

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5190261号
(P5190261)

(45) 発行日 平成25年4月24日(2013.4.24)

(24) 登録日 平成25年2月1日(2013.2.1)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00 A
C 1 2 Q	1/68 (2006.01)	C 1 2 Q	1/68 A
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02
C O 7 K	14/435 (2006.01)	C O 7 K	14/435
C O 7 K	16/18 (2006.01)	C O 7 K	16/18

請求項の数 8 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-518337 (P2007-518337)	(73) 特許権者	597025806 ワシントン・ユニバーシティ Washington University アメリカ合衆国63130ミズーリ州セント・ルイス、ワン・ブルッキングズ・ドライブ
(86) (22) 出願日	平成17年6月27日(2005.6.27)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2008-504032 (P2008-504032A)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(43) 公表日	平成20年2月14日(2008.2.14)	(72) 発明者	ラーデンソン ジャック アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス ウォーレン アベニュー 557
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/022606		
(87) 国際公開番号	W02006/012351		
(87) 国際公開日	平成18年2月2日(2006.2.2)		
審査請求日	平成20年6月26日(2008.6.26)		
(31) 優先権主張番号	60/582,998		
(32) 優先日	平成16年6月25日(2004.6.25)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳損傷に対するマーカー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の段階を含む、対象において脳損傷の検出を補助する方法：
該対象の生体液またはその分画を含む試料を、visinin様タンパク質1 (VLP-1) マーカーの存在に対して分析する段階であって、

ここで正常な対象と比較した該対象の生体液またはその分画における該マーカーの存在のあらゆる上昇が、該対象における脳損傷の可能性の増加を示す、前記方法。

【請求項2】

対象がヒトである、請求項1記載の方法。

【請求項3】

生体液がCSF、血清または血漿である請求項1記載の方法。

【請求項4】

生体液が血清または血漿である請求項3記載の方法。

【請求項5】

以下からなる群より選択される少なくとも一つの追加のマーカーに対して該試料を分析する段階をさらに含む、請求項1記載の方法：

シナプトソーム関連タンパク質 (25 kDa SNAP25)、グルタミン酸脱炭酸酵素1 (脳、67 kDa、GAD67)、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質、シナプトタグミン1、チューブリン 4、線維束収縮および伸長タンパク質 1(zygin 1)、グリシン受容体、小胞膜タンパク質p24、olfactomedin 1、Zicファミリーメンバー1(奇数対ホモログ、シ

10

20

ヨウジョウバエ)、ニューロンにおけるタンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質1、プロテオリピドタンパク質1(ペリツェーウス-メルツパッヒャー病、痙性対麻痺2)、インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、溶質担体ファミリー32(GABA小胞輸送体、メンバー1)、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター(クレードIメンバー1(ニューロセルピン))、Neuronatin、アミノ酪酸(GABA)A受容体(gamma 2)、小胞関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)、およびneurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)。

【請求項6】

追加のマーカが以下からなる群より選択される、請求項5記載の方法：

シナプトソーム関連タンパク質(25 kDa SNAP25)、グルタミン酸脱炭酸酵素1(脳、67 kDa、GAD67)、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質、シナプトタグミン1、チューブリン 4、線維束収縮および伸長タンパク質 1(zygin 1)、グリシン受容体、小胞膜タンパク質p24、olfactomedin 1、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター(クレードIメンバー1(ニューロセルピン))、Neuronatin、アミノ酪酸(GABA)A受容体(gamma 2)、小胞関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)、およびneurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)。

10

【請求項7】

追加のマーカが以下からなる群より選択される、請求項5記載の方法：

Zicファミリーメンバー1(奇数対ホモログ、ショウジョウバエ)、ニューロンにおけるタンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質1、プロテオリピドタンパク質1(ペリツェーウス-メルツパッヒャー病、痙性対麻痺2)、インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、溶質担体ファミリー32(GABA小胞輸送体、メンバー1)。

20

【請求項8】

追加のマーカが以下からなる群より選択される、請求項5記載の方法：

セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター(クレードIメンバー1(ニューロセルピン))、Neuronatin、アミノ酪酸(GABA)A受容体(gamma 2)、小胞関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)、およびneurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

技術分野

本発明は、ヒトにおける発作またはアルツハイマー病、および他の動物における対応する状態のような脳損傷を診断するための、方法およびキットに関連する。より具体的には、脳損傷マーカを同定するための方法、ならびにそれらの検出のためのこれらのマーカおよび材料を用いて脳損傷を診断するための方法に関する。

【0002】

関連出願

本出願は、その内容が参照により本明細書に組み入れられる、2004年6月25日に出願された米国特許仮出願第60/582,998号の恩典を主張する。

【背景技術】

40

【0003】

背景技術

発作またはアルツハイマー病によって引き起こされるような脳損傷を評価するのに有用なマーカを同定するために、相当な労力が費やされた。例えば、虚血性発作の早期診断は、初期に投与される場合、発作の結果として生じる死亡率および罹患率の減少において非常に効果的であることが示された組換え組織プラスミノーゲン活性化因子の投与のような、適切な処置を可能にするために重要であると考えられている。さらに、出血性発作、窒息した正期産児への損傷、心臓外科手術の結果生じた脳損傷、アルツハイマー病、または種々の神経変性疾患のような脳損傷の他の形態は、評価されることが望ましい。しかしながら、さらなる診断手順は、場合によってはこれらの様々な可能性の中で区別すること

50

を要求され得る。

【 0 0 0 4 】

脳脊髄液(CSF)のような液体中またはより簡便に血清もしくは血漿もしくは尿中に、一般的に脳の特性であるタンパク質または他の物質が存在することによって、様々なタイプの脳損傷が示されることが一般的に認識される。適切な処置を同定するための診断のために、または単に予後のために用いられ得るそのような因子を同定することの望ましさもまた、広く認識されてきた。例えば、Warlow, C., Lancet(2003)362:1211-1224 ; Qureshi, A., et al., New EngJMed, (2001)344:1450-1460 ; Marler, J. R., et al., Science(2003)301 : 157 ; Garca-Alix, A., et al., Acta Paediatr(2001)90:1103-1105 ; Verbeek, M. M., et al., Ann Clin Biochem(2003)40:25-40を参照されたい。

10

【 0 0 0 5 】

本理解のため、様々なグループが、特徴的な脳タンパク質を同定するために、脳のプロテオミクス研究に着手してきた。2-D電気泳動および質量分析法を用いたマウスにおける脳タンパク質の分析は、Gauss, C, et. al., Electrophoresis(1999)20:575-600によって公開された。パターンは、そのうち200が論文において同定された8,767のタンパク質スポットを示した。二次元ゲル電気泳動法および質量分光法が、死亡後6時間で得られたCSFに適用され、かつ新鮮なCSFと比較された。そのうちのいくつかは神経変性疾患と以前に関連していた13の候補タンパク質が同定された(Lescuyer, et al. Proteomics(2004)4:2234-2241)。本アプローチの一般的な分析は、Lubec, G., et al., Progress in Neurobiol(2003)611 : 1-19によって記載される。Abbott, A., Nature(2003)425:110によるニュース記事は、ヒト脳の分析が剖検を行った組織に依存しなければならない一方、マウス脳が新鮮な組織を用いて様々な年齢で分析され得ることを指摘する。例えばKato, N., et al., Atherosclerosis(2002)163:279-286およびRosand, J., et al., Stroke(2003)34:2512-2517によって、発作または他の脳損傷関連状態に対するゲノムの影響を分析することもまた、試みられた。

20

【 0 0 0 6 】

科学文献において報告された脳外傷の多くのバイオマーカーがある。これらは、S-100B、ニューロン特異的エノラーゼ(NSE)、グリア繊維関連タンパク質(GFAP)、ミエリン塩基性タンパク質(MBP)、およびその他を含む(Aurell, A., et al., Stroke(1991)22:1254-1258 ; Barone, F. C, et al., Brain Res(1993)623:77-82 ; Cunningham, R. T., et al., Eur J Clin Invest(1991)21 : 497-500 ; Hardemark, H. G., et al., J Neurosurg(1989)71 : 727- 731 ; Hardemark, H. G., et al., Stroke(1988)19:1140-1144 ; Hatfield, R. H., et al., Brain Res(1992)577:249-252 ; Hay, E., et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry(1984)47:724-729 ; Noppe, M., et al., Clin Chim Acta(1986)155:143-150 ; Steinberg, R., et al., JNeurochem(1984)43:19-24)。

30

【 0 0 0 7 】

S-100Bは、複合体ニューロン-グリア相互作用を調節するCa²⁺-結合タンパク質であり、かつニューロン中ではなく、大部分はグリア、メラノサイト、シュワン細胞、ランゲルハンス細胞、および下垂体前葉細胞中に見出される。S-100Bの高い血清レベルは、発作、心停止後脳外傷、および傷害性頭部外傷と関連していた(Aurell, A, et al., Stroke(1991)22:1254-1258 ; Hardemark, H. G., et al., J Neurosurg(1989)71 : 727-731 ; Noppe, M, et al., Clin Chim Acta(1986)155:143-150 ; Bottiger, B. W., et al. Circulation(2001)103:2694-2698, Sellman, M., et al., ScandJ. Thor. Cardiovasc. Surg.(1992)26:39-45, Shaabam, A., et al., Brit J Anesthesia(2000)85:287-298)。

40

【 0 0 0 8 】

Leviton, A., et al., Acta Paediatr(2002)91 : 9-13は、そのような外傷を評価するこれらの診断的能力を意図して、小児における脳損傷に対するマーカーとしてS-100B、グリア原線維酸性タンパク質(GFAP)、およびNSEの使用をさらに研究した。Rothoerl, R. D., et al., Acta Neurochem(2000)Suppl. 76:97-100は、重篤な頭部外傷の後、S-100Bの血清レベルもまた上昇することを示した。Abraha, H. D., et al., Ann Clin Biochem.(1997)

50

34:546-550は、血清S-100タンパク質の測定値が、急性の発作における臨床的な結果の有用な予後徴候マーカーであることを示唆する。S-100BおよびNSEが脳損傷の有意なマーカーであるというさらなる確認は、Mussack, T., et al., Shock(2002)18:395-400およびVos, P. F. et al., ibid. 481-482による本論文についてのコメントにおいて記載される。S-100B、GFAP、およびNSEの増加した血清濃度が様々な急性中枢神経系疾患と関連していたことに留意されたい。

【 0 0 0 9 】

しかしながら、S-100Bは、白色および褐色脂肪組織、皮膚、骨格筋、メラノーマ、および神経グリア芽腫細胞においても(Zimmer, D. B., et al., Brain Res Bull(1995)37:417-429; Ilg, E. C., et al., Int J Cancer(1996)68:325-332)、ならびに筋肉、心臓、および腎臓においても発現するため(Baudier, J., et al., J Biol Chem(1986)261:8192-8203; Missler, U., et al., Eur J Clin Chem Clin Biochem(1995)33:743-748)、脳特異的ではない(Vaage, J., et al., J Thorac Cardiovasc Surg(2001)122:853-855; Unden, J., Scand J Infect Dis(2004)36:10-13)。

【 0 0 1 0 】

NSEはおよそ80 kDaの総分子量を有する解糖系の可溶性酵素である、タンパク質エノラーゼの、 α -二量体(2-ホスホD-グリセラート加水分解酵素)を表す(Schmechel, D., et al., Science(1978)199:313-315)。NSEは、神経細胞の原形質および樹状突起中、ならびにアミン前駆体取り込みおよび脱炭酸(APUD)細胞システムの細胞中に発現する。初期の臨床研究は、発作または心停止患者における高い血清NSE力価を説明するのに有効である(Persson, L., et al., Stroke(1987)18:911-918; Dauberschmidt, R., et al., Mol Chem Neuropathol(1991)14:237-245; Schaarschmidt, H., et al., Stroke(1994)25:558-565)。さらに、APUDomas、神経芽細胞腫、精上皮腫、および肺の小細胞型癌における腫瘍細胞もまたNSEを発現する。このために、NSEは、そのような新生物の臨床管理における診断的および予後徴候の血清マーカーとして研究された。しかしながら、NSEは、赤血球および血小板中にも見られ、脳に特異的であると考えすることはできない(Johnsson, P. J., Cardiothorac Vasc Anesth(1996)10:120-126)。

【 0 0 1 1 】

マーカーの併用が、発作に対するよりよい感度および特異性を得る試みにおいて用いられた。あるグループは、脳マーカー、ニューロン-特異的エノラーゼ、ミエリン塩基性タンパク質、およびS-100Bの併用を利用した(Kupchak, P., et al., Clin Chem(2005)51(6):A119およびA120; 要約)。他のグループは、>50のタンパク質バイオマーカーを評価し、かつS-100B、B-タイプ神経栄養性増殖因子、フォンウィルブランド因子、マトリックス・メタロプロテイナーゼ-9、および単球化学向性のタンパク質-1を選択した(Reynolds, M., Clin Chem(2003)45(10):1733-1739)。他の研究において、脳損傷(S100B)、炎症(マトリックス・メタロプロテイナーゼ-9および血管細胞接着分子)、および血栓症(フォンウィルブランド因子)に基づくバイオマーカーが、急性発作を同定するために併用された(Lynch, et al., Stroke(2004)35:57-63)。

【 0 0 1 2 】

出願は、Biosite, Inc.によって急性発作のためのマルチマーカー診断装置のためにFDAに提出された。マーカーは、S-100B、脳ナトリウム利尿タンパク質、D-二量体、およびマトリックス・メタロプロテイナーゼ-9である。

【 0 0 1 3 】

現時点では、脳外傷以外の現象のマーカーと併用される場合でさえ、さらなる、および現在利用可能なものより信頼性が高い脳損傷のマーカーが必要とされる。上記のように、現在利用される脳損傷マーカー全てが、十分に特異的であるというわけではない。

【 発明の開示 】

【 0 0 1 4 】

発明の開示

本発明は、脳損傷のマーカーを同定するための方法、ならびにこれらのマーカーを用い

10

20

30

40

50

て脳損傷の存在および進行を予測するための方法を提供する。典型的に、マーカーは、脳における関連した遺伝子の発現増強を示すタンパク質またはそれらのコード化mRNAである。これらのマーカーが体液中、例えば、脳脊髄液、血液中、または尿中に検出される場合、それらは脳損傷に特徴的な組織損傷と関連している。

【0015】

脳損傷の特に重要な形態は発作であり、それは多数の個体に影響を及ぼし、かつ十分に初期に正しく同定される場合、効果的処置を可能にする。多くの発作犠牲者は、現在用いられているアプローチが十分な時間内に状態を正しく診断し、かつ処置するのに無力であるため、死亡するか、または非常に低下した生活の質を示すことが推定される。脳損傷が有意であるという他の徴候は、心的外傷、窒息による損傷、侵襲的手術と関連する損傷、およびアルツハイマー病のような神経変性疾患を含むが、これらに限定されない。

10

【0016】

したがって、一つの局面において、本発明は、脳損傷診断に有用なマーカーを同定するための方法を目的とし、本方法は遺伝子発現のための新鮮な脳組織または新鮮-凍結脳組織を評価する段階、および該新鮮な脳組織または新鮮-凍結脳組織中の遺伝子発現のレベルを、筋肉または肝臓のような他の新鮮な組織または新鮮-凍結組織中の同じ遺伝子の発現レベルと比較する段階を含む。新鮮な脳において、代替の組織中より少なくとも10倍高い発現レベルを有する遺伝子は、脳損傷に対するmRNAまたはタンパク質マーカーを生成するものとして同定される。これらのマーカーを同定するために用いられ得るさらなる基準は以下である：1)脳組織においてバックグラウンドの少なくとも10,000倍のmRNAの発現レベルを示す遺伝子；2) < 70 kDの分子量のタンパク質をコードする遺伝子；および3)その遺伝子によってコードされるタンパク質が、脳においてウエスタンブロットまたは他の標準的技術を用いて検出可能である事例。バックグラウンドより上の高いレベルでの発現は、検出標的として有用となる発現マーカーの脳における十分な存在量を保証する。

20

【0017】

さらに以下に記載するように、組織が不適当に保存される場合、またはヒト脳を直接試験する場合、脳が必然的に剖検を行われた組織の場合であるような非自然状態にある場合、mRNAのレベル、および脳(または他の組織)におけるタンパク質は変化し得るため、本方法が、マウス、ラット、またはウサギのような実験動物に由来し得るような新鮮な脳組織または新鮮-凍結脳組織を使用することが、特に重要である。新鮮な動物組織において決定されるマーカーのヒト類似体が容易に同定され得るように、本代理種を利用することに損失はない。さらに、実験動物において同定されるマーカーおよびそれらのヒト対応物と交差反応する、モノクローナル抗体を含む抗体が調製される。

30

【0018】

第二の局面において、本発明は、対象における脳損傷の発生、またはその後の発生の高い確率を診断する方法を目的とし、本方法は上述のように同定される1つまたは複数のマーカーの存在について該対象の生体液を分析する段階を含む。特に、これらのマーカーは、以下に位置する遺伝子の産物を含むが、これらに限定されない：visinin様1(VLP-1)をコードする遺伝子I.D. No. 7447(VSNLI)、シナプトソーム関連タンパク質、25 kDaをコードする遺伝子I.D. No. 6616(SNAP25)、グルタミン酸脱炭酸酵素1をコードする遺伝子I.D. No. 2571(GADI)(脳、67 kDa(GAD67))、ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質をコードする遺伝子I.D. No. 4336(MOBP)、シナプトタグミン1をコードする遺伝子I.D. No. 6857(SYTI)、チューブリン、4をコードする遺伝子I.D. No. 10382(TUBB4)、線維束収縮および伸長タンパク質1(zygin 1)をコードする遺伝子I.D. No. 9638(FEZI)、グリシン受容体、をコードする遺伝子I.D. No. 2743(GLRB)、小胞膜タンパク質p24をコードする遺伝子I.D. No. 140767(VMP)、olfactomedin 1をコードする遺伝子 I.D. No. 10439(OLFMI)、Zicファミリーメンバー1をコードする遺伝子I.D. No. 7545(ZICI)(奇数対ホモログ、ショウジョウバエ(Drosophila))、ニューロンにおけるタンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質1をコードする遺伝子I.D. No. 29993(PACSINI)、プロテオリピドタンパク質1をコードする遺伝子I.D. No. 5354(PLPI)(ペリツェーウス-メルツパッヒャー

40

50

病、痙性対麻痺2)、インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、 をコードする遺伝子I.D. No. 9118(INA)、溶質担体ファミリー32(GABA小胞輸送体)、メンバー1をコードする遺伝子I.D. No. 140679(SLC32A1)、セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレードI(ニューロセルピン)、メンバー1をコードする遺伝子I.D. No. 5274(SERPINI1)、Neuronatinをコードする遺伝子I.D. No. 4826(NNAT)、 アミノ酪酸(GABA)A受容体、 2をコードする遺伝子I.D. No. 2566(GABRG2)、小胞関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)をコードする遺伝子I.D. No. 6844(VAMP2)、またはneurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)をコードする遺伝子I.D. No. 4900(NRGN)。

【0019】

前述のものは、本発明の方法を用いて新鮮な脳において特異的に、十分に高いレベルで発現することが同定され、それはマウス対象を用いて図示するように、新鮮な脳組織を使用することによって特徴付けられる。

10

【0020】

他の局面において、本発明は、診断される対象の生体液における、本発明のマーカの存在またはレベルを決定するのに有用な組成物を目的とする。そのような組成物または試薬は、関連した遺伝子によってコードされるタンパク質に特異的に免疫反応を示す抗体、ストリンジェントな条件下で、これらの遺伝子から転写されるmRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブ、および該mRNAを増幅するのに適切なオリゴヌクレオチドプライマーを含む。

【0021】

20

抗体、オリゴヌクレオチドプローブ、および/またはプライマーを含む診断のためのキット、ならびに生体液試料中に標的を有するこれらの試薬の関連を同定するための他の試薬もまた、本発明の範囲内に含まれる。

【0022】

発明を実施するための形態

貯蔵された脳または剖検を行われた脳と対照的に、新鮮な脳組織を用いることにより、出願人は、肺、腸、骨格筋、膵臓、心臓、肝臓、脾臓、または腎臓のような非脳組織中に発現する遺伝子より、はるかに高いレベルで新鮮な脳組織中に発現する多くの遺伝子を同定することに成功した。新鮮な脳組織は、ウサギ、ラット、マウス、モルモットなどのような試験の実験動物から得ることができる。(本明細書で使用される場合、「新鮮」は新鮮凍結を含む。)好ましい供給源は、マウス由来の新鮮脳組織である。比較のために用いられる非脳組織は、同様に新鮮であり、かつ同一対象から得ることが好ましい。下記の実施例において、発現は遺伝子マイクロアレイを利用することによって検出され、定量的RT-PCR、タンパク質に対するイムノアッセイなどを含む、発現を評価する他の方法もまた適用可能である。遺伝子発現を評価するための方法は当技術分野において周知であり、かつ多くのそのような方法は商業的に入手可能である。

30

【0023】

前述のように、多くのゲノムの遺伝子座は、脳において高く発現するが、他の組織および器官においては非常に低いレベルか、または全く発現しないものとして同定された。これらの遺伝子座の発現産物の脳自体から生体液への移動は、脳損傷または例えば発作発生の確率と関連しているとして検証された。さらに、同定されるいくつかのタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体が調製された。これらの抗体、ならびに他の特異的結合パートナーは、生体液中のタンパク質を検出することによる発作診断のための方法において有用である。

40

【0024】

脳損傷に対するmRNAまたはタンパク質マーカを生成する際の遺伝子を同定するための第一の基準は、脳における発現の特異性である。特に、脳におけるそのmRNA発現レベルが、肺、腸、骨格筋、膵臓、心臓、肝臓、脾臓、および腎臓を含む様々な他の組織における発現レベルより、少なくとも10倍高い遺伝子が選択された。さらなる基準もまた役立つ。アッセイにおける検出に十分な標的を提供するであろう、脳における発現レベルを保証す

50

ることは有用である。本基準は、バックグラウンドと比較した、発現レベルとみなされる。mRNAレベルが基準として使用される場合、バックグラウンドは、GeneChip(登録商標)アレイ・フォーマットにおいて、ミスマッチ・オリゴヌクレオチドから得られるシグナルとして定義される。すなわち、問題の遺伝子によって生成されるmRNAに対する平均差値は、(完全一致が生じる場合生成される)適切なRNAのシグナル強度と、ミスマッチ・オリゴヌクレオチドが使用される場合に作製されるシグナルの差である。本基準の詳細は、実施例1に記載される。該バックグラウンドより上に10,000倍を超えるレベルのmRNA発現を与える遺伝子は、脳において検出のためのベースを提供するのに十分に豊富であるとみなされる。

【0025】

さらにアッセイ法がタンパク質レベルで実行される場合、ウエスタンブロットを用いて脳組織ホモジェネートをアッセイすることによって、適切なレベルのタンパク質の存在を保証することが望ましい。本出願においてマーカーとして同定される大部分の遺伝子は、ウエスタンブロット上の脳ホモジェネートに由来するタンパク質の、検出可能なレベルを提供する。さらに、タンパク質レベルのアッセイ法が使用される場合、血液脳関門を通過する能力を保証する<70 kDaのタンパク質をコードする遺伝子を選択することが望ましい。

【0026】

最初の2つの基準(他の組織と比較して脳における10倍より高い発現)およびバックグラウンドに対して10,000倍高い発現レベルは、mRNAがマーカーとして用いられる場合、特に有意であり、かつウエスタンブロット上のタンパク質の様相、および<70 kDaのタンパク質の選択は、タンパク質がマーカーとして用いられる場合、特に重要である。

【0027】

本発明の検出方法のための試料として有用である生体液は、血漿または血清、脳脊髄液、尿、およびリンパ性の液体のような血液ならびにその分画を含む。血漿または血清または尿がより簡便である。対象は、ヒト患者であり得るか、または飼いなされた伴侶動物、家畜、試験的実験動物、もしくは脳損傷に供された任意の脊椎動物系のような動物であり得る。従って、対象は、ヒト、ウシ、ウマ、ブタ、ネコ、イヌ、ラット、ウサギ、マウス、ニワトリ、および他の家禽またはウマであり得る。最も大きな関心は、ヒトの生体液におけるこれらのマーカーの検出である。

【0028】

生体液において遺伝子発現を検出するための多種多様な方法が利用可能である。非常に簡潔な例示的リストは、試薬としてオリゴヌクレオチドプライマーを用いる定量的PCRを用いるmRNAレベルの検出、試薬として遺伝子座から転写されるmRNAに特異的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブを用いるノーザンブロットまたは他のフォーマット、コードされたタンパク質のレベルを検出するための抗体を用いるイムノアッセイ法、ならびに例えば質量スペクトルパターンおよびクロマトグラフィ法のようなタンパク質またはmRNAレベルの他の指標に依存した多数の他の方法を含むであろう。当業者は、発現レベルを検出するためのこれらのおよび多くの他の方法を認識するであろう。

【0029】

本発明の一つの例示的な方法に関してさらに詳細には、イムノアッセイは簡便な態様である。そのようなアッセイ法における使用のために、マーカータンパク質と特異的に免疫反応性のある抗体は、マウス、ウサギ、またはヤギのような適した対象の免疫化、および脾臓もしくはB細胞の他の供給源を用いる抗体のポリクローナル血清の調製、または好ましくはモノクローナルの形態の調製、および標準融合技術を含む公知の手順によって調製され得る。さらに、モノクローナル抗体をコードする遺伝子は単離され、かつFv単鎖抗体のような改変形態を含む組換え形態を生産するために用いられ得る。標的タンパク質とそれ自身免疫反応性である抗体の断片は、アッセイにおいてもまた用いられ得る。抗体をインビトロ診断において用いるために、例えば、マウスの抗体をさらに改変し、ヒト/マウスキメラを調製する理由、またはヒト診断のためにそれらをヒト化する理由はないかもし

10

20

30

40

50

れない。しかしながら、そのような改変形態の使用は除外されない。

【0030】

本明細書で使用される場合、「抗体」は、免疫グロブリンおよびこれらのタンパク質の免疫反応性断片の様々な形態を含む。例えば、「抗体」は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、単鎖抗体(Fv)のような断片、キメラ抗体、組み換えによって生産される抗体、またはハイブリドーマから生産される抗体などを含むが、これらに限定されない。インビトロ診断においてそれらの使用が必要とされないとしても、ヒト化抗体もまた含まれる。

【0031】

本発明のいくつかのマーカータンパク質の検出において有用な、特異的モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は、以下に開示される。これらの抗体は、それらによって特異的に結合されるタンパク質の特異的エピトープを認識する。本発明はまた、これらの抗体、およびこれらの例証された抗体が結合するのと同じエピトープを結合する抗体を目的とする。抗体が特定のタンパク質と「免疫反応性である」と示すことは、複雑な環境において抗体(または免疫反応性断片)がそのタンパク質にその検出を可能にする様式で結合することを意味する。多くの抗体は他のタンパク質と交差反応性であるが、概してそれらが特異的に免疫反応性であるものより非常に低いレベルであることが理解される。

【0032】

イムノアッセイ法は、直接および競合的サンドイッチアッセイ法、検出試薬として放射性トレーサを利用するアッセイ法、蛍光検出、化学発光検出、酵素を用いる錯体化による検出(ELISAアッセイ法)、またはフローサイトメリーの様々な形態を含む多くのフォーマットで実施され得る。そのようなアプローチは、熟練者に周知であろう。本明細書において例証される特定の態様は、サンドイッチアッセイ法、および標識されたキャッピング抗体による検出においてモノクローナル抗体を使用する。記載した標識されたキャッピング抗体は、精製したウサギ・ポリクローナル抗体であるが、様々な供給源由来のモノクローナルまたはポリクローナル抗体であってもよい。側方流動アッセイ法、遠心流動アッセイ法、アッセイストリップ法、均質アッセイ法などのような様々な他のプロトコールもまた用いられ得る。

【0033】

別の局面において、本発明は、診断を実施するために有用なキットを含む。アッセイ法がイムノアッセイ法である場合、キットは少なくとも、指定されたマーカーと免疫反応性である抗体またはその断片もしくは改変形態を含むであろう。結果として生じる複合体の検出のためのさらなる抗体、またはそのような検出のための他の試薬もまた含み得る。アッセイキットは、分析物の捕獲および標識化のための固体支持体もまた含み得る。

【0034】

mRNAの検出に依存するキットは、マーカーまたはそこにハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブをコードしているmRNAを増幅するように設計された特異的プライマーを含むであろう。適した検出試薬もまた含まれる。

【0035】

いずれの場合においても、分析物発現産物に対する任意の特異的結合パートナーが用いられ得る。例えば、受容体タンパク質に対するリガンドおよびその逆、または標的RNAもしくはそこから生成されるDNAを結合するように特異的に設計された試薬が使用され得る。

【0036】

以下の実施例は例示のために提供されるが、発明を限定するものではない。

【0037】

実施例1

脳において過剰発現される遺伝子の同定

4~6週齢のC57BL/6マウス3匹(オス2匹およびメス1匹)(Jackson研究室)由来の脳、肝臓、脾臓、腎臓、骨格筋、肺、膵臓、心臓、および小腸が、慎重な解剖により得られた。器

10

20

30

40

50

官試料は、液体窒素中で急激に凍結され、かつRNAを単離するように加工された。RNAの質は、以下によって確認された：1)260 nm/A280 nmの吸光度比が > 1.9であるRNAのスペクトロフォトメトリー；2)RNA LabChip (Agilent 2100 Bioanalyzer RNA 6000 LabChip kit) によって観察した際、抽出されたRNAの28S/18Sの比は > 1.4であった。

【 0 0 3 8 】

総RNAから、ビオチン化cRNAプローブが生成され、断片化され、かつマウスMU74A(バージョン1)GeneChip(登録商標)アレイ(Affymetrix, Santa Clara, CA)に適用された。各チップにわたる全体的な蛍光強度は、Affymetrix分析ソフトウェア(Microarray Suite)によって1500に縮尺された。データはMicrosoft Excelワークシートに転送された。1つの選択基準は、脳において平均差値 > 10,000を有する遺伝子発現であった(すなわち完全一致、および遺伝子チップ・アレイの一部であるミスマッチ・オリゴヌクレオチド間の違いを算出するAffymetrixソフトウェアによって計算される各mRNAのシグナル強度)。上述のように平均差値は、「バックグラウンド」より上の発現レベルを反映し、かつ適したマーカーを提供するのに十分な発現産物の存在量を示す。それが脳において転写産物の高度な存在量を示唆することから、10,000の平均差値が選択された。第二の基準は、脾臓、腎臓、骨格筋、肺、膵臓、心臓、および小腸に対して10倍高い脳における発現であった。29個の遺伝子がこれらの基準に合致し、選択された。

10

【 0 0 3 9 】

遺伝子の本リストのヒトホモログは、下記の生命情報科学データベースにおいて閲覧した：

20

ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=geneに見出されるEntrez Gene；

ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIMに見出されるOMIM；および

ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=unigeneに見出されるUnigene。

【 0 0 4 0 】

本分析によって、本発明者らは、29のうち26個がUnigeneにおける脳供給源に由来する発現配列タグ(EST)の存在量によって、ヒトの脳において濃縮されることが確認されたヒトホモログを有することを見出した。

【 0 0 4 1 】

遺伝子産物のうちの2つ、ミエリン塩基性タンパク質、およびニューロン特異エノラーゼは、以前に脳外傷マーカーとして試験され、かつ本リストから除外された。

30

【 0 0 4 2 】

リストにある24の残りの遺伝子産物のうち、ヒトホモログの20のみが、70 kDa未満の予測されたタンパク質配列鎖長を有する。

【 0 0 4 3 】

70 kDa未満の予測されたタンパク質配列鎖長を有するこれらの遺伝子産物は、脳外傷マーカー候補として指定された。血漿中に豊富なタンパク質であるアルブミンが、血液脳関門への損傷による外傷の後、脳に入ることが公知であることから(Cornford, E. M, et al., Adv Drug Deliv Rev(1999)5;36(2-3):145-163; Hampel, H, et al., Alzheimer Dis Assoc Disord(1997)11(2):78-87; Gingrich, M. B, et al., Trends Neurosci(2000)23(9):399-407)、70 kDaのカットオフが選択され、それは脳由来のタンパク質の出現について

40

の本カットオフ値もまた同様であることを示唆する。

【 0 0 4 4 】

したがって、本分析から、20の脳特異的候補が選択された。これらの候補遺伝子のヒトホモログは、マウス脳におけるそれらのmRNA発現の順に、それらの遺伝子識別子によって表1に示される。

【 0 0 4 5 】

(表1) 脳特異的マーカーとして同定されるヒト遺伝子

遺伝子記号	遺伝子産物名	Entrez Gene ID	Unigene クラスタ
VSNL1	visinin様1 (VLP-I)	7447	Hs.444212
SNAP25	シナプトソーム関連タンパク質、25kDa	6616	Hs.167317
GAD1	グルタミン酸脱炭酸酵素1(脳、67 kDa)	2571	Hs.420036
MOBP	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	4336	Hs.121333
SYT1	シナプトタグミンI	6857	Hs.310545
TUBB4	チューブリン、 β 4	10382	Hs.110837
FEZ1	線維束収縮および伸長タンパク質 ζ 1(zygin 1)	9638	Hs.224008
GLRB	グリシン受容体、 β	2743	Hs.32973
VMP	小胞膜タンパク質p24	140767	Hs.49230
OLFM1	olfactomedin 1	10439	Hs.522484
ZIC1	Zicファミリーメンバー1(奇数対ホモログ、ショウジョウバエ)	7545	Hs.41154
PACSN1	ニューロン1におけるタンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質	29993	Hs.520087
PLP1	プロテオリピドタンパク質1 (ペリツェウス-メルツパッヒャー病、痙性対麻痺2)	5354	Hs.1787
INA	インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、 α	9118	Hs.500916
SLC32A1	溶質担体ファミリー32(GABA小胞輸送体)、メンバー1	140679	Hs.179080
SERPINI1	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレードI(ニューロセルピン)、メンバー1	5274	Hs.478153
NNAT	Neuronatin	4826	Hs.504703
GABRG2	γ アミノ酪酸(GABA)A受容体、 γ 2	2566	Hs.7195
VAMP2	小胞関連膜タンパク質2(シナプトプレビン2)	6844	Hs.25348
NRGN	neurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)	4900	Hs.524116

10

20

30

【0046】

したがって前述の遺伝子のmRNA/タンパク質産物は、脳外傷の後、またはさらに一般的には脳損傷の指標として、脳脊髄液、血液、または尿に存在すると予測される。

【0047】

他の組織と比較した新鮮なマウス脳におけるmRNAの比較発現レベルのグラフ図は、表1に示される最終的な候補遺伝子について図1Aおよび1Bに示される。

【0048】

実施例2

抗体の調製

組み換えタンパク質(抗原)

マーカータンパク質をコードしているヌクレオチド配列は、大腸菌におけるタンパク質の生成のためにpGEXまたはpETベクターに挿入された。pETベクター由来のタンパク質は、製造者のプロトコールに従い、Qiagen Ni-NTAを用いて精製された(The Qiaexpressionist 06/2003; Qiagen, Valencia, CA)。pGEXベクター由来のそれらは、製造者のプロトコールに従い、Pierce(Rockford, IL)からの固定されたグルタチオンを用いて精製された。いくつかの場合において、プラスミドは、大腸菌からのタンパク質の大規模な生成のためにGenWay Biotech, Inc.(San Diego, CA)に送られた。これらには以下が含まれる: pET 100 GAD 67、pET 102 GAD 67、pET 28 Zygin、およびZygin I。品質管理は、適宜、SDS-PAGE、N末のエドマン・シーケンシング、および質量分析による分析を組み込んだ(Li, A., et

40

50

al., (2003) *Protein Expr Purif*, 31(2): 197-206)。タンパク質濃度は、タンパク質配列から算出された吸光係数に加えてSwiss-Protウェブサイトで見られるコンストラクトを用いて、280 nmの吸光度によって推定され、かつSDS-PAGE上のタンパク質染色バンドの目視検査と一致した。

【 0 0 4 9 】

動物免疫化および抗体性質決定

抗ペプチドの免疫原は、Li, A., et al., 2003(上記)に記載のように調製された。ウサギはScience, Inc.(Madison, WI)のHarland Bioproductsで免疫化された。ウサギ血清は、同族のペプチドまたはタンパク質抗原を含むアフィニティーカラム上で免疫精製された。マウスは、25 µg/マウス免疫原によって、MPL-TDMアジュバント(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)中で免疫化され、その後アジュバント中で少なくとも2回の追加免疫、および融合の3日前にPBS中で三回目が行われた。シリアンハムスターは、完全フロイントアジュバント中で100 µg/ハムスターにより免疫化され、その後不完全フロイントアジュバント中での追加免疫、およびPBS中での最終的な追加免疫が行われた。全ての融合は、Washington University School of Medicine Hybridoma Centerで実施された。モノクローナル抗体は、プロテインA-アガロースもしくはGoat-a-Mouse IgG-アガロース上の培養液から精製されるか、または腹水中でMaine Biotechnology(Portland, ME)によって生産された。全ての精製されたAbはPBS/アジドpH 7.2に対して透析され、かつタンパク質濃度は1.4(1/g-cm)の吸光係数を用いて280 nmの吸光度から推定された。モノクローナルAbに対するサブクラス決定は、Roche(Indianapolis, IN)からのIsoStripキットを利用した。最小限のエピトープ割当は、MIT Biopolymers Facility(Cambridge, MA)で調製されたABIMEDスポットペプチドアレイの免疫染色に基づいた。各スポットは10マーの隣接ペプチドを含み、かつ関心対象の抗原中の残基数に応じて、全抗原配列をカバーするために、1-、2-、または3-残基オフセットのいずれかが用いられた。例えば、1-残基オフセットに対して、スポット1は配列1~10、スポット2は配列2~11、スポット3は配列3~12を含むなどである。

【 0 0 5 0 】

Visinin-1(VLP-1)に対する抗体の開発

DNAおよびタンパク質注射を併用し、モノクローナル抗体が、VLP-1に対して産生された。ベクターVRI012(Vical Inc.)およびCTLA4Ig由来の特定の配列は、DNA注射に用いられた。VRI012はマウス骨格筋におけるタンパク質発現に対して最適化されたが、一方CTLA4Ig中に含まれる配列は、マウスにおいて抗体反応を非常に上昇させることが以前に示された(Boyle, et al., *Nature*(1998) 392:408-411)。

【 0 0 5 1 】

St. Louisのワシントン大学のハイブリドーマセンターで用いられる融合の作成および維持のための標準的手順は以下である。

【 0 0 5 2 】

(表2) マーカータンパク質の抗体

10

20

30

Ab 名称	種	アイソタイプ	免疫源	エピトープ	
R3471	ウサギ	IgG	VLP-1 DNA および	主要:aa 3-11, 16-23, 139-155	
4399 3A8.1	マウス	IgG1K	GST-VLP-1タンパク質	確立されていない	
4403 2B9.3	マウス	IgG2aK	追加免疫	確立されていない	
4421 2G10.2	マウス	IgG1K	ニューロセルピンDNA	aa 145-154	
4421 5B5.1	マウス	IgG1K	&GST-ニューロセルピン	aa 370-379	
4421 7D6.3	マウス	IgG2aK	タンパク質追加免疫	確立されていない	10
4505 2F1.1	マウス	IgG1K	" "	aa 193-202	
4554 1G4.4	マウス	IgG1K	pET28-Zygin	aa 23-28	
4563 4G3.1	ハムスター	IgG1	pET28-Zygin	aa 7-12	
R4726	ウサギ	IgG	pET28-Zygin	決定されていない	
R4727	ウサギ	IgG	pET28-Zygin	決定されていない	
R4610	ウサギ	IgG	GAD 67	多重エピトープ	
R4609	ウサギ	IgG	GAD 67	多重エピトープ	20
R4043	ウサギ	IgG	GAD 67 ペプチド(61-79)	仮定 aa 61-79	
R4044	ウサギ	IgG	GAD 67 ペプチド(79-97)	仮定 aa 79-97	
Chemicon MAB 5406 (購入)	マウス	IgG2aK	r-rat GAD 67	aa 13-25	
SC-7571	ヤギ	IgG	インターネキシン	N-末端	
SC-7570	ヤギ	IgG	インターネキシン	C-末端	
SC-7538	ヤギ	IgG	シナプトソーム 関連タンパク質-25kDa	N-末端	30
SC-7539	ヤギ	IgG	シナプトソーム 関連タンパク質-25kDa	C-末端	
SC-20038	マウス	IgG1K	粗製脳抽出液	決定されていない	
SC-23570	ヤギ	IgG	プロテオリピドタンパク質1	N-末端	
SC-18529	ヤギ	IgG	プロテオリピドタンパク質1	内部ペプチド	
SC-14250	ヤギ	IgG	ミエリン関連 オリゴデンドロサイト	内部ペプチド	
SC-25666	ウサギ	IgG	塩基性タンパク質	公知ではない	

SC - Santa Cruzから商業的に得られた抗体

マウスおよびハムスター抗体はモノクローナルであり、一方ウサギ抗体はポリクローナルであり免疫精製されている。

GAD67 = グルタミン酸デカルボキシラーゼ1(脳、67 kD)

インターネキシン = インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、

【 0 0 5 3 】

実施例3

脳外傷を同定するための候補遺伝子によって発現するタンパク質の評価

候補遺伝子によって発現されるいくつかのタンパク質は、ヒト脳におけるそれらの存在についてウエスタンブロットによって試験された。正常なヒト脳ホモジェネート(GenoTechnology, Inc., St. Louis, MO)は、75 µgでロードされ、4~20%のSDS-PAGE上で電気泳

動され、かつPVDFに電気転写された。分子量標準もまた、評価される脳タンパク質の予想される領域を確立するためにランされた。全ての一次Abの濃度は2 µg/mlで2時間、アルカリ性ホスファターゼに結合する二次抗体は1/1000で1時間、基質現像時間を変化させることを伴う。図2は、VSNLI、FEZI、SERPINII、およびGADIに対する遺伝子によってコードされるタンパク質の存在を明らかに示す複合ウエスタンブロットを示す。ウエスタンブロットに用いた一次抗体が言及される。図3は、INA、SNAP-25、およびMOBPに対する遺伝子によってコードされるタンパク質の存在について複合ウエスタンブロットを示す。PLPIによってコードされるもの以外の全てのコードされたタンパク質が、脳組織に明らかに存在した。

【0054】

10

実施例4

他の組織と比較して脳における候補バイオマーカーの増大した存在量

いくつかの候補遺伝子によって発現されるタンパク質の存在は、様々な組織において評価された。ウエスタンブロットは、ヒト組織アレイ(GenoTechnology, Inc. 50 µg/組織)上で実施された。ヒト組織アレイは、肝臓、脳、肺、腎臓、脾臓、精巣、卵巣、心臓、膵臓、子宮、乳房、子宮頸部、直腸、前立腺、甲状腺、喉頭咽頭、胃、および皮膚を含めた。ヒトVLP-1については、脳において高いタンパク質発現があり、子宮頸部においてははるかに少なく、かつ皮膚においてはいくらかある。他の組織におけるタンパク質発現の欠如は、mRNA発現データと一致している。ニューロセルピンについて、いくつかのタンパク質は、前立腺、および甲状腺中に見出されたが、脳よりはるかに少なく、腎臓および膵臓中には微量であった。SNAP-25によってコードされるタンパク質遺伝子産物は、脳中に豊富であり、いくつかの他の組織中には極微量のみが見出された。MOBPによってコードされるタンパク質について同様である。非常に微量のみが膵臓中に見出された。ZyginおよびGAD67タンパク質発現は、脳組織においてのみ生じ、試験される他の組織のいずれにおいても生じない。

20

【0055】

実施例5

発作患者におけるVisinin様Iの決定

血液は、2002年3月から11月の間に、Barnes-Jewish Hospital (BJH)に急性神経学的欠損を示した一群の患者から入手可能であった臨床検査室標本から遡及的に収集された。これらの患者は、虚血性発作の退院診断(discharge diagnosis)を有した。発作発生の明確な時間を有さなかった患者は、除外された。18人の患者がこれらの基準を満たし、試験された。

30

【0056】

血液試料由来の血漿は、visinin様1(VLP-1)のレベルを決定するために以下の手順に供された。Meso Scale Discovery (MSD)装置上の電気化学発光が用いられた。手順は以下の通りである：

1日目

1. MSD標準結合プレートに5 µl/ウェルの60 µg/mlのモノクローナル抗体3 A8.1でコーティングする。ふたをせずプレートを放置し、試料を一晩室温で乾燥させる。

40

【0057】

2日目

2. 200 µlのTBS-カゼイン(0.1% Tween 20)を添加し、振盪させながら室温で2時間プレートをインキュベートする。

3. 300 µlのTBS(0.1% Tween 20)緩衝液でプレートを二回洗浄する。緩衝液を吸引またはデカントする。

4. プールされた正常ヘパリン化血漿または血清中でVLP-1標準を希釈する。

5. 標準、QC、および試料を下記のように調整した：

- 110 µl血漿/血清

- 44 µl HBR試薬(2 mg/ml)

50

- 66 μ l TBS-カゼイン(0.1% Tween 20)

よく混合し、かつ各ウェルに100 μ lの標準、QC、および試料を添加する。振盪させながら4 で一晩インキュベートする。

【 0 0 5 8 】

3日目

6. 300 μ lのTBS(0.1 % Tween 20)緩衝液でプレートを三回洗浄する。

7. TBS-カゼイン(0.1% Tween 20)中に、4.5 μ g/mlのルテニウム標識ウサギ抗VLP-1(R347 1)(20:1の比で標識された)を100 μ l添加する。振盪させながら室温で2時間インキュベートする。

8. 300 μ lのTBS(0.1 % Tween 20)緩衝液でプレートを三回洗浄する。

10

9. 150 μ lの1xリード緩衝液T(Read Buffer T)を添加する。

10. MSDからSector Imager計測器でプレートを読む。

【 0 0 5 9 】

上記のコーティングの濃度および検出抗体が、試験される全ての濃度の中で最も高い感度を与えることが見出された。

【 0 0 6 0 】

13.7および10,000 pg/mlの間の標準は、内標準法(spiking)組換えVLP-1によって正常血漿のプールに調製された。図4Aおよび4Bは、4-パラメータカーブフィッティングソフトウェアを介して生成される典型的な標準曲線を示す。図4Aは、12,500 pg/mlまでの範囲を示す；パネルBは、0~1,250 pg/mlの領域における標準曲線の拡張された描写を示す。「RLU」は相対的な光単位を指す。アッセイ法の感度(最も低い測定可能な量)は、アッセイブランク+3標準偏差に基づき41.1 pg/mlと推定された。

20

【 0 0 6 1 】

正常なドナー由来の39の血漿試料が分析され、それらのうち36は検出限界未満であった。その他は、42.3、83.6、および104.6 pg/mlの低い値を有した。18人の慢性発作患者のうち、2人だけは、非常に高い、検出可能なVLP-1を伴う試料を有さなかった。図5A~5Eは、18人の患者について発作発生後の様々な時間での結果をpg/mlで示す。

【 0 0 6 2 】

実施例6

ラット発作モデル

30

ラット発作モデルは、血液および脳脊髄液におけるvisinin様1の出現の時間経過を時間の関数として評価するために使用された。

【 0 0 6 3 】

発作の永久中大脳動脈閉塞(pMCAO)フィラメントモデルが、用いられた。虚血は、永久中大脳動脈閉塞(pMCAO)腔内フィラメント法を用いて、大腿静脈にカニューレを挿入されたオスSprague-Dawley ラット(Charles-River)において誘導された。簡潔には、正中切開術が実施され、かつ内部および外側の右総頸動脈が露出された。外側の頸動脈および後頭動脈は連結された。総頸動脈は連結され、かつ内頸動脈は一時的に閉じられた。小切開は総頸動脈中に作製され、かつフィラメント(3.0のEthilon；熱平滑末端化先端)は総頸動脈を介して内頸動脈に挿入された。フィラメントは、MCAの起源を閉塞するために17.5 mm前進した。フィラメントは、外科的ナイロン縫合を用いて、右総頸動脈中の適所に固定された。手術の後、麻酔(イソフルラン)は中止され、かつ動物は回復させられた。

40

【 0 0 6 4 】

血液は、5つの時点(手術の24時間前、ならびに閉塞後1、4、8、および24時間)で収集された(およそ0.25 ml)。血液は、室温で凝固させられ、かつ血清試料を収集するために、その後遠心分離された。CSFは閉塞後24時間で収集された。全ての試料は、アッセイの前に以下のプロトコールに従ってコードされた。

【 0 0 6 5 】

1. 標準を希釈する。

2. mAb 3 A8.1でコーティングされたプレートを300 μ lのTBS-T緩衝液/ウェルで三回洗浄

50

する。三回目の洗浄の後、過剰な緩衝液を吸引する。

3. 100 μ l(CSFアッセイ)または150 μ l(血清アッセイ)の標準、QC、および試料をウェルに添加する。プレートをプレートシーラーで覆い、かつ短時間振盪する。室温で2時間振盪しながら(CSFアッセイ)、または4 で一晩振盪しながら(血清アッセイ)インキュベートする。CSFアッセイの試料は希釈せずにランされるが、一方血清アッセイの試料はアッセイ緩衝液中で1:3に希釈されてランされる。

4. ブロッキング緩衝液中で、0.1 μ g/mlのビオチン-2B9.3(CSFアッセイ)または0.5 μ g/mlのビオチン-ウサギ抗VLP-1(血清アッセイ)を調製する。

5. 液体をプレートからデカントし、過剰な液体を排出する。全ての液体がウェルから出たことを確認する。

6. 300 μ lのTBS-T緩衝液/ウェルでプレートを四回洗浄する。四回目の洗浄の後、過剰な緩衝液を吸引する。

7. 0.1 μ g/mlのビオチン-2B9.3抗VLP-1 100 μ l(CSFアッセイ)または0.5 μ g/mlのビオチン-ウサギ抗VLP-1(血清アッセイ)を、各ウェルに直ちに添加する。37 で2時間インキュベートする。

8. 0.5 μ g/mlのストレプトアビジン-Alk-Phosを、ブロッキング緩衝液によりグリセリン中の0.5 mg/mlのストックを1:1000に希釈することによって調製する。

9. 液体をプレートからデカントし、過剰な液体を排出する。全ての液体がウェルから出たことを確認する。

10. 300 μ lのTBS-T緩衝液/ウェルでプレートを四回洗浄する。四回目の洗浄の後、過剰な緩衝液を吸引する。

11. 0.5 μ g/mlのストレプトアビジン-Alk-Phos100 μ lを各ウェルに添加する。37 で1.5時間インキュベートする。液体をプレートからデカントし、過剰な液体を排出する。全ての液体がウェルから出たことを確認する。

12. 300 μ lのTBS-T緩衝液/ウェルでプレートを四回洗浄する。四回目の洗浄の後、過剰な緩衝液を吸引する。

13. 100 μ lのCDP-Star基質を各ウェルに直ちに添加する。

14. 460/40 nmで5~10分間プレートを読み取る。

【0066】

ラットモデルにおける本アッセイによる血清中のvisininの時間経過は、図6に示される。発作を誘導する前は、値は検出不能であった。示すように、VLP-1は、閉塞後1時間で検出可能であり、かつ24時間維持された。脳脊髄液における同様のアッセイ法は、24時間後に $>20,000$ pg/mlの5-ラット試料における平均値を示した。

【0067】

実施例7

さらなるアッセイ法の開発

定量的アッセイ法は、ニューロセルピン、GAD67、およびzyginに対しても開発された。

【0068】

ニューロセルピンについてのアッセイ法は、(3 μ g/mlでコーティングされた)捕捉抗体4221 5B5.1および2 μ g/mlのビオチン化45052F1.1を利用した。検出は、ストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼを介してあった(図7Aを参照されたい)。セルピンは、虚血性発作のラットモデル由来の6つのCSF試料のうち5つにおいて検出された。値は、セルピンの7~20単位の範囲であった。

【0069】

GAD67についての定量的アッセイ法は、電気化学発光(MESO Scale Discovery)を利用して開発された。アッセイ法は、捕捉抗体として免疫精製ウサギ抗-GAD67(R4043)、およびキャッピング抗体としてルテニウム標識免疫精製ウサギ抗-GAD67(R4610)を利用した。標準曲線は、1 ng/mlのGAD67濃度で約1,000単位のシグナル値、および100 ng/mlで約14,000のシグナル単位までの非線形進行を与える(図7Bを参照されたい)。

【0070】

10

20

30

40

50

zyginについての定量的アッセイ法は、電気化学発光(MESO Scale Discovery)を利用して開発された。アッセイ法は、捕捉抗体(MSDプレート上にコーティングされた300 ng)としてモノクローナル抗体1G4.4、および検出抗体としてルテニウム標識モノクローナル抗体4G3.1を用いる。標準曲線(図7C)は、1 ng/mlでの1,000MSD単位と3 ng/mlでの約3,500MSD単位の間の一一般的な直線関係を提供する。

【0071】

実施例8

死亡後CSF試料

ヒトCSF死亡後試料(Analytical Biological Services, Wilmington, DE)は、いくつかの脳マーカーが何時間も酸素が欠乏した脳由来のCSF中に見出されるかを判定するために分析された。

10

【0072】

ウエスタンブロットはヒト死亡後髄液において様々な希釈で実施され、かつバンドの強度は視覚的に各タンパク質の標準と比較された。zygin、ニューロセルピン、およびGAD67についての値は2.5 ng/mlより低く、かつvisininは25および250 ng/mlの間であった。この範囲は、visininについて17.1 ng/mlの定量的アッセイ測定(Teragenixから得られる4つの死亡前CSF試料は、0.11 ng/ml ~ 0.31 ng/mlの範囲のみの値を有した)と妥当に一致した。定量的システムはまた、死亡後髄液において300 pg/mlでGAD67、および56 pg/mlでzyginを検出した。

20

【0073】

結果の概要

表3はマーカータンパク質が確実に決定された上記の結果の概要を示す。

【0074】

(表3)いくつかの脳特異的遺伝子のタンパク質発現*

遺伝子	ヒト脳のウエスタンブロット	他のヒト組織	虚血性発作後ヒト血液において見出される	死亡後ヒトCSF	ラット発作モデルCSF
VSNL1	+	子宮頸部、皮膚	はい	はい	はい
FEZ1	+	なし		はい	
SERPINI1	+	前立腺、甲状腺、ならびに腎臓および膵臓に微量			はい
GAD1	+	なし		はい	
INA	+				
SNAP25	+	いくつかの他の組織に微量			
MOBP	+	膵臓に微量			
PLP1	Neg				

30

* 埋められていない欄は実施していない。

40

【0075】

脳特異的遺伝子によって発現されるタンパク質は、脳において有意な量で、および他の組織においては、あったとしてもわずかだけが見出された。試験されるタンパク質はまた、ヒトにおいて発作後血液中に、または発作のラットモデルにおいて血液および/またはCSF中に見出された。したがって、脳特異的遺伝子のタンパク質産物は、遺伝子のmRNA発現と同様の知見を与える。

【図面の簡単な説明】

【0076】

【図1】図1Aおよび1Bは、脳および他の組織における20の脳損傷マーカーのmRNAレベルの比較を示す。

50

【図2】遺伝子VSNLI、FEZ1、SERPINI1、およびGADIのタンパク質発現産物の存在を示す脳組織ホモジェネートのウエスタンブロットの結果を示す。

【図3】遺伝子INA、SNAP25、およびMOBPのタンパク質発現産物の存在を示すウエスタンブロットを示す。PLP-1は、本方法によって検出可能なタンパク質発現を示さなかった。

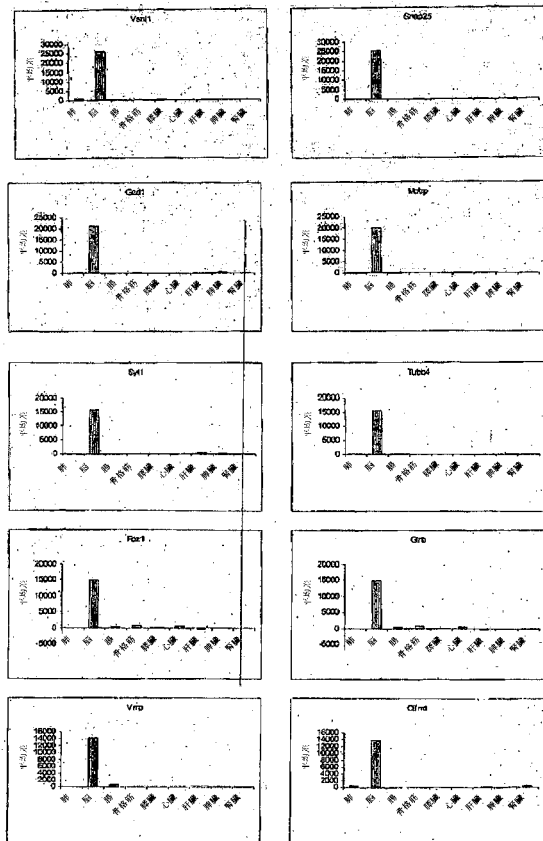
【図4】図4Aおよび4Bは、VLP-1サンドイッチアッセイについての標準曲線を示す。

【図5】図5A~5Eは、虚血性発作に罹患していると診断された患者から採取される血液試料の血漿におけるVLP-1タンパク質の測定結果を示す。

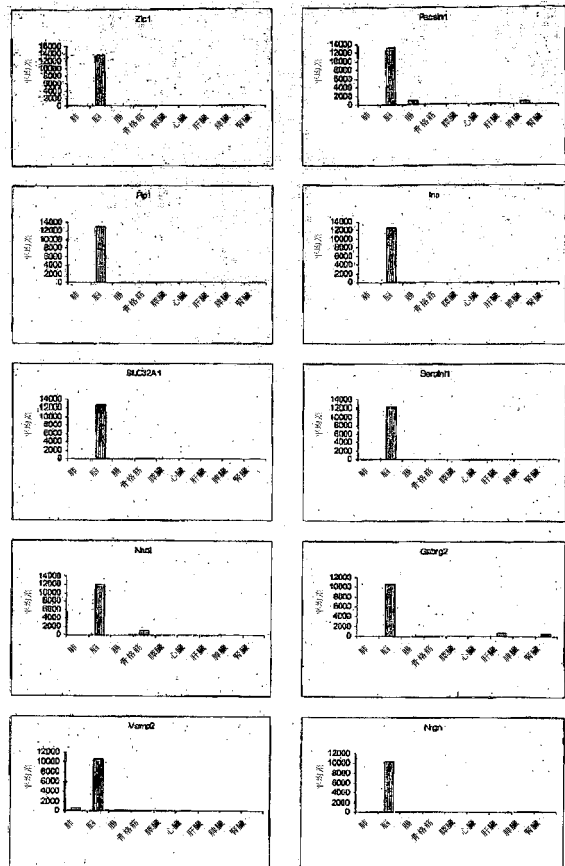
【図6】VLP-1についてアッセイされたラット発作モデルにおける、ラット血清のアッセイ結果を示す。

【図7】図7A~7Cは、それぞれニューロセルピン、GAD67、およびzyginについて開発されたサンドイッチアッセイについての標準曲線を示す。

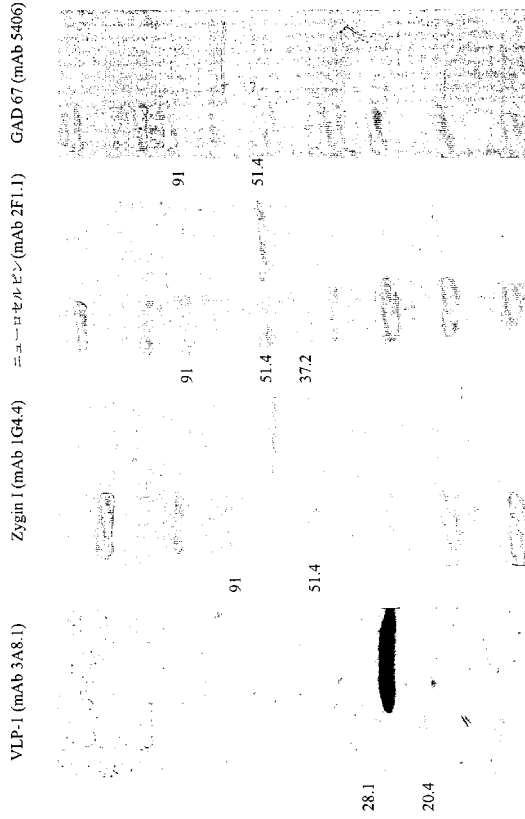
【図1A】



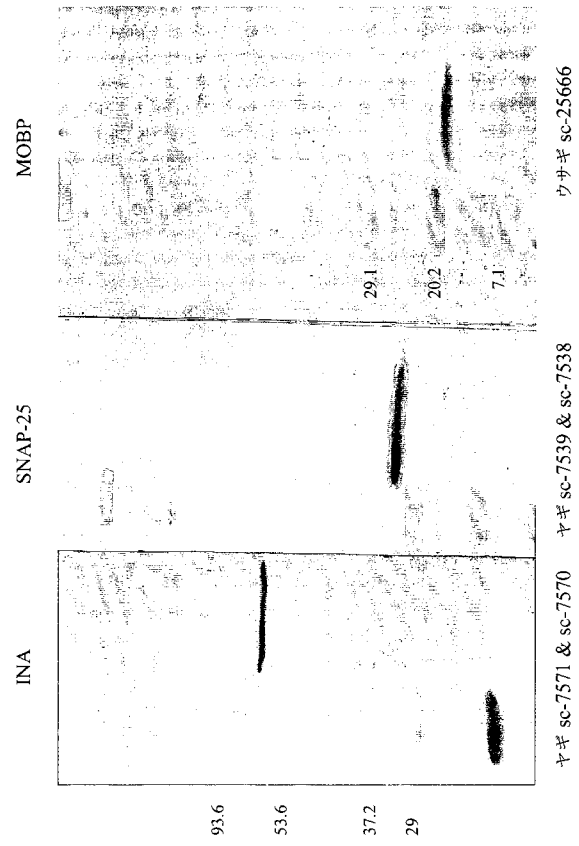
【図1B】



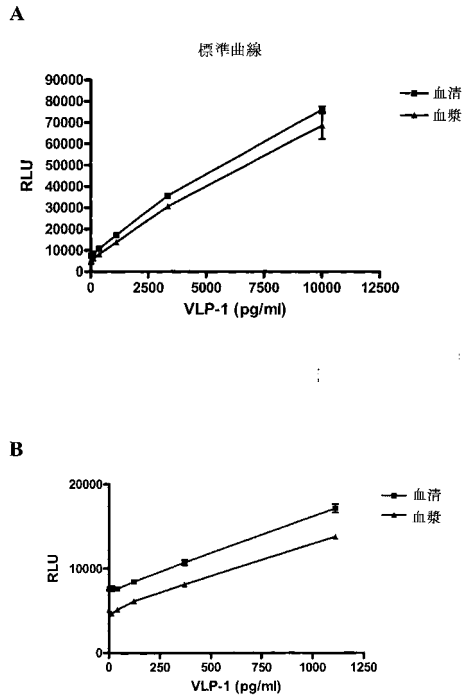
【 図 2 】



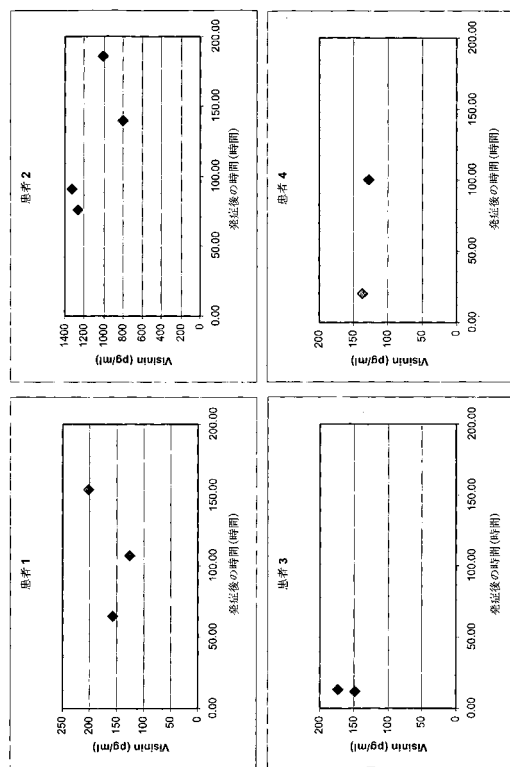
【 図 3 】



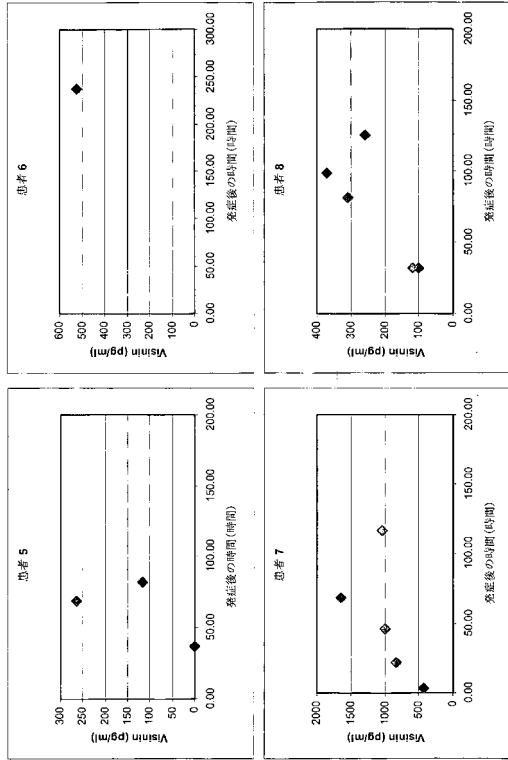
【 図 4 】



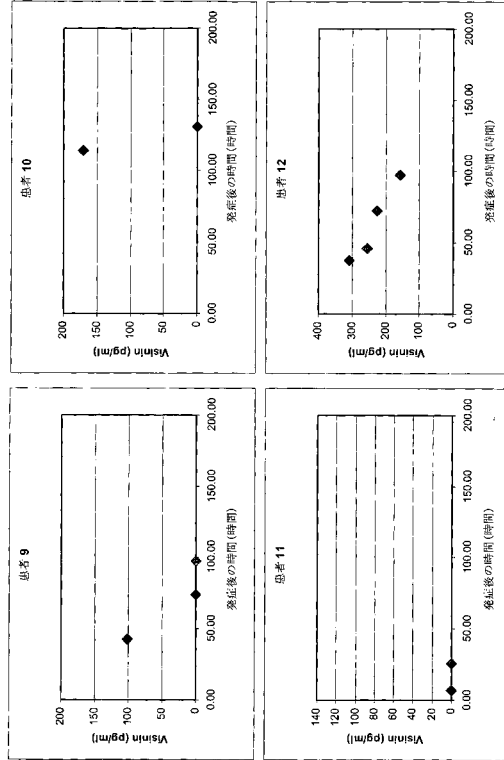
【 図 5 A 】



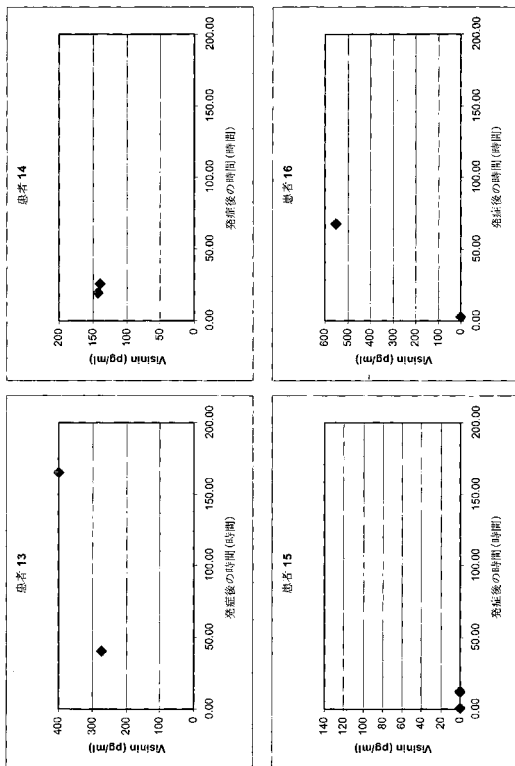
【 5 B 】



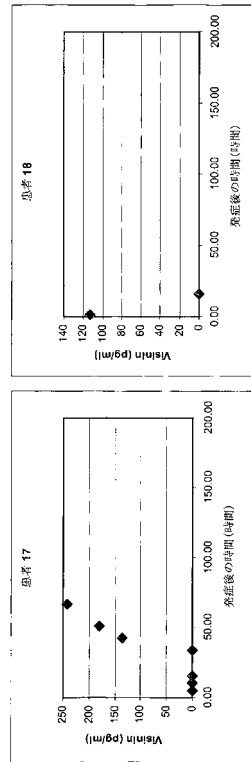
【 5 C 】



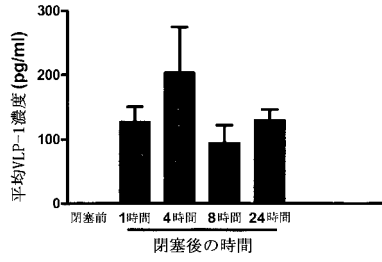
【 5 D 】



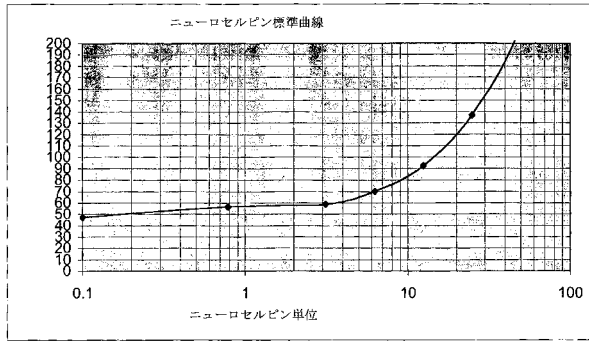
【 5 E 】



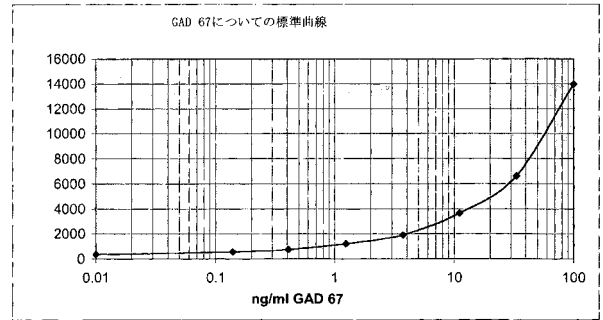
【図6】



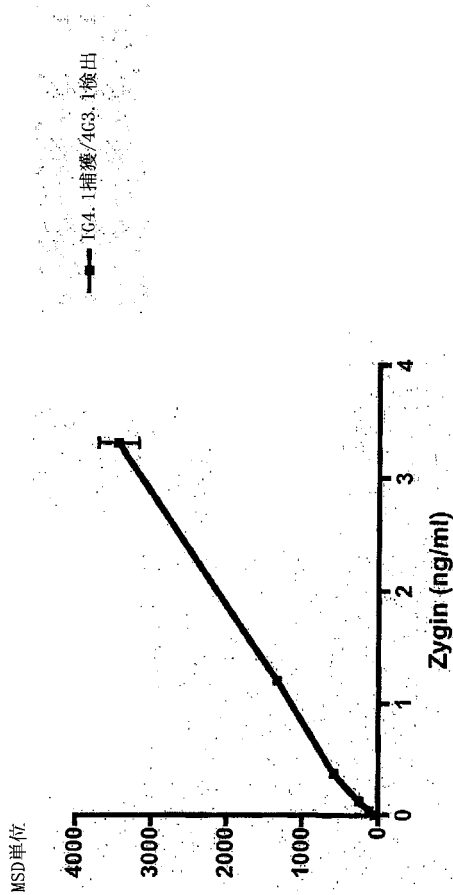
【図7A】



【図7B】



【図7C】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		M
G 0 1 N 33/577 (2006.01)		G 0 1 N 33/53		D
		G 0 1 N 33/577		B

(72)発明者 ランドト イボンヌ
 アメリカ合衆国 ミズーリ州 セントルイス マックファーソン アベニュー 4 9 4 4

(72)発明者 モデュール ビジェイ
 アメリカ合衆国 ペンシルバニア州 ノリスタウン クリーベル ミル ロード 1 0 7 0

(72)発明者 ラテルザ オマール
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 ジャージー シティ ハーバー サイド プレイス 1
 アパートメント 3 4 6

審査官 引地 進

(56)参考文献 週刊医学のあゆみ, 2 0 0 4年 1月17日, Vol.208 No.3, p.133-137
 Life Sci , 2 0 0 3年, Vol.73 No.8 Page.1007-1016
 Biochem Biophys Res Commun , 2 0 0 1年, Vol.284 No.2, p.310-316
 Clin. Chem., vol. 49, pages 1733-1739 (2003)
 Clin. Chem., vol. 52, pages 1713-1721 (2006)
 Clin. Chem., vol. 54, pages 1617-1623 (2008)
 Biomed. Pap., vol. 155, pages 263-268 (2011)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
 C12N 15/00-15/90
 CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

專利名称(译)	脳损伤の标记		
公开(公告)号	JP5190261B2	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	JP2007518337	申请日	2005-06-27
[标]申请(专利权)人(译)	华盛顿大学 医药华盛顿UNIV学校		
申请(专利权)人(译)	华盛顿大学		
当前申请(专利权)人(译)	华盛顿大学		
[标]发明人	ラーデンソンジャック ランドトイボンヌ モジュールビジエイ ラテルザオマール		
发明人	ラーデンソン ジャック ランドト イボンヌ モジュール ビジエイ ラテルザ オマール		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12Q1/02 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N2800/2821		
FI分类号	C12N15/00.A C12Q1/68.A C12Q1/02 C07K14/435 C07K16/18 G01N33/53.M G01N33/53.D G01N33/577.B		
代理人(译)	清水初衷		
审查员(译)	进Hikichi		
优先权	60/582998 2004-06-25 US		
其他公开文献	JP2008504032A5 JP2008504032A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了使用新鲜脑组织鉴定脑损伤标志物的方法和用于检测这些标志物的方法和组合物。

遺伝子記号	遺伝子産物名	Entrez Gene ID	Unigene クラスター
VSNL1	visinin様1 (VLP-1)	7447	Hs.444212
SNAP25	シナプトソーム関連タンパク質、25kDa	6616	Hs.167317
GAD1	グルタミン酸脱炭酸酵素1(脳、67 kDa)	2571	Hs.420036
MOBP	ミエリン関連オリゴデンドロサイト塩基性タンパク質	4336	Hs.121333
SYT1	シナプトタグミン1	6857	Hs.310545
TUBB4	チューブリン、β4	10382	Hs.110837
FEZ1	線維束収縮および伸長タンパク質ζ1(zygin 1)	9638	Hs.224008
GLRB	グリシン受容体、β	2743	Hs.32973
VMP	小脳膜タンパク質p24	140767	Hs.49230
OLFM1	olfactomedin 1	10439	Hs.522484
ZIC1	Zicファミリーメンバー1(奇数対ホモログ、ショウジョウバエ)	7545	Hs.41154
PACSIN1	ニューロンIIにおけるタンパク質キナーゼCおよびカゼインキナーゼ基質	29993	Hs.520087
PLP1	プロテオリビドタンパク質1(パリツエーワズメルトバツヒャー病、痲痺対痲痺2)	5354	Hs.1787
INA	インターネキシンニューロン中間線維タンパク質、α	9118	Hs.500916
SLC32A1	溶質担体ファミリー-32(GABA小胞輸送体)、メンバー1	140679	Hs.179080
SERPINI1	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼインヒビター、クレードI(ニューロセルペン)、メンバー1	5274	Hs.478153
NNAT	Neurostatin	4826	Hs.504703
GABRG2	γアミノ酪酸(GABA)A受容体、γ2	2566	Hs.7195
VAMP2	小胞関連膜タンパク質2(シナプトブレビン2)	6844	Hs.25348
NRGN	neurogranin(タンパク質キナーゼC基質、RC3)	4900	Hs.524116