獲および検出抗体として選択されるべきかを決定する。

40

【0232】

サンドイッチELISAにおけるシグナルの最適化および増強：検出抗体は、いずれの交差反応性も避けるために、および非常に感度の高い増幅系でシグナルを増強することができるように、HRPで直接的に標識される。この形式は、すべての生物マーカーを検出する際に用いられる。96ウェルプレートのウェルは、精製された抗体(~250 ng/ウェル)の飽和濃度でコーティングされ、生物マーカー抗原の濃度は、50 ng/ウェルから<1 pg/ウェルの範囲であり、検出抗体は上記で決定された濃度である。最初に、複合体は、SW ELISA形式を確認するためにHRP標識二次抗体で検出され、検出系は、HRP標識検出抗体に置き換えられる。

【0233】

50

生物マーカーの標準曲線ならびに対照および傷害された動物由来の試料が用いられる。これはまた、血清試料と標準曲線の間の平行度を測定する。血清試料は、標準曲線と類似した、各生物マーカーの段階希釈でスパイクされる。平行する結果は、80%~100%回収に等しい。任意の高濃度の血清が妨害物質を有する場合には、必要とされる最小希釈は、妨害を除去するように決定される。アッセイは、長い期間をかけて経過観察される異なる大きさの傷害を有する傷害された動物由来の血清において生物マーカーレベルを評価するために用いられる。

【0234】

ELISAは、生物マーカーに特異的であり、かつラットおよびヒトのCSFならびに血清において測定される範囲での感度である、標準96ウェル形式ELISAとして開発および最適化された。UCH-L1タンパク質を高特異性および感度を以て認識する抗体(図3および図4)が、捕獲および検出抗体として用いられた。検出抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)で標識され、比色定量的発色は、Ultra-TMBを用いて達成される。

10

【0235】

TBIについての生物マーカーとしてのUCH-L1の確証

University of Florida(Gainesville, FL and Banyan Biomarkers, Alachua FL)から入手されたラットおよびヒト試料を用いることにより、UCH-L1がTBIについての信頼性のある、かつ感度の高い生物マーカーであることが確認された。ラットCSFおよび血清試料は、制御皮質衝撃を用いて実験的脳傷害を受けた動物から得られた。CSFおよび血清におけるUCH-L1レベル(図9)は、傷害されていないまたは偽性傷害された対照においてよりも、脳傷害された動物において有意に高かった。同様に、高レベルのUCH-L1は、脳傷害を有するヒト患者由来の血清において測定され得るが、正常の健康な人々においてはアッセイ検出のレベルより下である(図9)。

20

【0236】

CSFのゲル電気泳動および免疫プロット分析

CSFのタンパク質濃度は、アルブミン標準を用いるピシンコニン酸微小タンパク質アッセイ(Pierce Inc., Rockford, IL)により測定された。タンパク質平衡試料は、蒸留H₂Oにおいて0.25 M トリス(pH 6.8)、0.2 M DTT、8% SDS、0.02% プロモフェノールブルー、および20% グリセロールを含む2倍のローディング緩衝液におけるドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)のために調製された。試料は、90 において2分間、加熱され、周囲温度で微量遠心分離機において10,000 rpmで1分間、遠心分離された。レーンあたり20~40マイクログラムのタンパク質が、200Vで1時間、6.5% トリス/グリッセル上でのSDS-PAGEにより日常的に分離された。電気泳動後、分離されたタンパク質は、5% メタノールと共に400 mM グリシンおよび0.025 M トリス(pH 8.9)を含む転写緩衝液において、125Vの定電圧で4 で2時間、ポリビニリデンフルオライド(PVDF)膜へ横方向に転写された。プロットは、TBST(25 mM トリスHCl pH 7.4、150 mM NaCl、0.05% Tween n-20、0.02% アジ化ナトリウム)中、5%脱脂乳において周囲温度で1時間、ブロッキングされた。

30

【0237】

脳またはCSFタンパク質を含む免疫プロットは、抗神経タンパク質特異的の一次抗体(例えば、抗UCH-L1、抗 -シヌクレインおよび抗p24)で探索された。TBST中の5%脱脂乳における一次抗体との一晚のインキュベーション後、プロットは、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ結合型ヤギ抗マウスIgG(1:10,000希釈)またはヤギ抗ウサギIgG(1:3000)を含む5%脱脂乳において周囲温度で1時間、インキュベートされた。アルカリホスファターゼに基づいた比色定量的発色(BCIP-NBT基質)または増強化学ルミネセンス(ECL, Amersham)試薬が、Kodak Biomax ML化学ルミネセンスフィルム上での免疫標識を可視化するために用いられた。

40

【0238】

神経タンパク質放出の評価

SDS-ポリアクリルアミド(SDS-PAGE)ゲル電気泳動および免疫プロット。実験の最

50

後において、細胞は、5つの同一の培養ウェルから採取され、15 ml 遠心管に収集され、3 000gで5分、遠心分離された。培地は除去され、ペレット細胞は、1x DPBSでリンスされた。細胞は、氷冷のホモジナイゼーション緩衝液[20 mM PIPES(pH 7.6)、1 mM EDTA、2 mM EGTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、50 μ g/mL ロイペプチン、ならびに、それぞれ10 μ g/mLの AEBSF、アプロチニン、ペプスタチン、TLCKおよびTPCK]に30分間、溶解され、25ゲージ注射針を有する1.0 mL 注射器を通して15回、剪断された。試料におけるタンパク質含有量は、Micro BCA法(Pierce, Rockford, IL, USA)によりアッセイされた。

【0239】

タンパク質電気泳動について、等量の総タンパク質(30 μ g)が、0.25 M トリス(pH 6.8)、0.2 M DTT、8% SDS、0.02% プロモフェノールブルー、および20% グリセロールを含む2 10 倍のローディング緩衝液において調製され、95 で10分、加熱された。試料は、7%アクリルアミド分解ゲルの上に4%スタッキングゲルを用いて、200Vで1時間、垂直電気泳動チャンパーにおいて分解された。免疫プロットングについて、分離されたタンパク質は、10 %メタノールと共に0.192 M グリシンおよび0.025 M トリス(pH 8.3)からなる転写緩衝液を用いて、定電圧(100V)、4 で1時間、ニトロセルロース膜(0.45 μ M)へ横方向に転写された。プロットは、20 mM トリス、0.15 M NaCl、および0.005% Tween-20中の5%脱脂乳において4 で一晩、プロッキングされた。クマーシーブルーおよびボンソーレッド(Pancea u red)(Sigma, St. Louis, MO)が、等量のタンパク質が各レーンに負荷されたことを確認するためにゲルおよびニトロセルロース膜を(それぞれ)染色するために用いられた。

【0240】

免疫プロットは、一次抗体(例えば、マウスにおいて産生された抗UCH-L1モノクローナル抗体(Chemicon)、マウスにおいて産生された抗 β -シヌクレインモノクローナル抗体(Chemicon)、マウスにおいて産生された抗p24モノクローナル抗体(Becton Dickson Bioscience))で下記のようにプローブ探索された。一次抗体(1:2000)での室温で2時間のインキュベーション後、プロットは、ペルオキシダーゼ結合型ヒツジ抗マウスIgGにおいて1時間、インキュベートされた(1:10,000)。増強化学ルミネセンス試薬(ECL, Amersham)は、Hyper film(Hyperfilm ECL, Amersham)上の免疫標識を可視化するために用いられた。

【0241】

統計学的解析

免疫プロットングにより検出されたタンパク質レベルの定量的評価は、コンピュータ 30 を用いた濃度測定スキャニング(ImageJ-NIH)により行われた。データは統合濃度測定値として得られ、同じプロット上で可視化された偽性傷害された動物からのスキャン上で得られた濃度測定レベルのパーセンテージへ変換された。データは、最小二乗直線回帰、続いてANOVAにより評価された。すべての値は、平均 \pm SEMとして与えられた。差は、 $p < 0.05$ の場合には有意とみなされた。

【0242】

実施例1: TBI後の齧歯類のCSFにおける神経タンパク質UCH-L1、p24、および β -シヌクレインの検出

TBIは上記のように齧歯類に引き起こされた。TBIもしくは偽手術後、または未処置ラットにおいて、CSFの試料が収集され、3つの新規な神経タンパク質生物マーカー(例えば、U 40 CH-L1(図3)、p24(図4)および β -シヌクレイン(図5))の存在について分析された。図3~5に示された結果は、TBI後の齧歯類のCSFにおける、UCH-L1(図3参照)、p24(図4参照)および β -シヌクレイン(図5参照)の非依存的または同時的蓄積を実証した。有意に、より少ないこれらの神経タンパク質が、偽性傷害された、および未処置の対照において観察された。プロットにおける各レーンは、異なる動物を表す。このアッセイの感度は、動物間の差の検出を可能にし、結果の予測にとって価値がある。この研究の結果は、TBI後、神経タンパク質が、ウェスタンプロット上でまたはELISAのような他のイムノアッセイにより容易に検出できるのに十分なレベルでCSFに蓄積されることを実証した。

【0243】

実施例2: ヒトTBIのCSFにおける神経タンパク質UCH-L1およびp24の検出

新規な神経タンパク質 (UCH-L1およびp24)の蓄積は、TBI後24時間目においてヒトCSFの試料において分析された。重症のTBIを経験した5人の患者および5人の神経学的対照(正常圧力水頭)から。TBIの齧歯類モデルにおけるように、検査された神経タンパク質 (UCH-L1およびp24)は、TBIのCSF試料において顕著であった。これらの神経タンパク質のレベルは、対照患者におけるものに比べ、TBI患者において非常に高かった(例えば、UCH-L1(図6)、p24(図7))。これらのデータは、TBI後、神経タンパク質が、ウェスタンブロット上でまたはELISAのような他のイムノアッセイにより容易に検出できるのに十分なレベルでヒトCSFに蓄積されることを実証した。

【0244】

他の態様

本発明は、その詳細な説明と共に記載されているが、前の説明は、例証することを意図され、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は、添付された特許請求の範囲の範囲により定義される。他の局面、利点および改変は、特許請求の範囲の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0245】

本発明は、添付された特許請求の範囲において特に指し示されている。本発明の上記およびさらなる利点は、添付図面と共に挙げられた以下の説明を参照することによりより良く理解され得る：

【図1】脳傷害生物マーカーの運命を示す概略図である。生物マーカーの発生の、脳から例えばCSF、血液、尿、唾液、汗などの生物体液へのそのような生物マーカーの最終的な放出の経路は、低侵襲性での生物マーカー検出の機会を提供する。

【図2】異なる細胞型(ニューロン、アストログリア細胞、ミクログリア細胞、乏突起神経膠細胞またはシュワン細胞)由来、およびニューロンの異なる細胞内構造の構造(樹状突起、軸索、細胞体、シナプス前終末およびシナプス後肥厚)由来の、脳傷害生物マーカーの起源を示す概略図である。

【図3A】ラットにおける実験的外傷性脳損傷後の齧歯類のCSFにおける新規な脳特異的マーカー#1：UCH-L1神経タンパク質の検出および蓄積を示すウェスタンブロットである。

【図3B】未処置の対照ラット由来のCSFと比較した場合の、実験的脳傷害：開頭術および制御皮質衝撃(CCI)により引き起こされた脳傷害後48時間目でのラットCSFにおける新規な脳特異的マーカー#1：ユビキチンC末端加水分解酵素L1(UCH-L1)の上昇を示すグラフである。

【図4A】ラットにおける実験的外傷性脳損傷後の齧歯類のCSFにおける新規な脳特異的マーカー#2：ニューロン微小管結合タンパク質(p24)の検出および蓄積を示すウェスタンブロットである。

【図4B】未処置の対照ラット由来のCSFと比較した場合の、実験的脳傷害：開頭術および制御皮質衝撃(CCI)により引き起こされた脳傷害後48時間目でのラットCSFにおける新規な脳特異的マーカー#2：ニューロン微小管結合タンパク質(p24)の上昇を示すグラフである。

【図5A】ラットにおける実験的外傷性脳損傷後の齧歯類のCSFにおける新規な脳特異的マーカー#3：ニューロンタンパク質 -シヌクレインの検出および蓄積を示すウェスタンブロットである。

【図5B】未処置の対照ラット由来のCSFと比較した場合の、実験的脳傷害：開頭術および制御皮質衝撃(CCI)により引き起こされた脳傷害後48時間目でのラットCSFにおける新規な脳特異的マーカー#3：ニューロンタンパク質 -シヌクレインの上昇を示すグラフである。

【図6A】TBI後24時間目にヒトCSFにおけるニューロン生物マーカー#1、UCH-L1レベルの検出および蓄積を示すウェスタンブロットである。

【図6B】明らかな脳傷害を有さない神経学的対照由来のCSFと比較した場合の、外傷性脳損傷後24時間目のヒトCSFにおけるニューロン生物マーカー#1、UCH-L1レベルの上昇を

10

20

30

40

50

示すグラフである。

【図7A】外傷性脳損傷後ヒトCSFにおける新規な脳特異的マーカー#2：ニューロン微小管結合タンパク質(p24)の検出および蓄積を示すウェスタンブロットである。

【図7B】明らかな脳傷害を有さない神経学的対照由来のCSFと比較した場合の、外傷性脳損傷後24時間目のヒトCSFにおけるニューロン生物マーカー新規脳特異的マーカー#2：ニューロン微小管結合タンパク質(p24)の上昇を示すグラフである。

【図8A】明らかな脳傷害を有さない神経学的対照由来のCSFと比較した場合の、外傷性脳損傷後のラットCSFにおける新規脳特異的マーカー#4：シナプトフィシンの検出を示すシナプトフィシンについての定量的SW ELISAからの結果である。

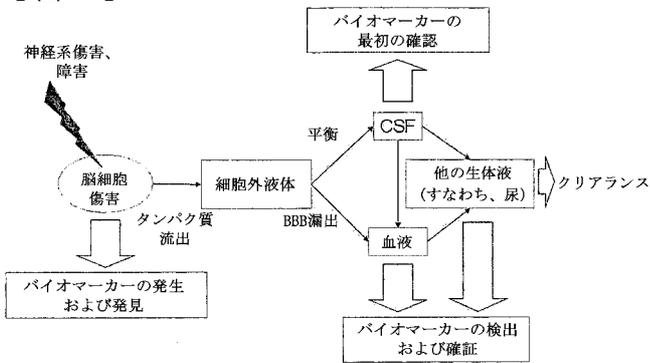
【図8B】明らかな脳傷害を有さない神経学的対照由来のCSFと比較した場合の、外傷性脳損傷後24時間目のヒトCSFにおけるニューロン生物マーカー新規脳特異的マーカー#2：ニューロン微小管結合タンパク質(p24)の上昇を示すグラフである。

【図9A】重症の外傷性脳損傷を有する患者由来のヒトCSFおよび血清由来の試料での定量的サンドイッチELISAにより測定された場合の新規脳特異的マーカー#1：ユビキチンC末端加水分解酵素L1(UCH-L1)の上昇を示すグラフである。

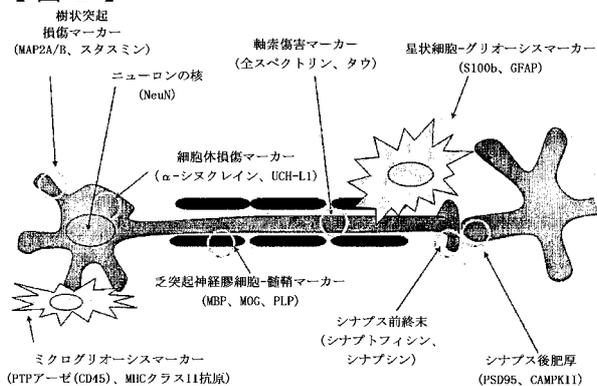
【図9B】重症のTBIを有する患者について血清で測定されたUCH-L1のレベルにおける定量的サンドイッチELISAにより測定された時間的変化を示すグラフである。血清試料は、患者が入院した時点(0d)において、ならびに傷害時点後12時間目(1d)、48時間目(2d)、72時間目(3d)、および120時間目(5d)において、採取された。

10

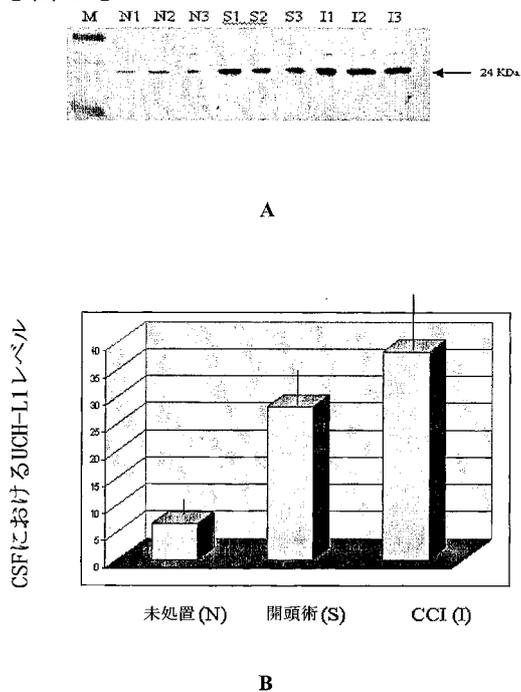
【図1】



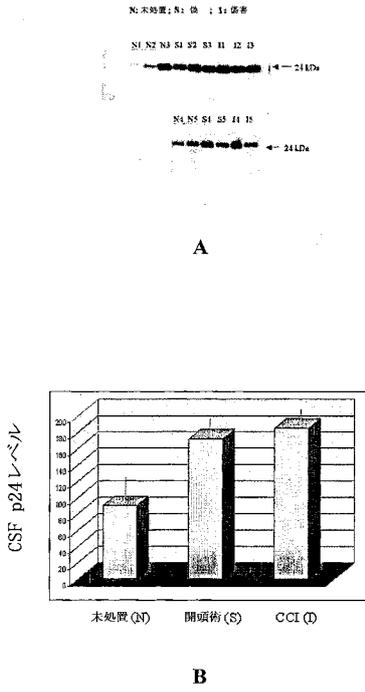
【図2】



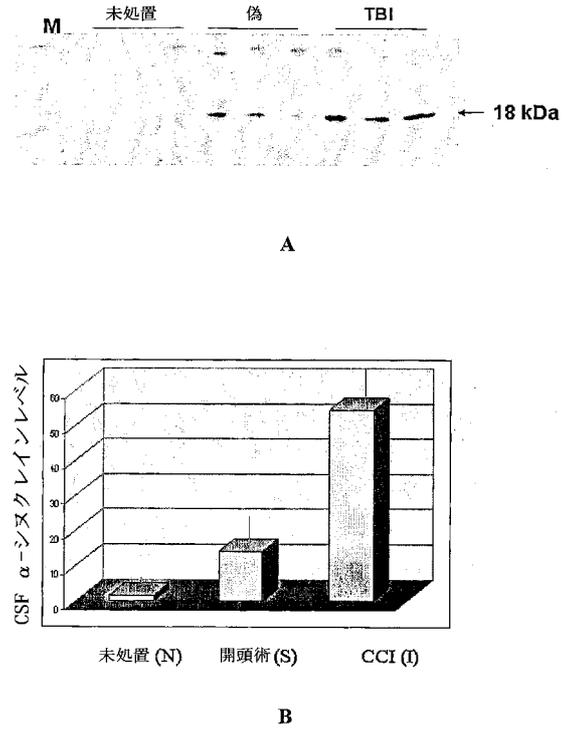
【図3】



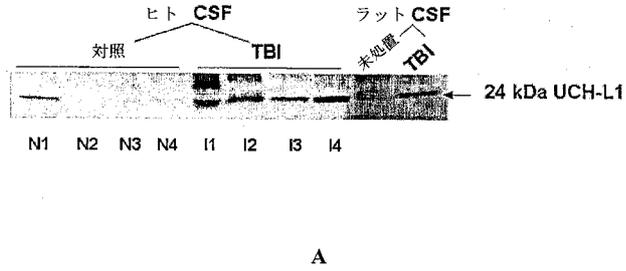
【 図 4 】



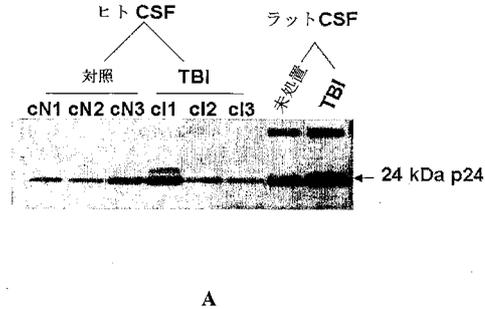
【 図 5 】



【 図 6 】



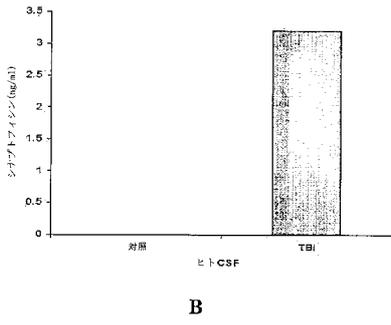
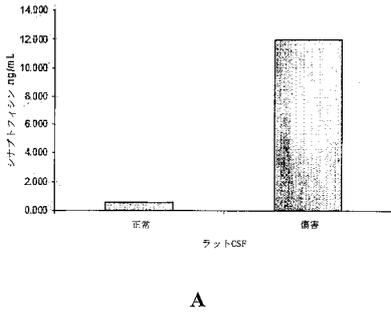
【 図 7 】



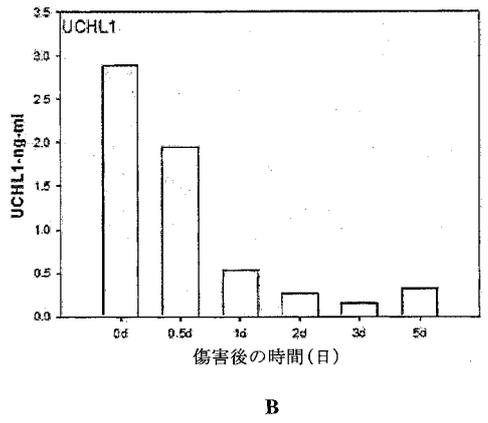
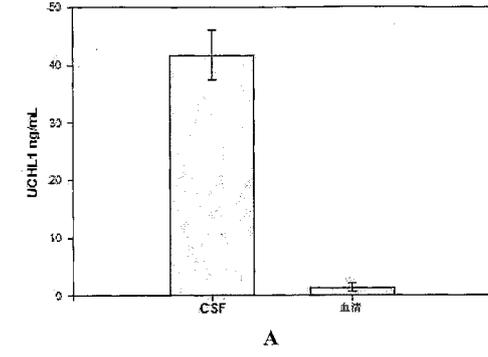
B

B

【 8 】



【 9 】



【 国際調査報告 】

60700520035



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/12746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC: G01N 33/53(2006.01);C12Q 1/68(2006.01)		
USPC: 4357.1.6.7.72		
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) U.S. : 4357.1,6,7,72		
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) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZAFFARONI, M. Biological indicators of the neurodegenerative phase of multiple sclerosis. <i>Neurol Sci.</i> 2003, Vol 24, pages S279-S282, especially page S280.	1-3, 18,19, 25-28, 47-49, 54,58
X	TBUNISSEN, C.E. Biochemical markers related to Alzheimer's dementia in serum and cerebrospinal fluid. <i>Neurobiol Aging.</i> 2002, Vol 23, pages 485-508, entire document, especially pages 487-490, Table 2; pages 494-496, Table 6.	1,2,8,12-13, 18-19, 25-28, 47-48, 54, 58, 63-64, 71-73
X	TOONEY, P.A. Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. <i>Prog Neuro Psychopharm Biol Psychiat.</i> Mar 2004, Vol 28, pages 273-278. entire article	1, 9,10, 14, 16, 22,
X	DeKOSKY, S.T. Looking backwark to move forward: early detection of neurodegenerative disorders. <i>Science</i> 31 October 2004, Vol 302, pages 830-834. especially pages 832-833.	1, 9-11, 20, 55,62-64
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"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
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"Z" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 15 February 2007 (15.02.2007)		Date of mailing of the international search report 22 MAR 2007
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized official Aditi Datta Telephone No. 571-272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

06. 8. 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/12746

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CUTLER, N.R. Review of the next generation of Alzheimer's Disease therapeutics: Challenges for drug development. <i>Prog Neuro Psychopharmacol Biol Psychiat.</i> , 2001, Vol 25, pages 27-57, especially pages 45-46, para 6.4.2.	1,2,12-13, 25-28, 47-48,63-64
X	BLENNOW, K. Cerebrospinal fluid protein biomarkers for Alzheimer's Disease. <i>The Jour of the Amer Soc for Experimental NeuroTherapeut.</i> April 2004, Vol 1, pages 213-225, especially see pages 214-221.	1,2,5,12-13,18-25,27-30,47-49,51,63,64,71-73
X	SMITH, D.H. et al. Protein accumulation in traumatic brain injury. <i>Neuromol Med.</i> 2003, Vol 4, pages 59-72, abstract	1,2,4,18-20,25-28,47-48,50,63-64
X, P	ANDRE, V.M. et al. NMDA receptor alterations in neurons from pediatric cortical dysplasia tissue. <i>Cereb Cort.</i> June 2004, Vol 14, pages 634-646, especially pages 635, Patient groups, Para 2; page 636, Immunohistochemistry; page 637, Fig 1	1, 6, 9-10,13,19,52,58, 61, 63-64
X	OHTA, M. et al. Clinical and analytical evaluation of ana enzyme immunoassay for myelin basic protein in cerebrospinal fluid. <i>Clin Chem. Sep 2000</i> , Vol 46, pages 1326-1330, especially Abstract; page 1326, Materials & Methods; pg 1327, fig 2; pg 1328, Fig 3; pg 1329, Fig 4.	1, 7, 12-14, 28-30, 53, 58, 63-64,71-73
X	TAHERI, S. et al., The role of Hypocretins (orexins) in sleep regulation and narcolepsy. <i>Ann Rev Neurosci</i> 2002, Vol 25, pages 283-313, especially pages 296, 298	1,15,27-28,63-70,
X	ZHANG, X. et al., Phenotypes of T cells infiltrating the eyes in autoimmune anterior Uveitis associated with EAE. <i>Invest Ophthal Vis.</i> 2002, Vol 43, pages 1499-1508, especially pg 1502, Table 2	1, 16,17
X	EVERBROECK, V. et al. A prospective study of CSF markers in 250 patients with possible Creutzfeldt-Jakob disease. <i>J Neurol Neurosurg Psychiat</i> 2003, Vol 74, pages 1210-1214, especially pg 1211, Results; pg 1212, Table 1; pg 1213, Table 3, Discussion, para 4.	1,2,12-13,20-22,25-28,47-48,58,63-64
X,P	INDEN, M. et al. Proteasome inhibitors protect against degeneration of nigral dopaminergic neurons in hemiparkinsonian rats. <i>J. Pharmacol.</i> 2005, Vol 97, pgs 203-211, especially pgs 204, immunohistochemistry; pg 206, fig 2 and 3	56
X	YOHRLING, G.J. et al., Inhibition of tryptophan hydroxylase activity and decreased 5-HT1A receptor binding in a mouse model of Huntington's Disease. <i>J Neurochem</i> 2002, Vol 82, pages 1416-1423, especially page 1419, Figs 1, 2; page 1421, para 1.	57
X,P	PEARL, P.L. et al. Clinical aspects of the disorders of GABA metabolism in children. <i>Curr Opin Neurol</i> 2004, Vol 17, pages 107-113, especially pages 110, para 2	59,60
X	SANCHEZ, J.C. et al., Cystatin C as a potential cerebrospinal fluid marker for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. <i>Proteomics</i> 2004, Vol 4, pages 2229-2233, especially page 2230, para 2, column 2, para 1.	1, 31,32,34-35,41, 44-46
X	WILSON, K.E. et al. Functional genomics and proteomics: application in neurosciences. <i>J Neurol Neurosurg Psychiat</i> 2004, Vol 75, pages 529-538, especially pgs 534, Protein microarray, para 1-2; page 535, fig 4; page 530; page 536, para 2, fig 5	20-28, 31-46

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US05/12746

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

STN (BIOSIS, MEDLINE); WEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPT) search terms: neuronal disorder, clinical diagnosis, detection, beta tubulin, nmda receptor, detection, tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase, kits, microarray, synuclein, MBP, DAT, orexin, prion, calbindin, proteomics; inventor search

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ワン カーワン ケビン

アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル サウスウエスト 19番 レーン 9966

(72) 発明者 リュウ ミンチェン

アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル サウスウエスト アーチャー ロード 2811

(72) 発明者 オリ モニカ

アメリカ合衆国 フロリダ州 ゲインズビル ノースウエスト 31番 テラス 3635

Fターム(参考) 2G041 CA01 DA01 DA03 DA04 DA05 EA01 EA11 FA12 GA06 JA07

LA07

专利名称(译)	神经蛋白作为神经系统损伤和其他神经病的生物标志物		
公开(公告)号	JP2007532915A	公开(公告)日	2007-11-15
申请号	JP2007508545	申请日	2005-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会，公司大学		
申请(专利权)人(译)	佛罗里达州研究基金会，公司大学		
[标]发明人	ヘイエスロナルド ワンカーワンケビン リュウミンチェン オリモニカ		
发明人	ヘイエス ロナルド ワン カーワン ケビン リュウ ミンチェン オリ モニカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N37/00 G01N27/62 C12Q1/68 G01N33/537 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/6896 G01N2800/28 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N27/62.V		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/DA01 2G041/DA03 2G041/DA04 2G041/DA05 2G041/EA01 2G041/EA11 2G041/FA12 2G041/GA06 2G041/JA07 2G041/LA07		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/562944 2004-04-15 US		
其他公开文献	JP4659025B2 JP2007532915A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明鉴定了用于诊断神经元损伤和/或神经元病症的生物标志物。检测本发明的不同生物标志物还用于诊断神经损伤的严重程度，涉及损伤的细胞和损伤的亚细胞定位。

