

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-531784

(P2013-531784A)

(43) 公表日 平成25年8月8日(2013.8.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68 Z N A	2 G O 4 1
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	2 G O 4 5
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	4 B O 2 9
GO 1 N 27/62 (2006.01)	GO 1 N 27/62 V	4 H O 4 5
C 1 2 M 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 113 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-510677 (P2013-510677)
 (86) (22) 出願日 平成23年5月23日 (2011.5.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年1月17日 (2013.1.17)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/000784
 (87) 国際公開番号 W02011/144914
 (87) 国際公開日 平成23年11月24日 (2011.11.24)
 (31) 優先権主張番号 1008541.3
 (32) 優先日 平成22年5月21日 (2010.5.21)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 512300964
 ユニヴァシテ デ ジュネーブ
 UNIVERSITE DE GENEVE
 E
 スイス国 シーエイチー 1 2 1 1 ジュネーブ
 プ 4 ルードウジェネラルデュフル 2
 4

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 診断方法

(57) 【要約】

本発明は、対象における急性脳損傷の診断を補助するための方法であって、(i) 前記対象由来の試料における、PRDX 1、PRDX 6、及びGSTP 1 からの群から選択される少なくとも1つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、(ii) パネルAから選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、(iii) (i) 及び(ii) の濃度を標準試料におけるポリペプチドの濃度と比較し、前記ポリペプチドについての量比を決定するステップとを含み、(iv) 前記試料においてアッセイしたそれぞれのポリペプチドの前記標準試料中のポリペプチドに対する量比の結果が1.3を超えると、急性脳損傷が前記対象において生じている可能性の増加を示す方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における急性脳損傷の診断を補助するための方法であって、

(i) 前記対象由来の試料における、 P R D X 1、 P R D X 6、及び G S T P 1 からなる群から選択される少なくとも 1 つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、

(ii) パネル A から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、

(iii) (i) 及び (ii) の濃度を標準試料におけるポリペプチドの濃度と比較し、前記ポリペプチドについての量比を決定するステップとを含み、

(iv) 前記試料においてアッセイしたそれぞれのポリペプチドの前記標準試料中のポリペプチドに対する量比の結果が 1 . 3 を超えると、急性脳損傷が前記対象において生じている可能性の増加を示す、方法。

10

【請求項 2】

ステップ (ii) が、パネル B から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ステップ (ii) が、パネル C から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ (ii) が、パネル 1 から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

ステップ (ii) が、パネル 1 H から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ (ii) が、パネル 1 C から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

ステップ (ii) が、パネル 1 A から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

ステップ (ii) が、パネル 1 B から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (ii) が、パネル 2 から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

ステップ (ii) が、パネル 2 A から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 11】

ステップ (ii) が、パネル 2 B から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ (i) が、 P R D X 1、 P R D X 6、及び G S T P 1 からなる群から選択される少なくとも 2 つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

ステップ (i) が、酸化ストレスポリペプチド P R D X 1、 P R D X 6、及び G S T P 1 のそれぞれの濃度をアッセイすることを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれかに記載の方法

50

。

【請求項 14】

ステップ(ii)が、前記パネルから選択される少なくとも2つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項1～11のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

ステップ(ii)が、前記パネルから選択される少なくとも4つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む、請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

急性脳損傷が、脳卒中である、請求項1～15のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

試料が、脳微小透析液、脳脊髄液、又は血液である、請求項1～16のいずれかに記載の方法。

【請求項 18】

試料が、血液である、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

ステップ(i)が、対象由来の試料におけるPRDX1の濃度をアッセイすることを含む、請求項1～18のいずれかに記載の方法。

【請求項 20】

タンパク質が、ウエスタンブロッティングによって検出される、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

【請求項 21】

タンパク質が、ビーズサスペンションアレイ又は平面アレイによって検出される、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

【請求項 22】

タンパク質が、アイソパリックタンパク質タギング又は同位体タンパク質タギングによって検出される、請求項1～19のいずれかに記載の方法。

【請求項 23】

タンパク質が、質量分析計ベースのアッセイによって検出される、請求項1～19又は請求項22のいずれかに記載の方法。

【請求項 24】

第1及び第2のポリペプチド又はその断片、バリエント、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質の、急性脳損傷に関連する診断応用又は予後判断応用のための使用であって、前記第1のポリペプチドが、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1から選択され、前記第2のポリペプチドが、パネルAから選択される、使用。

【請求項 25】

ポリペプチド又はその断片、バリエント、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質の、脳卒中に関連する診断応用又は予後判断応用のための使用であって、前記ポリペプチドが、パネル2から選択される、使用。

【請求項 26】

各々1つ又は2つ以上のポリペプチド又はその断片、バリエント、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有するそれぞれの物質の組み合わせの、請求項24又は25に記載の使用。

【請求項 27】

物質又はそれぞれの物質が、抗体又は抗体チップである、請求項24～26のいずれかに記載の使用。

【請求項 28】

物質が、1つ又は2つ以上のポリペプチド又はその断片、バリエント、若しくはミュータントに対して特異性を有する抗体である、請求項22に記載の使用。

【請求項 29】

10

20

30

40

50

急性脳損傷の診断において使用するためのアッセイデバイスであって、第1及び第2のポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質を含有する位置を有する固体基質を含み、前記第1のポリペプチドが、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1から選択され、前記第2のポリペプチドが、パネルAから選択される、アッセイデバイス。

【請求項30】

脳卒中の診断において使用するためのアッセイデバイスであって、ポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質を含有する位置を有する固体基質を含み、前記ポリペプチドが、パネル2から選択される、アッセイデバイス。

10

【請求項31】

物質が、抗体又は抗体チップである、請求項29又は30に記載のアッセイデバイス。

【請求項32】

それぞれの抗体について固有のアドレス指定可能な位置を有し、それによって、それぞれの個々のポリペプチド又はポリペプチドの任意の組み合わせについてアッセイの読み取りを可能にする、請求項31に記載のアッセイデバイス。

【請求項33】

脳卒中の診断において使用するためのキットであって、請求項29～32のいずれかに記載のアッセイデバイス、及び対象から採取される体液の試料における1又は2以上のポリペプチドの量を検出するための手段を含む、キット。

20

【請求項34】

対象における急性脳損傷の診断又は予後モニタリングの方法であって、
 (a) 個体由来の適切な組織試料からタンパク質を得、抽出するステップと、
 (b) 前記タンパク質を消化してペプチドの集団を産生するステップと、
 (c) 表15において列挙される1又は2以上のトランジションの選択反応モニタリングを使用して、表14において列挙される1又は2以上の前記ペプチドの存在量を決定するステップと、
 (d) 前記1又は2以上のペプチドの存在量を、急性脳損傷の診断に関連する、あらかじめ決定されたペプチドの存在量と比較するステップと、
 (e) 前記1又は2以上のペプチドの存在量の差異に基づいて、前記対象が急性脳損傷を患っているかどうか及び/又は急性脳損傷が悪化している若しくは改善していることを決定するステップと
 を含む、方法。

30

【請求項35】

あらかじめ決定されたペプチドの存在量が、表14から選択される対応する合成ペプチドの既知の量を使用して決定される、請求項34に記載の方法。

【請求項36】

表14において列挙される群から選択される1又は2以上の合成ペプチドを含む、急性脳損傷の診断又は急性脳損傷を有する対象の予後モニタリングを行うための調製物。

【請求項37】

1又は2以上の合成ペプチドが、

GSTP1 TFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPILLSAYVGR
 MPPYTVVYFPVR
 DDYVK
 DQQEAALVDMVNDGVEDLR
 FQDGDLTLYQSNTILR
 ASCLYGQLPK
 AFLASPEYVNLPIINGNGK
 MLLADQGGQSWK
 LSARPK

40

50

WDAWNEK
 MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEK
 MPAFAEFEK

CSRP1 GFGFGQGAGALVHSE
 GLESTTLADK
 GYGYGQGAGTLSTDK

MT3 GGEAAEAEAEK
 MDPETPCPSGGSCCADSCK
 SCCSCCPAECEK

10

PEPB1 GNDISSGTVLSDYVGSPPK
 LYEQLSGK
 LYTLVLTDPDAPSR
 NRPTSISWDGLDSGK
 VLTPTQVK
 YVWLVEQDRPLK

から選択される、請求項 36 に記載の調製物。

【請求項 38】

20

それぞれのペプチドが、水素、炭素、酸素、窒素、及び硫黄から選択される 1 又は 2 以上の安定した重同位体を含む、請求項 36 又は 37 に記載の調製物。

【請求項 39】

合成ペプチドが、同位体タグ又はアイソバリックタグにより標識される、請求項 36 又は 37 に記載の調製物。

【請求項 40】

急性脳損傷の診断又は予後モニタリングのための、請求項 36 ~ 39 のいずれかに記載の調製物。

【請求項 41】

急性脳損傷が、虚血性脳卒中又は一過性脳虚血発作である、請求項 40 に記載の調製物。

30

【請求項 42】

実質的に本明細書において記載される方法、使用、デバイス、又はキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、急性脳外傷の診断の補助に関する。特に、本発明は、脳卒中の診断の補助に関する。新規なバイオマーカー及びバイオマーカーのパネルが本発明の方法において記載される。

【背景技術】

40

【0002】

脳卒中は、工業先進国における、死亡及び身体障害の主要な原因である。急性脳卒中の迅速な診断は、それが疑われている患者に優先順位を付け、確認した患者を専門の脳卒中ユニット (stroke unit) に移送するのに不可欠である。

【0003】

非脳血管性状態が、脳卒中を模倣する臨床像を示し得ることはよく知られており、真の脳卒中からのそのような「模倣物」の初期の正確な区別は、患者を適切なケアに導くのに不可欠である。現時点で、急性脳虚血のための単純で広く利用可能な診断試験がないことは、脳卒中の診断 (多くは臨床的な根拠及び神経画像処理技術に基づく) 並びに管理において、課題となっている。さらに、脳卒中患者の予後判断は、治療及び経過観察を合理的

50

に説明するのに適切である。

【 0 0 0 4 】

そのため、脳卒中の診断並びに / 又はその疾患のほぼ確実な経過及び結果の予測のためのマーカーの必要性は、医療の労働力にとって主な課題となっている (Foerch, C., Montaner, J., Furie, K. L., Ning, M. M., and Lo, E. H. (2009) Invited Article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 73, 393-399)。

【 0 0 0 5 】

ヒト大脳の微小透析は、脳における細胞外液 (ECF, extracellular fluid) の組成の変化をモニターするためのインビボ試料採取技術である。基本的に、可動性のマイクロプローブが、患者の脳の中に挿入され、脳脊髄液 (CSF, cerebrospinal fluid) の組成に非常に近い組成を有する溶液が、灌流される (Poca, M. A., Sahuquillo, J., Vilalta, A., De los Rios, J., Robles, A., and Exposito, L. (2006) Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: Description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 23, 1510-1517)。プローブは、有窓毛細血管の機能をまねる。プローブ先端に位置する半透性膜を通過することができる内因性物質は、間質液から微小透析溶液に拡散する。

【 0 0 0 6 】

過去数年間に、基質 (例えばグルコース)、代謝物質 (例えばビルビン酸、乳酸)、及び神経伝達物質 (例えばグルタミン酸) などのヒト脳微小透析液における小分子を測定するいくつかの研究が、実行されてきた (Hutchinson, P. J., O'Connell, M. T., Kirkpatrick, P. J., and Pickard, J. D. (2002) How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? *Physiol. Meas.* 23, R75-R109; Reinstrup, P., Stahl, N., Mellergard, P., Uski, T., Ungerstedt, U., and Nordstrom, C. H. (2000) Intracerebral microdialysis in clinical practice: Baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 47, 701-709; Tisdall, M. M., and Smith, M. (2006) Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool. *Br. J. Anaesth.* 97, 18-25)。逆に、現在までに報告されている、これらのまれな物質に関するプロテオミクス研究は、ほとんどない (Maurer, M. H. (2008) Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). *Mass Spectrom. Rev.*, DOI:10.1002/mas.20213; Maurer, M. H., Haux, D., Unterberg, A. W., and Sakowitz, O. W. (2008) Proteomics of human cerebral microdialysate: From detection of biomarkers to clinical application. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 437-443)。タンパク質を回収する能力は、それらの分子量、疎水性 / 親水性、電荷、形状、回転半径、及び他の分子との相互作用などのいくつかの物理化学的要因に依存する。微小透析カテーテルの構造、膜の孔径、流速、温度、及び灌流液の内部でのタンパク質の拡散特性は、タンパク質及び体液の回収の両方に影響を及ぼす (Helmy, A., Carpenter, K. L. H., Skepper, J. N., Kirkpatrick, P. J., Pickard, J. D., and Hutchinson, P. J. (2009) Microdialysis of Cytokines: Methodological Considerations, Scanning Electron Microscopy, and Determination of Relative Recovery. *J. Neurotrauma* 26, 549-561)。例として、重要な細胞内及び細胞外機能を有する 12 kDa カルシウム結合タンパク質であるタンパク質 S100-B (S100B) のインビボでの回収 (Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668) は、20 kDa の正式なカットオフ値と比較して、100 kDa のカテーテル MW カットオフにより改善された (Afinowi, R., Tisdall, M., Keir, G., Smith, M., Kitchen, N., and Petzold, A. (2009) Improving the recovery of S100B protein in cerebral microdialysis: Implications for multimodal monitoring in neurocritical care. *J. Neurosci. Methods* 181, 95-99)。カテーテル内の生物学的デブリ (debris) の蓄積もまた、ある期間にわたって回収を減少させる

10

20

30

40

50

ことが示された (Helmy, A., Carpenter, K. L. H., Skepper, J. N., Kirkpatrick, P. J., Pickard, J. D., and Hutchinson, P. J. (2009) Microdialysis of Cytokines: Methodological Considerations, Scanning Electron Microscopy, and Determination of Relative Recovery. *J. Neurotrauma* 26, 549-561)。したがって、微小透析アプローチは、依然として、技術的に非常に困難なままである。さらに、それらは、切開及び脳の内側の部分への接触を必要とする侵襲性の手順に相当し、これは、非常に特殊であり、実行するのが困難な手順である。

【 0 0 0 7 】

このような状況において、Maurer et al.は、二次元ゲル電気泳動及び質量分析 (MS, mass spectrometry) を用いてヒト脳微小透析液のプロテオミクス分析を実行し、脳卒中患者の非梗塞 (つまり対側 (CT, contralateral)) 脳半球から 27 のタンパク質を同定した (Maurer, M. H., Berger, C., Wolf, M., Futterer, C. D., Feldmann, R. E., Jr., Schwab, S., and Kuschinsky, W. (2003) The proteome of human brain microdialysate. *Proteome Science* 1, 7)。それらのタンパク質の多くは、以前に、CSFにおいて検出されたが、ほとんどは、脳微小透析液中に独占的に存在するようには思われなかった。どれも脳卒中のバイオマーカーとして十分な有用性を示すようには思われなかった。より最近の調査では、血管攣縮を発症している又はしていないクモ膜下出血 (SAH, subarachnoid hemorrhage) を有する患者の微小透析液試料が比較された (Maurer, M. H., Haux, D., Sakowitz, O. W., Unterberg, A. W., and Kuschinsky, W. (2007) Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage: Preliminary results of a proteome-wide screening. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1675-1683)。グリセルアルデヒド - 3 - リン酸及び熱ショック類似 71 kDa タンパク質 (heat-shock cognate 71 kDa protein) は、副作用として脳梗塞をもたらす可能性がある後部血管攣縮を患っていた群においてそれぞれ増加及び減少した。その著者らは、これらのタンパク質を、SAH後の症候性血管攣縮の発症についての初期マーカーとして使用することができるという結論を下した。

【 0 0 0 8 】

上記のゆえに、急性脳外傷を示すマーカーの同定及び / 又は脳卒中の診断は、当分野において未解決の課題のままである。

【 0 0 0 9 】

本発明は、先行技術に関連する課題 (複数可) を克服しようとするものである。

【 先行技術文献 】

【 非特許文献 】

【 0 0 1 0 】

【 非特許文献 1 】 Foerch, C., Montaner, J., Furie, K. L., Ning, M. M., and Lo, E. H. (2009) Invited Article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 73, 393-399

【 非特許文献 2 】 Poca, M. A., Sahuquillo, J., Vilalta, A., De los Rios, J., Robles, A., and Exposito, L. (2006) Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: Description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 23, 1510-1517

【 非特許文献 3 】 Hutchinson, P. J., O'Connell, M. T., Kirkpatrick, P. J., and Pickard, J. D. (2002) How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? *Physiol. Meas.* 23, R75-R109

【 非特許文献 4 】 Reinstrup, P., Stahl, N., Mellergard, P., Uski, T., Ungerstedt, U., and Nordstrom, C. H. (2000) Intracerebral microdialysis in clinical practice: Baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 47, 701-709

【 非特許文献 5 】 Tisdall, M. M., and Smith, M. (2006) Cerebral microdialysis: res

10

20

30

40

50

earch technique or clinical tool. Br. J. Anaesth. 97, 18-25

【非特許文献6】Maurer, M. H. (2008) Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). Mass Spectrom. Rev., DOI:10.1002/mas.20213

【非特許文献7】Maurer, M. H., Haux, D., Unterberg, A. W., and Sakowitz, O. W. (2008) Proteomics of human cerebral microdialysate: From detection of biomarkers to clinical application. Proteomics Clin. Appl. 2, 437-443

【非特許文献8】Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 637-668

【非特許文献9】Afinowi, R., Tisdall, M., Keir, G., Smith, M., Kitchen, N., and Petzold, A. (2009) Improving the recovery of S100B protein in cerebral microdialysis: Implications for multimodal monitoring in neurocritical care. J. Neurosci. Methods 181, 95-99 10

【非特許文献10】Helmy, A., Carpenter, K. L. H., Skepper, J. N., Kirkpatrick, P. J., Pickard, J. D., and Hutchinson, P. J. (2009) Microdialysis of Cytokines: Methodological Considerations, Scanning Electron Microscopy, and Determination of Relative Recovery. J. Neurotrauma 26, 549-561

【非特許文献11】Maurer, M. H., Berger, C., Wolf, M., Futterer, C. D., Feldmann, R. E., Jr., Schwab, S., and Kuschinsky, W. (2003) The proteome of human brain microdialysate. Proteome Science 1, 7 20

【非特許文献12】Maurer, M. H., Haux, D., Sakowitz, O. W., Unterberg, A. W., and Kuschinsky, W. (2007) Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage: Preliminary results of a proteome-wide screening. J. Cereb. Blood Flow Metab. 27, 1675-1683

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

損傷を受けた組織のすぐ近くのリアルタイムのモニタリング及び試料採取を可能にすることにより、ヒト脳微小透析液は、脳特異的バイオマーカーの発見のための非常に有益な供給源材料である。ヒト脳微小透析試料のプロテオミクス分析は、脳卒中などの脳血管障害の診断及び予後判断のための革新的な分子を見出すために、本発明者らによって適用された。 30

【0012】

これらの研究は、特定のバイオマーカーの同定を可能にし、それらを脳卒中との関連について調べることをさらに可能にした。バイオマーカーは、損傷を受けた領域の中心の近く又は他のそのような特性などの外傷の特定の形態又は要素とのそれらの関連の点からさらに特徴づけることができた。

【0013】

これらの大変な研究から得られた見識は、脳卒中などの急性脳外傷についてのある種のバイオマーカーの同定を可能にした。したがって、本発明者らは、本明細書において詳述されるように、状態の診断を補助するための方法を発明することができた。 40

【課題を解決するための手段】

【0014】

したがって、一態様では、本発明は、対象における急性脳損傷 (brain damage) の診断を補助するための方法であって、

(i) 前記対象由来の試料における、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1からなる群から選択される少なくとも1つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、

(ii) パネルAから選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、 50

(iii) (i) 及び (ii) の濃度を標準試料におけるポリペプチドの濃度と比較し、前記ポリペプチドについての量比を決定するステップとを含み、

(iv) 前記試料においてアッセイしたそれぞれのポリペプチドの前記標準試料中のポリペプチドに対する量比の結果が 1.3 を超えると、急性脳損傷が前記対象において生じている可能性の増加を示す方法に関する。

【0015】

酸化ストレスポリペプチドは、酸化ストレス関連ポリペプチドと呼ぶことができる。

【0016】

任意選択で、(i) のうちの少なくとも 1 つの酸化ストレスポリペプチドは、酸化ストレスタンパク質 S100B と組み合わせてアッセイすることができる。

10

【0017】

ポリペプチドは、適切には、酸化ストレスポリペプチドである。ポリペプチドは、適切には、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1 からなる群から選択される。この群は、酸化ストレスタンパク質となる共通の特性を共有する。これらのタンパク質は、抗酸化酵素である。それらは、それぞれ活性酸素種の排除への関与によって関連している。したがって、これらのポリペプチドは、概念的に関連づけられる。さらに、それらは、機能的に関連づけられる。これらのポリペプチドは、脳卒中の診断に役立つものとして、初めて、群として教示される。したがって、本発明によって当技術分野に対して成された 1 つの貢献は、ポリペプチドのこの生物学的に関連する群を、脳卒中の診断インジケータとなる単一の群に、ともに分類することである。

20

【0018】

任意選択で、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1 の群は、酸化ストレスによって誘発される他のタンパク質を含んでいてもよい。例えば、群は、酸化ストレスにおいて誘発されるタンパク質 S100B を含んでいてもよい。これらのポリペプチドは、脳卒中の診断に役立つものとして、初めて、群として教示される。

【0019】

上記に述べられる共通の特性に加え、また、この群について初めて本明細書で教示された特異的な共通の有用性に加え、また、ポリペプチドのこのクラスターの小さく、定められたサイズに加えて、それらがまた、互いに、直接的な相互作用物質として証拠づけられることによっても関連することに注目することは重要である。例えば、これらのタンパク質は、単一の生物学的複合体の一部であることが実証されている。

30

【0020】

例えば、PRDX1 及び GSTP1 は、同様のレドックス防御メカニズムに関係する。さらに、それらは、ともに相互作用することが証拠づけられている (Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2003) Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 967, 152-160)。さらに、GSTP1 は、酸化 PRDX6 を再活性化することが示されている (Schreibelt, G., van Horssen, J., Haseloff, R. F., Reijerkerk, A., van der Pol, S. M. A., Nieuwenhuizen, O., Krause, E., Blasig, I. E., Dijkstra, C. D., Ronken, E., and de Vries, H. E. (2008) Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 256-264)。さらに、複合体の形成は、生化学的に実証されている (Kim, Y. J., Lee, W. S., Ip, C., Chae, H. Z., Park, E. M., and Park, Y. M. (2006) Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex. *Cancer Res.* 66, 7136-7142)。

40

【0021】

共通の生物学的機能のこれらの強力な指標に加えて、GSTP1 は、酸化 PRDX6 を再活性化すると示されている (Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathio

50

nylation mediated by heterodimerization with pi GST. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 3780-3785)。さらに、これらのポリペプチドの間の複合体形成もまた、証明されている (Ralat, L. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2006) Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. Biochemistry (Mosc). 45, 360-372)。

【 0 0 2 2 】

したがって、少なくともこれらの理由で、PRDX 1、PRDX 6、及びGSTP 1からなる群は、一つの発明を形成し、この非常に小さな群のそれぞれのメンバーは、一つの発明概念を形成するように関連づけられる。この概念は、脳卒中のインジケータとしての酸化ストレスタンパク質のアッセイとして特徴づけることができる。その代わりに、この概念は、一つの生物学的集合体（つまり上記に記載のペルオキシレドキシン複合体）についてのアッセイが、脳卒中の診断を補助することができるということを教示するとして特徴づけることができる。最も明確な用語において本発明を定義するために、複合体の個々の異なる分子メンバーは、個々に詳述される。しかしながら、これらの個々のポリペプチドが、上記に示される理由で技術的な関係性を共有することに注意されたい。したがって、言及される個々のタンパク質のそれぞれは、同じ生物学的複合体中にあり、同じ生物学的機能に寄与し、同じインビボ巨大分子集合体中にあるという特有の技術的特徴及び記載される他の共通の特性を共有する。したがって、本出願は、この複合体のメンバーを脳卒中の診断に関連させる新しい教示によって特徴づけられる一つの発明に関する。

10

20

【 0 0 2 3 】

適切には、ステップ (i) は、PRDX 1、PRDX 6、及びGSTP 1からなる群から選択される少なくとも2つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 2 4 】

適切には、ステップ (i) は、酸化ストレスポリペプチドPRDX 1、PRDX 6、及びGSTP 1のそれぞれの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 2 5 】

適切には、ステップ (ii) は、他の機能を有するタンパク質と組み合わせた、より大きなパネルの一部としての、上記に記載の酸化ストレス関連タンパク質のパネルの1又は2以上の測定値を含んでいてもよい。例えば、これは、脳微小透析液において発見された他のタンパク質を含む。

30

【 0 0 2 6 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル B から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 2 7 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル C から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 2 8 】

適切には、ステップ (ii) は、拡大パネル A B C から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

40

【 0 0 2 9 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 1 から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 0 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 1 H から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 1 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 1 C から選択される少なくとも1つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

50

【 0 0 3 2 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 1 A から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 3 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 1 B から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 4 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 2 から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 5 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 2 A から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

10

【 0 0 3 6 】

適切には、ステップ (ii) は、パネル 2 B から選択される少なくとも 1 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 7 】

適切には、ステップ (ii) は、前記パネルから選択される少なくとも 2 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 3 8 】

適切には、ステップ (ii) は、前記パネルから選択される少なくとも 4 つのさらなるポリペプチドの濃度をアッセイすることを含む。

20

【 0 0 3 9 】

適切には、前記パネルからの少なくとも 1 つのさらなるマーカの濃度のアッセイが、実行される。

【 0 0 4 0 】

適切には、急性脳外傷は、脳卒中である。

【 0 0 4 1 】

適切には、試料は、脳微小透析体液、脳脊髄液、又は血液である。

【 0 0 4 2 】

最も適切には、試料は、血液である。

30

【 0 0 4 3 】

適切には、ステップ (i) は、前記対象由来の試料における P R D X 1 の濃度をアッセイすることを含む。

【 0 0 4 4 】

適切には、タンパク質は、ウエスタンブロッティングによって検出される。

【 0 0 4 5 】

適切には、タンパク質は、ビーズサスペンションアレイ又は平面アレイによって検出される。

【 0 0 4 6 】

適切には、タンパク質は、アイソバリックタンパク質タギング (isobaric protein tagging) 又は同位体タンパク質タギング (isotopic protein tagging) によって検出される。

40

【 0 0 4 7 】

適切には、タンパク質は、質量分析計ベースのアッセイによって検出される。

【 0 0 4 8 】

他の態様では、本発明は、第 1 及び第 2 のポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質の、急性脳損傷に関連する診断応用又は予後判断応用のための使用であって、第 1 のポリペプチドが、P R D X 1、P R D X 6、及び G S T P 1 から選択され、第 2 のポリペプチドが、パネル A から選択される使用に関する。

50

【 0 0 4 9 】

他の態様では、本発明は、ポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質の、脳卒中に関連する診断応用又は予後判断応用のための使用であって、ポリペプチドが、パネル 2 から選択される使用に関する。

【 0 0 5 0 】

他の態様では、本発明は、それぞれ、1つ又は2つ以上の前記ポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性をそれぞれが有する物質の組み合わせの、上記に記載の使用に関する。

【 0 0 5 1 】

他の態様では、本発明は、物質又はそれぞれの物質が、抗体又は抗体チップである、上記に記載の使用に関する。

【 0 0 5 2 】

他の態様では、本発明は、物質が、1つ又は2つ以上の前記ポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントに対して特異性を有する抗体である、上記に記載の使用に関する。

【 0 0 5 3 】

他の態様では、本発明は、急性脳損傷の診断において使用するためのアッセイデバイスであって、第 1 及び第 2 のポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質を含有する位置を有する固体基質を含み、第 1 のポリペプチドが、PRDX 1、PRDX 6、及び GSTP 1 から選択され、第 2 のポリペプチドが、パネル A から選択されるアッセイデバイスに関する。

【 0 0 5 4 】

他の態様では、本発明は、脳卒中の診断において使用するためのアッセイデバイスであって、ポリペプチド又はその断片、バリエーション、若しくはミュータントを認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有する物質を含有する、位置を有する固体基質を含み、ポリペプチドが、パネル 2 から選択されるアッセイデバイスに関する。

【 0 0 5 5 】

上記に記載のアッセイデバイスにおいて、適切には、物質は、抗体又は抗体チップである。

【 0 0 5 6 】

適切には、アッセイデバイスは、それぞれの抗体について固有のアドレス指定可能な位置を有し、それによって、それぞれの個々のポリペプチド又はポリペプチドの任意の組み合わせについてアッセイの読み取りを可能にする。

【 0 0 5 7 】

他の態様では、本発明は、脳卒中の診断において使用するためのキットであって、上記に記載のアッセイデバイス、及び対象から採取される体液の試料における 1 又は 2 以上のポリペプチドの量を検出するための手段を含むキットに関する。

【 0 0 5 8 】

より適切には、ポリペプチドは、ペルオキシレドキシシンである。より適切には、ポリペプチドは、PRDX 1 である。

【 0 0 5 9 】

他の態様では、本発明は、対象における急性脳損傷の診断又は予後モニタリングの方法であって、

- (a) 個体由来の適切な組織試料からタンパク質を得、抽出するステップと、
- (b) 前記タンパク質を消化してペプチドの集団を産生するステップと、
- (c) 表 1 5 において列挙される 1 又は 2 以上のトランジションの選択反応モニタリング (Selected Reaction Monitoring) を使用して、表 1 4 において列挙される 1 又は 2 以上の前記ペプチドの存在量を決定するステップと、

10

20

30

40

50

(d) 前記 1 又は 2 以上のペプチドの存在量を、急性脳損傷の診断に関連する、あらかじめ決定されたペプチドの存在量と比較するステップと、

(e) 前記 1 又は 2 以上のペプチドの存在量の差異に基づいて、対象が急性脳損傷を患っているかどうか及び / 又は急性脳損傷が悪化している若しくは改善していることを決定するステップと

を含む方法に関する。

【 0 0 6 0 】

適切には、あらかじめ決定されたペプチドの存在量は、表 1 4 から選択される対応する合成ペプチドの既知の量を使用して決定される。

【 0 0 6 1 】

他の態様では、本発明は、表 1 4 において列挙される群から選択される 1 又は 2 以上の合成ペプチドを含む、急性脳損傷の診断又は急性脳損傷を有する対象の予後モニタリングを行うための調製物に関する。

【 0 0 6 2 】

適切には、前記 1 又は 2 以上の合成ペプチドは、

GSTP1 TFIVGDQISFADYNLLDLLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAYVGR
MPPYTVVYFPVR
DDYVK
DQQEAALVDMVNDGVEDLR
FQDGDLTLYQSNTILR
ASCLYGQLPK
AFLASPEYVNLPIINGNGK
MLLADQGGQSWK
LSARPK
TLGLYGK
EEVVTVETWQEGSLK
ALPGQLKPFETLLSQNQGGK
YISLIYTNYEAGK

PRDX1 HGEVCPAGWKPGSDTIKPDVQK
QGGLGPMNIPLVSDPK
ADEGISFR
DISLSDYK
LVQAFQFTDK
IGHPAPNFK
LNCQVIGASVDSHFCHLAWVNTPK
YVFFFYPLDFTFVCPTEIIAFSDR
MSSGNAK
TIAQDYGVLLK
ATAVMPDGQFK

PRDX6 GMPVTAR
MPGLLLLGDVAPNFEANTTVGR
DFTPVCTTELGR
VVFVFGPDK
LIALSIDSVEDHLAWSK
ELAILLGMLDPAEK
LSILYPATTGR
VATPVDWK
NFDEILR

10

20

30

40

50

LPFFI I DDR
 VV I SLQLTAEK
 D I NAYNCEEPTEK
 LAPEFAK
 DGDSVMVLPT I PEEEEAK
 FHDFLGDSWG I LFSHPR

DDAH1	ALPESLGQHALR DENATLDGGDVLFTGR DYAVSTVPVADGLHLK GAE I LADTFK GEEVDVAR QHQLYVGVLGSK TPEEYPESAK	10
CYTB	HDELTYF SQVVAGTNYF I K VFQSLPHENKPLTLSNYQTNK VHVGDEDFVHLR	20
ACBP	MSQAEFEK AAEEVR QATVGD I INTERPGMLDFTGK TKPSDEMLF I YGHYK WDAWNELK MWGDLWLLPPASANPGTGTEAEFEK MPAFAEFEK	
CSRP1	GFGFGQGAGALVHSE GLESTTLADK GYGYQGAGTLSTDK	30
MT3	GGEAAEAEAEK MDPETCPCPSGGSCCADSCK SCCSCCPAECEK	
PEPB1	GND I SSGTVLSDYVGSPPK LYEQLSGK LYTLVLTDPDAPSR NRPTS I SWDGLDSGK VLTPTQVK YVWLVEQDRPLK	40

から選択される。

【 0 0 6 3 】

他の態様では、本発明は、それぞれのペプチドが、水素、炭素、酸素、窒素、又は硫黄から選択される 1 又は 2 以上の安定した重同位体を含む、上記に記載の調製物に関する。

【 0 0 6 4 】

他の態様では、本発明は、前記合成ペプチドが、同位体タグ (isotopic tag) 又はアイソバリックタグ (isobaric tag) により標識される、上記に記載の調製物に関する。

【0065】

他の態様では、本発明は、急性脳損傷の診断又は予後モニタリングのための、上記に記載の調製物に関する。

【0066】

他の態様では、本発明は、急性脳損傷が、虚血性脳卒中又は一過性脳虚血発作である、上記に記載の調製物に関する。

【0067】

他の態様では、本発明は、対象における脳卒中の診断を補助するための方法であって、
(i) 前記対象由来の試料における、PRDX1、PRDX6、及びGSTP1からなる群から選択される少なくとも1つの酸化ストレスポリペプチドの濃度をアッセイするステップと、

(ii) (i)の濃度を、標準試料におけるポリペプチドの濃度と比較し、前記ポリペプチドについての量比を決定するステップとを含み、

(iii) 前記試料におけるポリペプチドの前記標準試料中のポリペプチドに対する量比の結果が、1.3を超えると脳卒中が前記対象において生じている可能性の増加を示す方法に関する。

【発明を実施するための形態】

【0068】

本明細書において説明されるある方法ステップは、方法の他の必要条件に加えて、1又は2以上の「さらなるポリペプチド(複数可)」のアッセイを必要とする。さらなるポリペプチドは、既にアッセイされることが必要とされている1又は2以上のポリペプチドとは異なるポリペプチドである。本明細書において示されるポリペプチドの群のうちのいくつかは、本明細書において示される他の群に共通のメンバーを含有するので、これは重要である。明確に、「さらなるポリペプチド」についての言及は、方法の初期の部分によってアッセイされる又は既にアッセイされているあらゆるポリペプチドに加えて、追加のポリペプチドのアッセイを課することが意図される。したがって、方法が、A/B/Cのうちの1つがアッセイされることを必要とし、A/B/D/E/F/Gから選択されるさらなるポリペプチドについてのアッセイを必要とする場合、次いで、単に、Aを2回又はBを2回アッセイすることは、本明細書において説明される「さらなる」ポリペプチドをアッセイすることを構成せず、A、次いでBをアッセイすることは、さらなるポリペプチドについてのアッセイを構成し、A、次いでDをアッセイすることは、さらなるポリペプチドについてのアッセイを構成するなどとなる。したがって、適切には、さらなるポリペプチドは、追加のポリペプチドであり、適切には、さらなるポリペプチドは、同じ方法においてアッセイされる他のそれぞれのポリペプチドとは異なる。

【0069】

急性脳損傷は、脳に対する任意の急な発病の傷害又は外傷を包含する。急性脳損傷は、外傷性脳障害を含んでいてもよい。急性脳損傷は、虚血発作などの脳卒中から結果として生じる影響を含んでいてもよい。急性脳損傷は、任意の他の急性脳外傷を含んでいてもよい。好ましい実施形態では、急性脳外傷は、脳卒中であり、最も好ましくは虚血発作である。

【0070】

試料は、試験されることとなる対象由来の任意の適した生物学的試料であってもよい。試料は、脳の微小透析から集められた微小透析体液であってもよい。これは、可能性のある外傷の部位に最も密接に関連するという利点を有する。

【0071】

試料は、脳脊髄液であってもよい。これは、微小透析液よりも容易に採取されるという利点を有する。これは、そのため、患者及び採取を実行する熟練したオペレーターに対してそれほど大変ではない。

【0072】

試料は、血液であってもよい。これは、最小限に侵襲性の様式で容易に採取されるとい

10

20

30

40

50

う利点を有する。血液の採取は、通常の一般に入手可能な設備及び採取を実行する医療従事者のわずかな訓練を必要とする。

【0073】

試料は、きれいにされた血液 (cleared blood) (つまり血漿又はきれいにされた血漿 (cleared plasma)) であってもよく、赤血球及び白血球は、例えば遠心分離によって除去されている。これらには、試料を安定させ、それを保存する若しくは扱うのをより容易にする又はさらに分析する / アッセイするのを容易にするという利点がある。

【0074】

適切には、記載される方法 (複数可) は、対象由来の試料の採取の実際のステップを含まない。適切には、試料採取のステップは、本発明の方法から省かれる。適切には、試料は、あらかじめ採取される。適切には、方法は、インピトロの方法である。適切には、方法は、試料があらかじめ採取された対象の物理的な存在を必要としない。適切には、試料は、インピトロの試料である。

10

【0075】

血漿は、比較的容易に得ることができ、脳を含む他の器官のサブプロテオームを反映してもよい。候補タンパク質パネル及びゲルベースのプロテオミクスの両方は、可能性のあるバイオマーカーを同定するために血漿及び血清において以前に使用され、いくらか成功してきた。

【0076】

質量分析を用いる血漿のプロテオミクス分析に関する課題のうちの1つは、血漿タンパク質の莫大なダイナミックレンジ (dynamic range) である。タンパク質レベルは、並はずれた10桁に及び、これは、(より)少量のタンパク質の調査をほとんど不可能にする (Anderson and Anderson, 2002, Jacobs et al., 2005)。短期間で最も目立つピークが断片化のために選ばれるLC/MS/MSにおける機器の設定は、血清アルブミン及び他のタンパク質の高度な存在量により、未分画血漿における少量タンパク質の同定及び定量化を可能にしない。これは、少数の同定されるタンパク質において影響を及ぼされる。ダイナミックレンジを低下させるための1つのアプローチは、最も多量のタンパク質の試料を除去することであり、この場合、本発明者らは、アルブミン、トランスフェリン、IgG、IgA、アンチトリプシン、及びハプトグロビンを除去するために免疫親和性カラムを使用するこのアプローチを例示する。同定可能で定量化できるタンパク質の数は、かなり増加させることができ、相対的タンパク質レベルを、異なる試料の間で比較した。

20

30

【0077】

ある種のアッセイ形式については、本発明による試料は、処理された血漿であってもよい。これは、試料が質量分析によって分析されることになっている場合、好都合である。例えば、血漿は、非常に多量のタンパク質を除去し、それによって、検出可能なタンパク質の数を増加させるために又は低度の絶対的濃度で存在するタンパク質の検出性を増加させるために処理することができる。血漿由来の非常に多量のタンパク質の除去のための技術は、当技術分野においてよく知られている。特に、マルチプル親和性除去システム (multiple affinity removal system) は、分析のために血漿を処理するために好都合に使用することができる。

40

【0078】

さらに、試料は、適切には、濃縮血漿タンパク質などの血漿タンパク質を含んでいてもよい。本実施形態では、血漿は、本明細書において記載されるように処理してもよく、次いで、前記血漿由来のタンパク質を含む試料に至るために、サイズ排除クロマトグラフィー、バッファー交換、又は他のそのような処理にかけてもよく、これは、分析機器における優れた性能などの利点を提供することができる。

【0079】

さらに、脳卒中などの急性脳外傷に関連することが本明細書において教示されるバイオマーカーの多くが、実存の対象由来の血液からの検出又はモニタリングに初めて適用可能であることは、試料が血液又は血液産物である場合に、本発明の実施形態の特定の利点と

50

なり、既知の技術は、多くの場合、死亡した対象由来の脳脊髄液のアッセイに依存し、そのため、本明細書において教示されるように、生きている対象における診断を補助するための開示に以前に達していなかった。

【0080】

標準試料

標準試料は、典型的に、健康な個体、つまり、急性脳損傷、脳血管発作、又は関連する外傷を患っていない個体由来の試料を指す。

【0081】

標準試料は、並行して分析される実際の試料とすることができる。その代わりに、標準試料は、比較試料、例えば健康な対象由来の試料から以前に導き出された1又は2以上の値とすることができる。そのような実施形態では、単なる数の比較は、対象由来の試料について決定された値を、あらかじめ分析された参照試料の数値と比較することによって行うことができる。この利点は、対象由来の試料が分析されるごとに、並行して、個々の参照試料における濃度を決定することによって分析を再現する必要がないことである。

10

【0082】

適切には、標準試料は、例えば性別が、例えば年齢が、例えば民族的背景が、又は当技術分野においてよく知られている他の基準が、分析されている対象に一致する。標準試料は、1又は2以上の従来の研究によって得られた絶対的な濃度などの数であってもよい。

【0083】

標準試料は、適切には、特定の患者サブグループ、例えば高齢の対象又は脳卒中に対する素因などの以前の関連する履歴を有する対象又は人生において以前に1若しくは2以上の脳卒中を経験した対象に一致してもよい。

20

【0084】

適切には、標準試料は、分析されている試料タイプに一致する。例えば、アッセイされているバイオマーカーポリペプチド(複数可)の濃度は、試料のタイプ又は性質に依存して変化してもよい。標準試料についての濃度値(複数可)が、本発明の方法(複数可)において試験されている試料と同じ又は同等の試料についてのものであるはずであることは、当業者に直ちに明らかになるであろう。例えば、アッセイされている試料が血液である場合、標準試料値は、それが、意味のある相互比較が可能である、そのため計算されている意味のある量比であることを確実にするために、血液についてのものであるはずである。特に、試料の性質が2つの間で同一でない、所望の対象について決定される濃度及び標準試料について決定される濃度の間の比較によって推論が試みられる場合、細心の注意が払われなければならない。適切には、標準試料についての試料タイプ及び所望の対象についての試料タイプは、同じである。

30

【0085】

本発明のいくつかの実施形態については、決定されるポリペプチド濃度が、同じ対象由来の以前の試料と比較できることに注目されたい。これは、対象における脳損傷の進行をモニターするのに有益になり得る。これは、対象の治療の経過及び/又は効力のモニターにおいて有益になり得る。本実施形態では、方法は、所望の試料について決定される量比を、同じ対象について異なる時点で採取される試料などの異なる試料由来の同じポリペプチドについて決定される1又は2以上の量比と比較するさらなるステップ(複数可)を含んでいてもよい。そのような比較を行うことによって、情報は、特定のポリペプチドマーカーが特定の対象において増加している又は減少しているかどうかに関して集めることができる。この情報は、ある期間にわたる変化又は特定の治療若しくは治療方式によって阻害される若しくは刺激される変化又は所望の任意の他の変化するものを診断する又は予測するのに有用であり得る。したがって、急性脳損傷のポリペプチドバイオマーカーが、同じ対象由来の後の時点からの試料において上昇する又はさらに上昇する場合、次いで、これは、前記対象において進行する又は悪化する脳損傷の可能性を示す。同様に、急性脳損傷のポリペプチドバイオマーカーが、同じ対象由来の後の時点からの試料において減少する場合、これは、前記対象における急性脳損傷の改善又は緩和の可能性を示す。明確に、

40

50

これらの効果が、脳損傷のための治療を受けている対象において観察される場合、治療の効力に関する対応する推論は、本発明によって同様に得ることができる。言い換えれば、対象が治療を受けている場合、急性脳損傷のポリペプチドバイオマーカーが、同じ対象由来の後の時点からの試料において減少する場合、これは、治療が有効である可能性を示し、急性脳損傷のポリペプチドバイオマーカーが、同じ対象由来の後の時点からの試料において上昇する又はさらに上昇する場合、これは、治療が効果的でない可能性を示す。

【0086】

このように、本発明は、例えば、薬剤若しくは候補の薬剤を用いる患者の治療後に疾患が進行したかどうか又は疾患進行の速度が修正された(modified)ことを決定するために使用することができる。結果は、疾患の結果についての予後判断を導くことができる。

10

【0087】

組み合わせ

本発明は、よりロバストな診断又は予後判断を提供するためにバイオマーカーのパネルの一部として適用することができる。さらに、本発明は、所与の患者についての疾患状態のより完全な像又は可能性のある結果を提供するためにバイオマーカーのパネルの一部として適用することができる。

【0088】

もちろん、当業者は、本発明の特定のバイオマーカーを、当技術分野において知られている他のマーカーと好都合にも組み合わせてもよいことを十分に理解するであろう。本明細書において説明される特定のバイオマーカー又はバイオマーカーのパネルを含むそのような拡張された群は、もちろん、本発明によって包含されるように意図される。そのような一実施形態において試験するためのさらに知られているマーカーの選択は、適切な供給源によって当業者によって達成することができる。この状況では、さらなるバイオマーカーは、脳卒中に、脳卒中の特異な診断が必要とされる他の急性脳損傷障害に、又は脳卒中を有する患者若しくは患者の症状が脳卒中の症状を模倣する患者と一般に関連する他の疾患に関連してもよい。

20

【0089】

適切には、前記対象は、ヒトである。

【0090】

適切には、前記対象は、非ヒト哺乳動物である。

30

【0091】

適切には、前記対象は、げっ歯動物である。

【0092】

位置情報

本発明のマーカーポリペプチドは、脳外傷(brain injury)又は傷害(insult)の部位のそれらの近くに直接関連する微小透析体液における濃度の勾配を示すことができる。本発明のいくつかの実施形態については、決定されるポリペプチド濃度が、脳の異なる領域と比較できることに注目されたい。特に、傷害又は外傷の部位のすぐ付近の脳領域におけるポリペプチド濃度は、同じ脳の脳半球内のより遠位の領域と及び/又は無影響の対側脳半球と比較することができる。

40

【0093】

より適切には、脳外傷のタイプが虚血性脳卒中である場合、付近の領域は、梗塞中心部であり、同じ脳半球内のより離れた領域は、ペナンブラである。

【0094】

検出

マーカータンパク質は、その発現を変え得る、つまり、脳卒中などの急性脳損傷を有する患者において量的に増加し得る又は減少し得る。発現が正常対罹患状態において異なる程度は、2D電気泳動ゲルの銀染色、アイソバリック質量タグging(isobaric mass tagging)及び質量分析を使用する代表的なペプチドイオンの測定、又はウエスタンブロットing、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay

50

)、若しくはラジオイムノアッセイを含む免疫学的検出方法などの標準的な特徴づけの技術を介して視覚化するのに十分に大きい必要があるのみである。発現差異が視覚化される他の標準的な解析技術は、当業者らによく知られている。これらは、画分の連続的クロマトグラフィー分離及びピークの比較、キャピラリー電気泳動、マイクロチップ上でのものを含むマイクロチャンネルネットワークを使用する分離、並びに多重反応モニタリング (MRM, multiple reaction monitoring) 及びTMTcalibratorを含む質量分析法を含む (Dayon et al 2009)。

【0095】

タンパク質レベルが変わる程度は、典型的に、脳損傷の部位からの距離と逆比例の関係で変化する。脳微小透析液の場合には、見られる変化は、比較的大きくなり、また、典型的に、2を超える比は、発現における疾患関連性の変化を示す。脳脊髄液及び/又は血漿などのより遠位の部位では、変化(検出されるタンパク質の濃度における変化)の程度は、脳微小透析液よりも低くてもよいが、なお、診断又は予後的に有用な情報を提供する。そのような物質(例えば脳脊髄液及び/又は血漿)において、典型的に、1.3を超える比は、脳損傷を表すと考えられる。

【0096】

クロマトグラフィー分離は、Pharmacia社の文献において記載されるように、高速液体クロマトグラフィーによって実行することができ、クロマトグラムは、分離の時間に対する280nmでの光の吸光度のプロットの形態で得られる。次いで、不完全に分離したピークを生ずる物質に、再度クロマトグラフィーなどを行う。

【0097】

キャピラリー電気泳動は、多くの刊行物において、例えば、それらのPACE 5000 systemと共にBeckman社によって提供される文献「Total CE Solutions」において記載される技術である。この技術は、小さなキャピラリーチューブ中に含有される試料の両端に電位をかけることに依存する。チューブは、負荷電ケイ酸塩ガラスなどの荷電表面を有する。逆に荷電したイオン(この場合、陽イオン)は、表面に引きつけられ、次いで、表面と同じ極性の適切な電極(この場合、陰極)に移動する。試料のこの電気浸透流(EOF, electroosmotic flow)において、陽イオンは、最も速く動き、これに、無電荷物質及び負荷電イオンが続く。したがって、タンパク質は、本質的にそれらに対する電荷によって分離される。

【0098】

マイクロチャンネルネットワークは、いくぶん、キャピラリーのように機能し、ポリマー物質の光剥離によって形成することができる。この技術において、UVレーザーは、適したUV吸収特性を有するポリマー、例えばポリエチレンテレフタレート又はポリカーボネート上への射撃において放たれる高エネルギー光パルスを生成するために使用される。入射光子は、制限された空間を有する化学結合を壊し、内圧の上昇、小さな爆発、及び剥離した物質の放出を導き、マイクロチャンネルを形成する空隙を通り過ぎる。マイクロチャンネル物質は、キャピラリー電気泳動と同様にEOFに基づいて分離を達成する。それは、それぞれのチップがそれ自体の試料インジェクター、分離カラム、及び電気化学的検出器を有するマイクロチップ形態に適応可能である。J.S.Rossier et al., 1999, Electrophoresis 20: pages 727-731を参照されたい。

【0099】

他の方法は、マーカータンパク質について結合アッセイを実行することを含む。任意の適度に特異的な結合剤を使用することができる。好ましくは、結合剤は、標識される。好ましくは、アッセイは、とりわけバイオマーカー及びタンパク質を認識する抗体、とりわけ標識抗体の間のイムノアッセイである。それは、マーカータンパク質の一部又はすべてに対して産生される抗体、例えば、マーカータンパク質に対して高度な特異性のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗ヒト抗血清とすることができる。

【0100】

結合アッセイがイムノアッセイである場合、それは、タンパク質/抗体相互作用の程度

10

20

30

40

50

を測定することによって実行することができる。イムノアッセイの任意の知られている方法を使用することができる。サンドイッチアッセイは、好ましい。例示的なサンドイッチアッセイにおいて、マーカートンパク質に対する第1の抗体は、プラスチックマイクロタイタープレートのウェルなどの固相に結合し、試料及びアッセイされることとなるタンパク質に特異的な標識二次抗体と共にインキュベートされる。その代わりに、抗体捕捉アッセイを使用することができる。ここで、被検試料は、固相に結合し、次いで、抗マーカートンパク質抗体を添加し、結合させる。非結合物質を洗浄した後に、固相に結合した抗体の量は、第1の抗体に対する標識二次抗体を使用して決定される。

【0101】

他の実施形態では、競合アッセイは、試料及び標識マーカートンパク質又はそれから誘導されるペプチドの間で実行され、2つの抗原は、固体支持体に結合した、限られた量の抗マーカートンパク質抗体について競合する。標識マーカートンパク質又はそのペプチドは、固相上の抗体と共にあらかじめインキュベートすることができ、それによって、試料中のマーカートンパク質は、抗体に結合したマーカートンパク質又はそのペプチドの一部に取って代わる。

10

【0102】

他の実施形態では、2つの抗原を、抗体との単一の同時インキュベーションにおいて競合させる。洗浄による支持体からの非結合抗原の除去後に、支持体に付加された標識の量が決定され、試料中のタンパク質の量は、あらかじめ確立された標準滴定曲線に対する参照によって測定される。

20

【0103】

結合アッセイ中の結合剤は、抗体又は他の特異的結合剤であってもよい標識された特異的な結合剤であってもよい。結合剤は、通常、それ自体標識されるが、その代わりに、それは、シグナルが例えば他の標識物質から生成される二次反応によって検出することができる。

【0104】

標識は、酵素であってもよい。酵素に対する基質は、例えば発色、蛍光、又は化学発光基質であってもよい。

【0105】

アッセイの増幅形態を使用することができ、それによって、増強された「シグナル」は、比較的レベルの検出されることとなるタンパク質から産生される。増幅イムノアッセイの1つの特定の形態は、増強化学発光アッセイである。好都合に、抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにより標識され、これは、ルミノール、ペルオキシド基質、並びに放射された光の強度及び持続時間を増強する化合物、典型的に4-ヨードフェノール又は4-ヒドロキシケイ皮酸との化学発光反応に關与する。

30

【0106】

増幅イムノアッセイの他の形態は、イムノPCRである。この技術において、抗体は、PCRプライマーを含む任意のDNAの分子に共有結合し、それによって、それに付加された抗体を有するDNAは、ポリメラーゼ連鎖反応によって増幅される。E. R. Hendrickson et al., *Nucleic Acids Research* 23: 522-529 (1995)を参照されたい。シグナルは、従来どおり読み取られる。

40

【0107】

アッセイに必要とされる時間は、M. Robers et al., "Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction", *Clin. Chem.* 1998;44:1564-1567によって具体化されるタイプなどの急速微粒子増強比濁イムノアッセイの使用によって低下させてもよい。

【0108】

M. Robers et al. 前掲によって記載されるHoffmann-La Roche社からのCOBAS (商標) MIRA Plus system又はAbbott Laboratories社からのAxSYM(商標) systemなどの広く使用

50

される臨床化学分析器において企図される任意のイムノアッセイの完全なオートメーションは可能であり、ルーチン的な臨床診断のために適用されるはずである。

【0109】

(i) その抗体と相互作用する1又は2以上のタンパク質を検出することができる抗体アレイ若しくは「チップ」又はビーズサスペンションアレイを使用することもまた、本発明の範囲内で企図される。

【0110】

抗体チップ、抗体アレイ、又は抗体マイクロアレイは、連続的な固体表面上の固有のアドレス指定可能なエレメントのアレイであり、それによって、それぞれの固有のアドレス指定可能なエレメントで、抗原に対する定められた特異性を有する抗体は、標的抗原のその続く捕捉及びそのような結合の程度の続く検出を可能にする様式で固定される。それぞれの固有のアドレス指定可能なエレメントは、特異的な抗原の結合及び検出が、あらゆる付近のそのような固有のアドレス指定可能なエレメントに干渉しないように、固体表面上で、他のすべての固有のアドレス指定可能なエレメントから間を置いて配置される。

10

【0111】

「ビーズサスペンションアレイ」は、1又は2以上の同定可能な別個の粒子の水性懸濁液であり、それによって、それぞれの粒子は、そのサイズ及び色又は蛍光特性に関連するコーディング特徴を含有し、これに対して、そのようなコーディング特徴の特定の組み合わせのビーズはすべて、標的抗原のその続く捕捉及びそのような結合の程度の続く検出を可能にする様式で、抗原に対する定められた特異性を有する抗体によりコーディングされる。そのようなアレイの例は、Luminex (登録商標) 100 (商標) System に対する xMAP (登録商標) ビーズサスペンションアレイの適用が記載されている www.luminexcorp.com で見出すことができる。

20

【0112】

その代わりに、診断試料は、本明細書において記載されるようにアイソバリック質量タギング及び LC-MS/MS にかけることができる。アイソバリックタンパク質タギングを実行するための好ましい方法の例は、本出願の実施例の部において説明される。

【0113】

タンデム質量タグを使用するアイソバリックタンパク質タギングは、非常に正確な様式で相対的タンパク質レベルを決定することができることが以前に示された (Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., and Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 1895-1904; Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921-2931)。さらに、様々な組織及び体液におけるタンパク質タギングに iTRAQ を使用する多数の報告が、過去数年間に公開されてきた (Aggarwal et al., 2006)。とりわけ、様々な状態におけるバイオマーカーの発見については、iTRAQ は、非常に適したツールであることが証明され、癌 (Maurya et al., 2007, Garbis et al., 2008, Matta et al., 2008, Ralhan et al., 2008) 及び糖尿病研究 (Lu et al., 2008) において並びに CSF 中にもかかわらず神経変性障害におけるバイオマーカーについての探究 (Abdi et al., 2006) において使用されてきた。

30

40

【0114】

多重選択反応モニタリング (SRM 又は MRM)

MRM/SRM は、最も高度なデューティサイクル (duty cycle) を有するスキャンタイプであり、高感度で1又は2以上の特異的なイオンランジションをモニターするために使用される。ここで、Q1 は、特定の親 m/z に対して設定され (Q1 はスキャンしていない)、衝突エネルギーは、その親イオンの最適な診断上の荷電断片をもたらすように設定され、Q3 は、その断片の特定の m/z に対して設定される。この正確なランジシ

50

オンを有するイオンのみが、検出されることになる。薬剤代謝物質などの小分子を定量化するために歴史的に使用されるように、同じ原理は、ペプチド、内因性成分又はタンパク質の酵素消化から産生されるものに対して適用することができる。さらに、歴史的に、実験は、三連四重極質量分析計を使用して実行されたが、イオントラップと四重極を組み合わせるハイブリッド機器設計の最近の導入は、同様の改善された実験が試みられるのを可能にする。そのため、4000QTRAP機器は、多重反応モニタリング(MRM)を使用して非常に高度な特異性及び感度でペプチド及び生体分子定量化が実行されるのを可能にする。これは、ほとんど、複雑な混合物において多くの特異的なイオン(100までの異なるイオン)の存在を検出するために、続いて多くのMRMスキャンをとともに束ねて1つの実験にすることができるLINAC(登録商標)Collision Cellの使用によるものである。したがって、単一のクロマトグラフィー分離において多くのタンパク質から多数のペプチドを測定し、定量化することは現在、実現可能である。MRM LCピーク下の面積は、存在する分析物の量を定量するために使用される。典型的な定量化実験において、標準濃度曲線は、所望の分析物について生成される。次いで、未知の試料が同一の条件下で流されると、未知の試料中の分析物についての濃度は、ピーク面積及び標準濃度曲線を使用して決定することができる。

10

20

30

40

50

【0115】

診断試料は、イオントラップ質量分析計上のMRMによる分析にかけることができる。下記に記載されるマーカータンパク質の質量分析プロファイルに基づいて、好適なイオン化の特徴を有する、特定の既知の質量及びアミノ酸配列を有する単一のトリプシンペプチドが同定される。次いで、質量分析計は、特定の質量及び配列のペプチドについて特異的に調査し、それらの相対的シグナル強度を報告するようにプログラムされる。MRMを使用して、1回のLC-MSの実行において、5、10、15、20、25、30、40、50、又は100までの異なるマーカータンパク質について調査することが可能である。診断試料中の本発明の特定のバイオマーカーのMRMペプチドの強度は、疾患を有していない対象由来の試料中に見出されるものと比較され、診断又は予後判断が行われるのを可能にする。

【0116】

MRMアッセイは、マーカータンパク質のMRMペプチドに対応する合成絶対的定量(AQUA, absolute quantification)ペプチドからなる内部標準試料の使用によって、より正確に量的にすることができ、1又は2以上の原子は、炭素13又は窒素15などの安定同位体と置換され、そのような置換により、AQUAペプチドは、診断試料に由来するMRMペプチドの天然の、より軽い形態に対して定められた質量差異を有する。したがって、天然のMRMペプチド及びAQUAペプチドの相対的イオン強度を比較することによって、診断試料中の親タンパク質の真の濃度を決定することができる。そのような同位体希釈法による絶対的な定量化の一般的な方法は、Gerber, Scott A, et al. "Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS" PNAS, June 10, 2003. Vol 100. No 12. p 6940-6945において提供されている。

【0117】

いくつかの場合には、SRM実験において絶対的な定量化を提供するために同位体をドープした標準物質を使用することが望ましいが、上記に記載のAQUAアプローチを使用することは可能ではない。そのような場合、1対の同位体質量タグ、つまり、同一の化学構造を有するが、異なるレベルの同位体置換を有し、それぞれの固有の質量を生ずる2つのタグを使用することが可能である。5Daだけ質量が異なるTandem Mass Tag(登録商標)(TMT(登録商標))の2つの形態を使用して、アッセイにおいてすべての標的ペプチドについての全般的な基準を形成するために、混合前に軽いタグで標準合成参照SRMペプチドを標識することが可能である。次いで、患者試料はそれぞれ、トリプシン消化にかけられ、結果として生じるペプチドは、重いTMTタグにより標識される。次いで、TMT標識参照ペプチドのアリコートは、試料に添加され、患者試料において測定されることとなる標的範囲に適切な、参照ペプチドの最終濃度を生ずる。次いで、スパイクされた

試料は、標準的な同位体希釈SRMアッセイにかけられ、患者試料由来のSRMペプチドの濃度は、軽い方の形態の既知濃度のイオン強度に対して重い形態のイオン強度を比較することによって、計算される。

【0118】

バイオマーカー候補として同定された調節ペプチドの相対的又は絶対的定量化のためのMSベースのアッセイの代替形態は、Proteome Sciences plc社によって開発されたTMTcalibrator法である。好適なMS/MS反応を有する候補バイオマーカー（複数可）のトリプシン断片に相当する既知の量の合成ペプチドは、アイソバリック質量タグのTMT6セットの6つの試薬のうち4つ（TMT6-128～TMT6-131）により標識され、一定の比で混合される。これは、生理的濃度及び/又は疾患修飾濃度を反映するマルチポイント検量線が素速く設計され、構築されるのを可能にする。続いて、脳卒中などの急性脳外傷に罹患している又は罹患していることが疑われている患者から採取される診断試料は、TMT6-126により標識され、キャリブレーション混合物は、研究試料に添加される。個々のペプチドのMS/MSの間に、検量体ペプチドのTMT6レポーターイオンが産生され、検量線を確立するために使用される。次いで、研究試料中のペプチドの絶対量は、検量線に対してTMT6126イオン強度を読み取ることによって容易に導き出される。TMTcalibratorアッセイについてのさらなる情報は、Proteome Sciences社のウェブサイト（www.proteomics.com）から得ることができる。

10

【0119】

診断の好ましい方法は、マーカータンパク質についての結合アッセイを実行するステップを含む。任意の適度に特異的な結合パートナーを使用することができる。好ましくは、結合パートナーは、標識される。好ましくは、アッセイは、とりわけマーカー及びタンパク質を認識する抗体、とりわけ標識抗体の間のイムノアッセイである。それは、その一部又はすべてに対して産生される抗体、最も好ましくは、マーカータンパク質に対して高度な特異性のモノクローナル抗体又はポリクローナル抗ヒト抗血清とすることができる。

20

【0120】

したがって、上記に記載のマーカータンパク質は、診断試料中に存在するマーカータンパク質の濃度の増加又は減少を検出するために使用することができる、それに対する抗体を産生するのに有用である。そのような抗体は、免疫診断の分野においてよく知られている方法のうちのいずれかによって産生することができる。

30

【0121】

抗体は、タンパク質の任意の生物学的に関連する状態に対するものであってもよい。したがって、例えば、それらは、グリコシル化形態で体内に存在するタンパク質の非グリコシル化形態に対して、前駆物質タンパク質の、例えばそのシグナル配列がない、より成熟した形態に対して、又はマーカータンパク質の関連するエピトープを保持するペプチドに対して産生することができる。

【0122】

試料は、哺乳動物又は非哺乳動物対象の任意の有効な体組織、とりわけ体液から採取することができるが、好ましくは血液、血漿、血清、又は尿から採取することができる。他の使用可能な体液は、脳脊髄液（CSF）、精液、及び涙液を含む。好ましくは、対象は、マウス、ラット、モルモット、イヌ、又は霊長動物などの哺乳動物種である。最も好ましくは、対象は、ヒトである。

40

【0123】

好ましいイムノアッセイは、タンパク質/抗体相互作用の程度を測定することによって実行される。イムノアッセイの任意の知られている方法を使用することができる。サンドイッチアッセイは、好ましい。この方法において、マーカータンパク質に対する第1の抗体は、プラスチックマイクロタイタープレートのウェルなどの固相に結合し、試料及びアッセイされることとなるタンパク質に特異的な標識二次抗体と共にインキュベートされる。その代わりに、抗体捕捉アッセイを使用することができる。ここで、被検試料は、固相に結合し、次いで、抗マーカータンパク質抗体を添加し、結合させる。非結合物質を洗浄

50

した後に、固相に結合した抗体の量は、第1の抗体に対する標識二次抗体を使用して決定される。

【0124】

他の実施形態では、競合アッセイは、試料及び標識マーカートンパク質又はそれから誘導されるペプチドの間で実行され、2つの抗原は、固体支持体に結合した、限られた量の抗マーカートンパク質抗体について競合する。標識マーカートンパク質又はそのペプチドは、固相上の抗体と共にあらかじめインキュベートすることができ、それによって、試料中のマーカートンパク質は、抗体に結合したマーカートンパク質又はそのペプチドの一部に取って代わる。

【0125】

他の実施形態では、2つの抗原を、抗体との単一の同時インキュベーションにおいて競合させる。洗浄による支持体からの非結合抗原の除去後に、支持体に付加された標識の量が決定され、試料中のタンパク質の量は、あらかじめ確立された標準滴定曲線に対する参照によって測定される。

【0126】

標識は、好ましくは酵素である。酵素に対する基質は、例えば発色、蛍光、又は化学発光基質であってもよい。

【0127】

結合アッセイにおける結合パートナーは、好ましくは、標識された特異的な結合パートナーであるが、必ずしも抗体ではない。結合パートナーは、通常、それ自体標識されるが、その代わりに、それは、シグナルが例えば他の標識物質から生成される二次反応によって検出することができる。

【0128】

アッセイの増幅形態を使用することは非常に望ましく、それによって、増強された「シグナル」は、比較的レベルの検出されることとなるタンパク質から産生される。増幅イムノアッセイの1つの特定の形態は、増強化学発光アッセイである。好都合に、抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼにより標識され、これは、ルミノール、ペルオキシド基質、並びに放射された光の強度及び持続時間を増強する化合物、典型的に4-ヨードフェノール又は4-ヒドロキシケイ皮酸との化学発光反応に参与する。

【0129】

M. Robers et al., "Development of a rapid microparticle-enhanced turbidimetric immunoassay for plasma fatty acid-binding protein, an early marker of acute myocardial infarction", Clin. Chem. 1998;44:1564-1567. によって具体化されるタイプなどの急速微粒子増強比濁イムノアッセイの使用は、アッセイの時間を著しく減少させる。したがって、M. Robers et al. 前掲によって記載されるHoffmann-La Roche社からのCOBAS (商標) MIRA Plus system又はAbbott Laboratories社からのAxSYM (商標) systemなどの広く使用される臨床化学分析器において企図される任意のイムノアッセイの完全なオートメーションは、可能であり、ルーチン的な臨床診断のために適用されるはずである。

【0130】

その代わりに、診断試料は、マーカートンパク質の位置が分かる、染色ゲルを得るための二次元ゲル電気泳動にかけることができ、ゲル上の適切なスポットでの染色の相対的強度は、濃度測定によって決定し、対応する対照又は比較ゲルと比較することができる。

【0131】

さらなる実施形態では、診断試料は、三連四重極質量分析計上の又はある種のタイプのイオントラップ質量分析計上の多重反応モニタリング(MRM)などの質量分析計ベースのアッセイによる分析にかけることができる。それぞれの差次的に発現するタンパク質について、特定の既知の質量(親の質量)及びアミノ酸配列を有し、断片化に際して、それぞれのタンパク質に特有の特定の質量(断片の質量)の断片を放出するトリブシンペプチドのセットを同定することが可能である。定められた親の質量イオンからの断片の質量の検出は、トランジションとして知られている。

10

20

30

40

50

【0132】

そのようなプロテオタイプペプチド (proteotypic peptide) の同定は、バイオマーカー発見の間に見られる、差次的に発現されるタンパク質の質量分析プロファイルに基づいて行うことができ、又は当業者に知られている予測アルゴリズムを使用して、インシリコにおいて設計することができる。次いで、質量分析計は、それぞれのタンパク質について選択される特定の親の質量及び断片の質量のトランジションについてのみ特に調査するようにプログラムされ、それらの相対的シグナル強度を報告する。MRMを使用して、1回のLC-MSの実行において、5、10、15、20、25、30、40、50、又は100までの異なるマーカータンパク質について調査することが可能である。診断試料におけるそれぞれのマーカータンパク質についてのプロテオタイプペプチドの相対的存在量は、脳卒中などの急性脳外傷を有していない対象由来の試料中に見出されるものと比較され、診断が行われるのを可能にする。その代わりに、比較は、同じ患者由来の以前の試料からのタンパク質のレベルを用いて行われ、したがって、前記患者における脳卒中などの急性脳外傷の進行の段階及び/又は速度の予後のアセスメントを可能にしてもよい。

10

【0133】

本発明のさらなる実施形態では、MRMアッセイは、マーカータンパク質のプロテオタイプペプチドに対応する合成絶対的定量 (AQUA) ペプチドからなる内部標準試料の使用によって、より正確に量的にすることができ、1又は2以上の原子は、炭素13又は窒素15などの安定同位体と置換され、そのような置換により、AQUAペプチドは、診断試料に由来する天然のプロテオタイプペプチドに対して定められた質量差異を有する。一度、差次的に発現されるバイオマーカーからのそれぞれのプロテオタイプペプチドと等価なAQUAペプチドが産生されたら、それらは、患者試料のトリプシン消化物にその後スパイクされる標準試料を形成するように混合することができる。その後、組み合わせられた試料は、プログラムされた質量分析計ベースのアッセイにかけられ、天然及びAQUAペプチドからの所定のトランジションの強度が検出される。試料由来の天然ペプチド及びスパイクされたAQUA参照ペプチドの相対的イオン強度を比較することによって、診断試料中の親タンパク質の真の濃度を決定することができる。絶対的定量化の一般的な方法は、参照によって本明細書において組み込まれるGerber, Scott A, et al. "Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS" PNAS, June 10, 2003. Vol 100. No 12. p 6940-6945において提供されている。

20

30

【0134】

本発明のさらなる実施形態では、絶対的定量化は、TMT-SRMアッセイを使用することによって行うことができる。マーカータンパク質のプロタイプペプチドに対応する標準合成参照SRMペプチドは、アッセイにおけるすべてのマーカータンパク質についての全般的な基準を形成するために、混合前に、同位体置換を有していない軽いTMTタグ (軽いタグ) を用いて標識される。次いで、患者試料はそれぞれ、トリプシン消化にかけられ、結果として生じるペプチドは、5つの同位体置換を有するTMTタグ (重いタグ) を用いて標識される。次いで、軽いTMT標識基準ペプチドのアリコートは、重いTMT標識試料に添加され、患者試料において測定されることとなる標的範囲に適切な、参照ペプチドの最終濃度を生ずる。次いで、スパイクされた試料は、標準的な同位体希釈SRMアッセイにかけられ、患者試料由来のSRMペプチドの濃度は、軽い方の形態の既知濃度のイオン強度に対して重い形態のイオン強度を比較することによって、計算される。

40

【0135】

本発明は、上記に指定されるマーカータンパク質を認識する、それに結合する、又はそれに対する親和性を有するパートナー物質の診断 (したがっておそらく予後判断) 又は治療の目的での使用をさらにも含む。したがって、例えば、必要な場合には適切にヒト化される、マーカータンパク質に対する抗体は、治療において使用することができる。パートナー物質は、通常、抗体であり、任意のアッセイ適合形式、好都合には、固定形式で、例えばビーズ又はチップとして使用される。パートナー物質が標識され、又はそれは標識と相互作用することができる。

50

【0136】

本発明は、脳卒中などの急性脳外傷の診断及び予後モニタリングの方法における使用のためのキットであって、診断試料中に存在するマーカータンパク質との相互作用についての、上記に記載されている、アッセイ適合形式での、上記に記載のパートナー物質を含むキットをさらに含む。

【0137】

(i) 脳卒中などの急性脳外傷において差次的に発現される1又は2以上のタンパク質を検出することができる抗体チップ若しくはチップのアレイ又はビーズサスペンションアレイを使用することが、本発明の範囲内でさらに企図される。

【0138】

方法は、脳卒中などの急性脳外傷を治療するための有効な療法を決定することをさらに含んでいてもよい。

【0139】

さらなる態様では、本発明は、脳卒中などの急性脳外傷の発症又は進行を予防するための、正常な状態において見出されるものに向けて、脳卒中状態などの急性脳外傷において1又は2以上の差次的に発現されるタンパク質の発現を回復させる作用物質の使用による治療の方法を提供する。好ましくは、タンパク質の発現は、正常な状態まで回復する。

【0140】

さらなる態様では、本発明は、脳卒中などの急性脳外傷を有する個体の組織試料又は体液試料において差次的に発現するタンパク質のパターンが、脳卒中などの急性脳外傷を軽減するための最も適切で有効な療法を予測するために使用される方法を提供する。

【0141】

脳卒中などの急性脳外傷を治療する際のその有用性を決定するために作用物質をスクリーニングするための方法であって、

(a) スクリーニングされている作用物質を用いて治療された、脳卒中症状などの急性脳外傷を有する対象から採取される又はそれを代表する適切な組織の試料を得るステップと、

(b) 治療された対象由来の又はそれを代表する組織において差次的に発現するタンパク質(複数可)の存在、非存在、又は発現の程度を決定するステップと、

(c) 脳卒中症状などの急性脳外傷を有する、治療された対象において、差次的に発現するタンパク質(複数可)の発現、活性、又は量を変化させる程度によって作用物質を選択する又は拒否するステップと

を含む方法もまた提供される。

【0142】

好ましくは、それが差次的に発現するタンパク質の発現を正常な対象の発現に向けて変換する場合、作用物質が選択される。より好ましくは、それがタンパク質(複数可)の発現を正常な対象の発現に変換する場合、作用物質が選択される。

【0143】

脳卒中などの急性脳外傷を治療する際のその有用性を決定するために作用物質をスクリーニングするための方法であって、

(a) スクリーニングされている作用物質を用いて治療された、脳卒中症状などの急性脳外傷を有する対象から採取される又はそれを代表する適切な組織又は体液の試料をある期間にわたって得るステップと、

(b) 前記試料において差次的に発現するタンパク質(複数可)の存在、非存在、又は発現の程度を決定するステップと、

(c) 作用物質が、脳卒中症状などの急性脳外傷を有する、治療された対象における発現が異なるタンパク質の発現におけるある期間にわたる変化に影響を与えるかどうかを決定するステップと

を含む方法もまた、提供される。

【0144】

10

20

30

40

50

ある期間にわたって採取される試料は、数週間、数か月間、又は数年間の間隔で採取することができる。例えば、試料は、毎月、2か月ごと、3か月ごと、4か月ごと、6か月ごと、8か月ごと、又は12か月ごとの間隔で採取することができる。

【0145】

ある期間にわたる発現における変化は、対象由来の試料における発現の最初のレベル及び/又は正常な対象由来の試料における発現のレベルと比較した、発現の増加又は減少であってもよい。それがあある期間にわたって発現の変化を遅らせる又は停止する場合、作用物質が選択される。

【0146】

上記に記載のスクリーニング方法において、特異なレベルのタンパク質発現を有する対象は、

(a) 正常な対象及び脳卒中などの急性脳外傷を有する対象、並びに

(b) 作用物質を用いて治療されていない脳卒中症状などの急性脳外傷を有する対象及び作用物質を用いて治療されている脳卒中などの急性脳外傷を有する対象を含む。

【0147】

診断及び予後判断

本明細書において使用される用語「診断」は、患者における脳卒中などの急性脳外傷の存在、非存在、又は可能性に関するあらゆる情報の提供を含む。それは、それに関連して経験する又は経験する可能性がある障害又は症状のタイプ又は分類に関する情報提供をさらに含む。それは、状態の医学的経過の予後判断を包含する。それは、発病年齢に関する情報をさらに包含する。

【0148】

治療

治療が関係している場合には、治療が、患者に対する脳卒中などの急性脳外傷の影響を軽減するために医師によって取られるあらゆる手段を含むことが理解されるであろう。したがって、損傷の回復又は脳卒中などの急性脳外傷の損傷若しくは影響の排除が、望ましいゴールであるが、有効な治療はまた、損傷の程度又は影響の深刻さ又は進行における低下を達成することができるあらゆる手段を含む。

【0149】

一態様では、本発明は、脳卒中などの急性脳外傷の発症又は進行を予防するための、正常な状態において見出されるものに向けて、脳卒中状態などの急性脳外傷において1又は2以上の差次的に発現されるタンパク質の発現を回復させる作用物質の使用による治療の方法を提供する。好ましくは、タンパク質の発現は、正常な状態まで回復する。

【0150】

さらなる態様では、本発明は、脳卒中などの急性脳外傷を有する個体由来の試料において差次的に発現するタンパク質のパターンが、神経損傷を軽減するための最も適切で有効な療法を予測するために使用される方法を提供する。

【0151】

抗体

本明細書において開示されるマーカータンパク質に対する抗体は、知られている方法を使用して産生することができる。抗体を産生するためのこれらの方法は、タンパク質により哺乳動物(例えばマウス、ラット、ウサギ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、又はサル)を免疫することを含む。抗体は、当技術分野において知られている様々な技術のいずれかを使用して、免疫された動物から得ることができ、好ましくは所望の抗原に対する抗体の結合を使用してスクリーニングすることができる。動物からの抗体及び/又は抗体産生細胞の単離は、動物を屠殺するステップを伴ってもよい。

【0152】

タンパク質による哺乳動物の免疫の代わり又は補足として、タンパク質に特異的な抗体は、例えばそれらの表面上に機能的な免疫グロブリン結合ドメインを示すラムダバクテリオファージ又は糸状バクテリオファージを使用して、発現免疫グロブリン可変ドメインの

10

20

30

40

50

組換え産生ライブラリーから得ることができる。例えば国際公開第92/01047号パンフレットを参照されたい。ライブラリーは、ナイーブであってもよく、つまり、タンパク質により免疫していない生物から得られる配列から構築してもよく、又は所望の抗原に暴露された生物から得られる配列を使用して構築されるものであってもよい。

【0153】

抗体は、タンパク質の任意の生物学的に関連する状態に結合してもよく又はそれに対して産生してもよい。したがって、例えば、それらは、グリコシル化形態で体内に存在するタンパク質の非グリコシル化形態に対して、前駆物質タンパク質の、例えばそのシグナル配列がない、より成熟した形態に対して、又はマーカータンパク質の関連するエピトープを保持するペプチドに対して産生することができる。

10

【0154】

抗体は、ポリクローナル又はモノクローナルであってもよく、多特異性（二特異性を含む）、キメラ、又はヒト化抗体であってもよい。本発明による抗体は、多くの方法において修飾することができる。実際、用語「抗体」は、所定の特異性を有する結合ドメインを有するあらゆる結合物質を包含するとして解釈されるべきである。したがって、本発明は、合成分子及び形状が、それが抗原又はエピトープに結合するのを可能にする抗体の形状を模倣する分子を含む、抗体の抗体断片、誘導體、機能的等価物、及び相同体を包含する。

【0155】

抗原又は他の結合パートナーに結合することができる抗体断片の例は、V_L、V_H、C₁、及びC_H1ドメインからなるF_ab断片；V_H及びC_H1ドメインからなるF_d断片；抗体の単一のアームのV_Lドメイン及びV_HドメインからなるF_v断片；V_Hドメインからなるd_Ab断片；単離CD_R領域、並びにヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結される2つのF_ab断片を含む二価断片であるF_(a b')2断片である。単鎖F_v断片も含まれる。

20

【0156】

特異的なエピトープを認識する抗体断片は、知られている技術によって生成することができる。例えば、そのような断片は、抗体分子のペプシン消化によって産生することができるF_(a b')2断片及びF_(a b')2断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成することができるF_ab断片を含むが、これらに限定されない。その代わりに、F_ab発現ライブラリーを、所望の特異性を有するモノクローナルF_ab断片の急速で容易な同定を可能にするために構築することができる（Huse, et al., 1989, Science 246: 1275-1281）。

30

【0157】

本明細書において使用される用語「モノクローナル抗体」は、抗体の実質的に均質な集団から得られる抗体を指す、つまり、集団を含む個々の抗体は、わずかな量で存在し得る可能性のある天然に存在する突然変異は別として、同一である。モノクローナル抗体は、Kohler and Milstein, Nature, 256:495, 1975によって最初に記載された方法によって産生ことができ、又は組換え法によって作製することができる。Cabilly et al、米国特許第4,816,567号明細書又はMage and Lamoyi in Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pages 79-97, Marcel Dekker Inc, New York, 1987を参照されたい。

40

【0158】

ハイブリドーマ方法において、マウス又は他の適切な宿主動物は、免疫に使用されるナノ粒子に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することができるリンパ球を誘発するために、皮下、腹腔内、又は筋肉内経路によって抗原により免疫される。その代わりに、リンパ球は、インビトロで免疫することができる。次いで、リンパ球は、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などの適した融合剤を使用して、ミエローマ細胞と融合される。Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103 (Academic Press, 1986)を参照されたい。

50

【 0 1 5 9 】

したがって、調製されたハイブリドーマ細胞は、非融合親ミエローマ細胞の成長又は生存を阻害する、1又は2以上の物質を好ましくは含有する適した培地に接種し、それにおいて成長させることができる。例えば、親ミエローマ細胞が、酵素ヒポキサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HGPRT又はHPRRT）を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、典型的に、ヒポキサンチン、アミノプテリン、及びチミジン（HAT培地）を含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を予防する。

【 0 1 6 0 】

好ましいミエローマ細胞は、効率的に融合し、選択される抗体産生細胞による抗体の安定した高レベルの発現を支援し、HAT培地などの培地に感受性のものである。

10

【 0 1 6 1 】

ハイブリドーマ細胞が成長中の培地は、タンパク質に対するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされる。好ましくは、結合特異性は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA, enzyme-linked immunoabsorbance assay）によって決定される。本発明のモノクローナル抗体は、タンパク質に特異的に結合するものである。

【 0 1 6 2 】

本発明の好ましい実施形態では、モノクローナル抗体は、例えばスキャチャード解析によって決定されるように、マイクロモル以上の親和性を超える親和性（つまり10⁻⁶モルを超える親和性）を有する。Munson & Pollard, Anal. Biochem., 107:220, 1980を参照されたい。

20

【 0 1 6 3 】

所望の特異性及び親和性の中和抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後に、クローンは、限界希釈法によってサブクローニングし、標準的な方法によって成長させることができる。この目的に適した培地は、ダルベッコ変法イーグル培地又はRPM1-1640培地を含む。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで成長させてもよい。

【 0 1 6 4 】

サブクローンによって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、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーなど、通常の免疫グロブリン精製法によって、培地、腹水、又は血清から適切に分離される。

30

【 0 1 6 5 】

本発明のモノクローナル抗体をコードする核酸は、当技術分野においてよく知られている手順を使用して、例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって容易に単離され、配列決定される。本発明のハイブリドーマ細胞は、抗体又はその断片をコードする核酸の好ましい供給源である。一度単離されたら、核酸は、発現又はクローニングベクターにライゲーションされ、これらは、次いで、モノクローナル抗体が組換え体宿主細胞培養物において産生されるように、培養することができる宿主細胞にトランスフェクトされる。

40

【 0 1 6 6 】

本発明によるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、遺伝子突然変異又は他の変化を受けてもよい。モノクローナル抗体は、もとの抗体の特異性を保持する他の抗体、ヒト化抗体、又はキメラ分子を産生するために、組換えDNA技術の技術にかけることができることが当業者らによってさらに理解されるであろう。そのような技術は、抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域（CDR, complementarity determining region）をコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域又は定常領域及びフレームワーク領域に導入することを含んでいてもよい。例えば欧州特許出願公開第0 1 8 4 1 8 7 A号公報、英国特許出願公開第2 1 8 8 6 3 8 A号公報、又は欧州特許出願公開第0 2 3 9 4 0 0 A号公報を参照されたい。キメラ抗体のクローニング及び発現は、欧州特許出願公開第0 1 2 0 6 9 4 A号公報及び欧州特許出願公開第0

50

1 2 5 0 2 3 A号公報において記載されている。

【0167】

本明細書において記載されるマーカータンパク質に対する抗体は、前記タンパク質に結合する。好ましくは、前記抗体は、前記タンパク質に特異的に結合する。「特異的な」によって、抗体が、それが他の分子に対して示すよりも著しく高度な親和性により前記タンパク質に結合することを意味する。

【0168】

用語「抗体」は、ポリクローナル抗血清、モノクローナル抗体、単鎖及びFab断片などの抗体の断片、並びに遺伝子操作された抗体を含む。抗体は、キメラ又は単一の種のものであってもよい。

10

【0169】

用語「マーカータンパク質」又は「バイオマーカー」は、翻訳後修飾を含めて、同定されるタンパク質の生物学的に関連する形態をすべて含む。例えば、マーカータンパク質は、グリコシル化、リン酸化、多量体、前駆物質の形態で体組織中に存在することができる。

【0170】

用語「対照」は、正常なヒト対象、つまり、脳卒中などの急性脳外傷に罹患していない対象を指す。

【0171】

用語「対照試料と比較して増加した又は減少した濃度」は、多くの場合、濃度が異常に高度である又は低度であることは当業者にとって明らかであるので、比較するステップが実際に行われることを意味しない。さらに、脳卒中などの急性脳外傷の段階が連続的にモニターされている場合又は治療の経過がモニターされている場合、行われる比較は、疾患の進行の初期の段階で又は治療の初期の段階で若しくは治療を始める前に同じ対象において以前に見られた濃度とのものとすることができる。

20

【0172】

用語「有効な体組織」又は「適切な組織」は、脳卒中などの急性脳外傷に関連するマーカータンパク質が蓄積するであろうということが合理的に予想され得るあらゆる組織を意味する。それは、脳脊髄液試料又は血液又は血漿若しくは血清などの血液誘導体の試料であってよい。

30

【0173】

用語「抗体アレイ」又は「抗体マイクロアレイ」は、連続的な固体表面上の固有のアドレス指定可能なエレメントのアレイを意味し、それによって、それぞれの固有のアドレス指定可能なエレメントで、抗原に対する定められた特異性を有する抗体は、標的抗原のその続く捕捉及びそのような結合の程度の続く検出を可能にする様式で固定される。それぞれの固有のアドレス指定可能なエレメントは、特異的な抗原の結合及び検出が、あらゆる付近のそのような固有のアドレス指定可能なエレメントに干渉しないように、固体表面上で、他のすべての固有のアドレス指定可能なエレメントから間を置いて配置される。

【0174】

用語「ビーズサスペンションアレイ」は、1又は2以上の同定可能な別個の粒子の水性懸濁液を意味し、それによって、それぞれの粒子は、そのサイズ及び色又は蛍光特性に関連するコーディング特徴を含有し、これに対して、そのようなコーディング特徴の特定の組み合わせのビーズはすべて、標的抗原のその続く捕捉及びそのような結合の程度の続く検出を可能にする様式で、抗原に対する定められた特異性を有する抗体によりコーディングされる。そのようなアレイの例は、Luminex（登録商標）100（商標）Systemに対するxMAP（登録商標）ビーズサスペンションアレイの適用が記載されているwww.luminexcorp.comで見出すことができる。

40

【0175】

「質量分析アッセイ」は、選択反応モニタリング（SRM, selected reaction monitoring）、多重反応モニタリング（MRM）、同位体をドーブしたペプチドを使用する絶対

50

的定量化 (A Q U A)、 S R Mを用いるTandem Mass Tag (T M T S R M , Tandem Mass Tags with SRM)、及びTMTcalibratorを含むが、これらに限定されない、質量分析の任意の定量的方法を意味する。

【 0 1 7 6 】

本発明のポリペプチドバイオマーカーなどのバイオマーカーの「ミュータント」という用語は、当技術分野におけるその通常の意味を有する。ミュータントは、時に「バリエーション」又は「対立遺伝子」と呼ばれる。重要なことは、本明細書において説明されているように、バイオマーカーを検出することである。バイオマーカーは、研究されている個体の間で突然変異又は対立遺伝子バリエーションの形態の個体差を有していてもよい。そのため、本明細書において提供される例示的な配列番号からある程度の偏りがあってもよい。本明細書において提供される配列番号は、本発明のポリペプチド/バイオマーカーを同定し、扱う際に当業者を助けるためのものであり、アッセイされている個々のポリペプチドの制限された不変の定義として意図されない。したがって、提供される配列番号及び検出されているポリペプチドバイオマーカーの実際の配列の間のわずかな配列差異は、対象の間の正常な差の範囲内であることが予想されるであろう。これは、本発明の作業に影響を与えない。

10

【 0 1 7 7 】

用語「含む (comprises) 」 (含む (comprise) 、含む (comprising)) は、当技術分野におけるその通常の意味を有する、つまり、明示される特徴又は特徴の群が含まれるが、用語が、いかなる他の明示される特徴又は特徴の群も、同様に存在することから除くわけではないことを理解されたい。

20

【 0 1 7 8 】

断片/ペプチド

本明細書において説明されるバイオマーカーの詳細、特に、それらについて示される配列は、それらの検出を促進するために示されることが当業者によって十分に理解されるであろう。集められている重要な情報は、研究されている試料におけるバイオマーカーの存在若しくは非存在 (又は特定のレベル) である。完全長ポリペプチドがスコア化されるという特定の条件はない。実際、本明細書において説明される検出の適した質量分析ベースのモードの多くを介して、検出は、したがって試料における全体的なバイオマーカーポリペプチドの存在を示すために使用される、存在する所望のポリペプチドの特定の断片をアッセイすることによって起こる。そのため、本発明は、ポリペプチドバイオマーカーの断片の検出を包含する。さらに、本発明のキット及びペプチドは、ポリペプチドの断片を含んでいてもよく、本明細書において例示される完全長配列を含む必要はない。適切には、断片は、質量分析によるその固有の同定を可能にするのに十分に長い。

30

【 0 1 7 9 】

したがって、断片は、適切には、長さが少なくとも6のアミノ酸、適切には、長さが少なくとも7のアミノ酸、適切には、長さが少なくとも8のアミノ酸、適切には、長さが少なくとも9のアミノ酸、適切には、長さが少なくとも10のアミノ酸、適切には、少なくとも15のアミノ酸、適切には、少なくとも25のアミノ酸、適切には、少なくとも50のアミノ酸、適切には、少なくとも100のアミノ酸、又は適切には、所望のバイオマーカーポリペプチドの大部分である。適切には、断片は、所望のバイオマーカーポリペプチドの小さな断片を含むが、同定可能な質量を保持するのに十分に長い。

40

【 0 1 8 0 】

所定のポリペプチド又は質量分析ベースのアッセイによって検出されているポリペプチドのセットについて、アッセイは、本明細書において言及されるMRM技術を介して行われてもよい。本実施形態では、ある種の固有のペプチド、特にある種のトランジションは、所望のペプチドを検出するのにとりわけ好都合である。これらは、最高の表示を示すために典型的に選択される (又は多数の断片/トランジションが同様のレベルを示す場合、特定のレベルの表示を示す任意の又はすべてのペプチドなどの組み合わせを使用することができる) 。モニタリングに使用されるとりわけ好ましいトランジションは、添付の実施

50

例及び / 又は図面において言及されるものである。

【0181】

配列相同性 / 同一性

配列相同性は、機能的な類似性（つまり、類似する化学的特性 / 機能を有するアミノ酸残基）の点から考慮することができるが、本明細書との関連において、配列同一性の点から相同性を表現することが好ましい。配列比較は、眼によって又はより通常では、容易に入手可能な配列比較プログラムの援助によって行うことができる。これらの公的に、また市販で入手可能なコンピュータプログラムは、2つ以上の配列の間の相同性パーセント（同一性パーセントなど）を計算することができる。

【0182】

同一性パーセントは、連続する配列にわたり計算することができる、つまり、一方の配列は、他方の配列とアライメントされ、一方の配列におけるそれぞれのアミノ酸は、他方の配列における対応するアミノ酸と直接、同時に1つの残基が比較される。これは、「アンギャップ」アライメントと呼ばれる。典型的に、そのようなアンギャップアライメントは、比較的短い数の残基（例えば50未満の連続するアミノ酸）にわたってのみ実行される。より長い配列にわたる比較については、ギャップスコアリングは、互いに関して、挿入（複数可）又は欠失（複数可）を有する関連する配列における同一性レベルを正確に反映するように最適なアライメントをもたらすために使用される。そのようなアライメントを実行するのに適したコンピュータプログラムは、GCG Wisconsin Bestfitパッケージである（University of Wisconsin, U.S.A; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387）。配列比較を実行することができる他のソフトウェアの例は、BLASTパッケージ、FASTA (Altschul et al., 1990, J. Mol. Biol. 215:403-410)、及び比較ツールのGENEWORKSスーツを含むが、これらに限定されない。

【0183】

本明細書との関連において、相同なアミノ酸配列は、少なくとも40、50、60、70、80、又は90%同一であるアミノ酸配列を含むように解釈される。最も適切には、所望のバイオマーカーに対して少なくとも90%の配列同一性を有するポリペプチドは、そのバイオマーカーが存在を示すものとして解釈される；より適切には、アミノ酸レベルで95%又はより適切には98%同一であるポリペプチドは、そのバイオマーカーの存在を示すように解釈される。適切には、前記比較は、少なくとも、所望のバイオマーカーの存在又は非存在を決定するためにアッセイされているポリペプチド又は断片の長さにより行われる。最も適切には、その比較は、完全長の所望のポリペプチドにわたって行われる。同じ考慮は、核酸ヌクレオチド配列に当てはまる。

【0184】

代替方法

本明細書において例示される特定の技術は、所望される場合、同じ効果を達成するための容易に入手可能な代替案を使用して変化させることができることが、当業者によって理解されるであろう。例えば、血液試料中のバイオマーカーレベルのアッセイは、ウエスタンブロットによって又はアイソパリックタンパク質タギングによって又はELISAによって又は当技術分野において知られている任意の他の適した手段によって実行することができる。

【0185】

量比

脳卒中などの急性脳損傷を患っている対象において著しく減少する、本明細書において開示される多くのバイオマーカーがあることが十分に理解されるであろう。添付の実施例の部において説明されるように、これらは、科学的に同様に根拠がある。しかしながら、実際の問題として、分析されている試料中の特定のバイオマーカーの非存在又は減少を決定することは、より技術的に困難である。特に、検出における課題に対して減少した量のマーカーの純粋な検出を制御することは困難である。この理由で、本発明の好ましい実施形態では、使用されるバイオマーカーは、脳卒中などの急性脳損傷において上昇する又は

10

20

30

40

50

増加するものである。これらは、所望のバイオマーカー（複数可）の陽性の同定が、診断を積極的に補助することができるという利点を有する。

【0186】

したがって、本明細書において決定される量比が、標準試料における濃度に対する、分析されている対象の試料における濃度の比を記載することに注目されたい。したがって、試料における濃度が標準試料における1.3倍の濃度である場合、1.3の比は、達成される。明確に、比は、他の様式で表現することができるが（例えば、反対の方法で）、一貫性のために、試料における濃度が、標準物質における濃度よりも30%大きいことを1.3の比が意味するように、比は、試料：標準物質として本明細書において説明される。

【0187】

バイオマーカー

本発明の方法において1つを超えるバイオマーカーを使用することに利点がある。利点は、本発明の方法に対する特異性及び/又は感度の増加を含む。本発明者らは、本発明の方法（複数可）において特に好都合なバイオマーカーのパネルを示す。

【0188】

G S T P - 1 及びペルオキシレドキシニン 1 & 6 は、脳卒中の管理のための有用なマーカーを示す。上記に言及される理由で、本発明者らはまた、タンパク質のより大きなパネルをも示す。これらのパネルは、診断の感度及び/又は特異性を改善するなどの技術的な利点をさらに有する。

【0189】

開示されるある種のパネルはまた、予後情報を提供するという利点をも有する。したがって、本発明者らは、脳卒中及び心臓血管バイオマーカーに関連する文献の調査を実行し、53のタンパク質すべてについてのパスウェイ解析（pathway analysis）により、対側脳微小透析液と比較して、梗塞部及びペナンブラにおいて差次的に発現されることが分かった。この包括的な生物情報学アプローチに従って、バイオマーカーの3つのグループ、パネルA、パネルB、及びパネルCが選択された。これらは、降順の優先度の順に下記に示される。

パネル A	ID	説明
N° 1	ACBP__HUMAN	アシルCoA結合タンパク質
N° 2	CSRP1__HUMAN	システイングリシンリッチタンパク質 1
N° 3	PEBP1__HUMAN	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 1
N° 4	DDAH1__HUMAN	N(G), N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1
N° 5	MT3__HUMAN	メタロチオネイン - 3 (MT - 3)
N° 6	CYTB__HUMAN	シスタチン - B
パネル B	ID	説明
N° 1	PPIA__HUMAN	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ A
N° 2	NFM__HUMAN	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド (neurofilament medium polypeptide)
N° 3	UBIQ__HUMAN	ユビキチン
N° 4	B2MG__HUMAN	ベータ - 2 - ミクログロブリン前駆物質
N° 5	CYTC__HUMAN	シスタチン C 前駆物質 (シスタチン - 3)
N° 6	SH3L1__HUMAN	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質
N° 7	TPIS__HUMAN	トリオースリン酸イソメラーゼ
N° 8	MBP__HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質 (MBP, Myelin basic protein)
N° 9	MT2__HUMAN	メタロチオネイン - 2 (MT - 2, Metallothionein-2)
パネル C	ID	説明

10

20

30

40

50

N° 1	N F M _ _ H U M A N	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド
N° 2	C O T L 1 _ _ H U M A N	コアクトシン (Coactosin) 様タンパク質
N° 3	T H Y 1 _ _ H U M A N	T h y - 1 膜糖タンパク質前駆物質
N° 4	P R O F 1 _ _ H U M A N	プロフィリン - 1
N° 5	T Y B 4 _ _ H U M A N	チモシンベータ - 4
N° 6	M T 1 E _ _ H U M A N	メタロチオネイン - 1 E
N° 7	F A B P B _ _ H U M A N	脂肪酸結合タンパク質、脳 (B - F A B P , Fatty acid-binding protein, brain)
N° 8	G F A P _ _ H U M A N	グリア線維酸性タンパク質 (G F A P , Glial fibrillary acidic protein)
N° 9	C A H 2 _ _ H U M A N	カルボニックアンヒドラーゼ 2
N° 10	C E R U _ _ H U M A N	セルロプラスミン前駆物質
N° 11	D C D _ _ H U M A N	ダームシジン前駆物質
N° 12	D E F 1 _ _ H U M A N	好中球デフェンシン 1 前駆物質 (H N P - 1)

10

【 0 1 9 0 】

いくつかの実施形態では、パネル A、B、及び C は、拡大パネル A B C と呼ぶことができる、バイオマーカーの単一のまとまりのある群と見なすことができる。

【 0 1 9 1 】

定められたパネル A ~ C に加えて、バイオマーカータンパク質のより大きなパネルを、本発明の方法において使用することができる。

20

【 0 1 9 2 】

<p>ミエリン塩基性タンパク質[アイソフォーム3] <u>好中球デフェンシン1前駆物質</u> <u>パラレミン</u> <u>ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA</u> <u>ペルオキシレドキシシン-2</u> <u>ペルオキシレドキシシン-6</u> <u>ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1</u> <u>血漿レチノール結合タンパク質前駆物質</u> <u>プラスミノーゲン前駆物質</u> <u>血小板塩基性タンパク質前駆物質</u> <u>プロフィリン-1</u> <u>SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質</u> <u>チオレドキシシン</u> <u>ユビキチン</u></p>		<p>10</p> <p>20</p>
<p><u>アクアポリン-4</u> <u>コアクトシン様タンパク質</u> <u>シスタチン-B</u> <u>システイングリシンリッチタンパク質1</u> <u>ジアゼパム結合阻害剤、スプライス形態1c</u> <u>フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質</u> <u>グリア線維酸性タンパク質</u> <u>ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ</u> <u>キニノーゲン-1前駆物質</u> <u>リゾチームC前駆物質</u> <u>メタロチオネイン-2</u> <u>メタロチオネイン-3</u> <u>ミオグロビン</u> <u>N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1</u> <u>ニューロフィラメントミディウムポリペプチド</u> <u>ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA</u> <u>ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1</u> <u>プラスミノーゲン前駆物質</u></p>	<p>P v CT パネル1C</p>	<p>30</p> <p>40</p>

<u>血小板塩基性タンパク質前駆物質</u> <u>プロフィリン-1</u> プロトロンビン前駆物質 <u>SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ</u> <u>様タンパク質</u> スペクトリンベータ鎖、脳1 スタスミン <u>ユビキチン</u> ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラ ーゼアイソザイムL1	
---	--

10

【0193】

パネル1におけるマーカーの利点は、それらがすべて、罹患対象において増加するということである。言い換えれば、そのようなバイオマーカーのレベルの増加は、急性脳損傷の可能性の増加を示す。これは、陽性の検出を促進し、特定のバイオマーカーが対象において減少するという指標について間違えられる検出の技術的問題による偽陰性から生じる可能性のある問題をなくすのを助ける。特に、パネル1におけるマーカーは、前記ポリペプチドについての量比がそれぞれ1.3を超えるという利点を共有する。これは、実施例の部において証拠づけられる。これは、本発明による方法においてこのパネルから使用されるそれぞれのマーカーにおける統計的に有意な信頼度を提供するという利点を有する。

20

【0194】

パネル1はまた、それらの統計的に有意な発現の増加が検出される特定のタイプの分析によってマーカーのサブグループを定める。したがって、「さらなる詳細」のカラムにおける指定「IC対CT」、「IC対P」、及び「P対CT」は、マーカーの3つのさらなるサブグループを提供する。

パネル1A - 「IC対CT」

パネル1B - 「IC対P」

パネル1C - 「P対CT」

【0195】

パネル1はまた、1つを超えるタイプの分析において統計的に有意なレベルまで上昇すること分かっているマーカーのサブグループを定める。したがって、下線を引いて示す個々のバイオマーカーは、行われる3つのタイプの分析（「IC対CT」、「IC対P」、及び「P対CT」）のうちの少なくとも2つにおいて、罹患対象において高いレベルで生じることが示される。さらに、行われる3つのタイプの分析（「IC対CT」、「IC対P」、及び「P対CT」）の3つすべてにおいて、罹患対象において高いレベルで生じることが示される少数のマーカーがある。これらは、3つの処理において下線を引いたバイオマーカーを比較し、上記のパネル1におけるそれらの3つの処理のそれぞれにおいて生じるものに注目することによって容易に同定することができる。したがって、マーカーのさらに4つのサブグループが定められる（[パネル1D - 「IC対CT」及び「IC対P」]；[パネル1E「IC対CT」及び「P対CT」]；[パネル1F「IC対P」及び「P対CT」]；[パネル1G「IC対CT」及び「IC対P」及び「P対CT」]）。

30

40

【0196】

パネル1はまた、「X対CT」として記載することができるさらなるサブグループをも定め、ここでXは、P又はICである。言い換えれば、このサブグループは、IC対CT（パネル1A）又はP対CT（パネル1C）（又はその両方）にある任意のマーカーを含む。したがって、パネル1Hは、「いずれか対CT」として定められる。これは、対照と比較した、罹患試料において増加を示すすべてのマーカーを照らし合わせるという利点を有する。

【0197】

50

【表 2】

パネル2

アシルCoA結合タンパク質	アポリポタンパク質A-II前駆物質	アポリポタンパク質A-IV前駆物質	アクアポリン-4	
ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質	カルボニックアンヒドラーゼ2	キチナーゼ-3様タンパク質1前駆物質	コアクトシン様タンパク質	10
コフィリン-1	補体C4-A前駆物質	シスタチン-B	システイングリシンリッチタンパク質1	
ジアゼパム結合阻害剤、スプライス形態1c	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	フラビンレダクターゼ	ヘモグロビンサブユニットアルファ	
ヘテロ核リボヌクレオタンパク質G	ヒストンH1.2	ヒストンH1.5	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ	20
キナーゼ-1前駆物質	リゾチームC前駆物質	メタロチオネイン-2	メタロチオネイン-3	
ミエリン塩基性タンパク質[アイソフォーム3]	ミオグロビン	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド	
好中球デフェンシン1前駆物質	パラレミン	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA	ペルオキシレドキシニン-2	30
ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1	血漿レチノール結合タンパク質前駆物質	プラスミノーゲン前駆物質	血小板塩基性タンパク質前駆物質	
プロフィリン-1	プロトロンビン前駆物質	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	スタスミン	
チモシンベータ-10	チモシンベータ-4	トリオースリン酸イソメラーゼ	ユビキチン	40
ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL1				

【0198】

パネル2は、任意の種類脳損傷に対する、特に脳卒中などの急性脳損傷に対する関連を有することが初めて本明細書において開示されるバイオマーカーポリペプチドを示す。したがって、それらが脳損傷に関連して初めて開示されるのはパネル2の個々のマーカーの利点となる。

【 0 1 9 9 】

【表 3】

パネル2A

アシルCoA結合タンパク質	コアクトシン様タンパク質	シスタチン-B	システイングリシンリッチタンパク質1
フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	リゾチームC前駆物質	メタロチオネイン-3	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1
ニューロフィラメントミディアムポリペプチド	好中球デフェンシン1前駆物質	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1
プラスミノーゲン前駆物質	血小板塩基性タンパク質前駆物質	プロフィリン-1	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質
ユビキチン			

10

20

【 0 2 0 0 】

パネル 2 A バイオマーカーは、パネル 2 のサブグループであり、それらが、実施例の部において示される 3 つの微小透析研究 (I C : P、I C : C T、及び P : C T) のうちの少なくとも 2 つにおいて増加するというさらなる特性を有し、脳損傷の部位との関連を示唆する。

【 0 2 0 1 】

【表 4】

パネル2B

シスタチン-B	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1
---------	------------------	------------------------	-------------------------

30

【 0 2 0 2 】

パネル 2 B のバイオマーカーは、パネル 2 A のサブグループであり、それらが、実施例の部において示される 3 つの微小透析研究 (I C : P、I C : C T、及び P : C T) のそれぞれにおいて増加するというさらなる特性を有し、脳損傷の部位との密接な関連を示す。

40

【 0 2 0 3 】

多数のマーカーが、実施例の部など、本明細書において実証される。いくつかのマーカーは、データの表及び図面における 1 を超える患者 / 実験において強力な関連を示す。本明細書において 2 以上の患者 / 実験について関連を示すマーカーが好ましい。

【 0 2 0 4 】

メタロチオネイン - 1 E (M T 1 E _ H U M A N) に対する言及は、適切には、受託番号 P 0 4 7 3 2 の配列を有するタンパク質を指す。

50

【0205】

定義

用語「含む (comprises)」（含む (comprise)、含む (comprising)）は、当技術分野におけるその通常の意味を有する、つまり、明示される特徴又は特徴の群が含まれるが、用語が、いかなる他の明示される特徴又は特徴の群も、同様に存在することから除くわけではないことを理解されたい。

【0206】

以下の略語を本明細書において使用することができる：1-D PAGE、一次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動；CT、対側；CSF、脳脊髄液；ECF、細胞外液；ELISA、酵素結合免疫吸着アッセイ；GSTP1；グルタチオンS-トランスフェラーゼP；IC、梗塞中心部；HUG、Geneva University Hospitals；IEF、等電点電気泳動；LACB、 α -ラクトグロブリン；MALDI、マトリックス支援レーザー脱離イオン化；MCA、中大脳動脈；MS、質量分析；MS/MS、タンデム質量分析；PRDX、ペルオキシレドキシニン；P、ペナンブラ；RP-LC、逆相液体クロマトグラフィー；SAH、クモ膜下出血；S100B、タンパク質S100-B；TBI、外傷性脳障害；TMT、タンデム質量タグ；TMT2、2連TMT；TMT6、6連TMT；TOF/TOF、タンデム飛行時間。ms/msベースの定量的プロテオミクスを用いる脳卒中患者の脳微小透析液の調査が記載される。

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1】1-D PAGE（手製15% Tris-グリシゲル）を用いる分離及び銀染色後の研究下の微小透析試料のうち4つのゲル画像（つまりCTd、ICd、Pe、及びCTe）である。10 μ Lのそれぞれの微小透析液をゲル上にロードした。

【図2】CT微小透析液と比較した、ICにおけるGSTP1のレベルの増加についての免疫プロットによる検証を示す図である。プールした微小透析試料（n=3；つまりICa~c及びCTd~f；1.5 μ g）を、1-D PAGE（手製15% Tris-グリシゲル）を用いて分離した。組換えGSTP1（31.25ng）及び死後CSF（10 μ L）は、陽性対照として使用し、死前CSF（20 μ L）は、陰性対照として使用した。

【図3】対照及び脳卒中患者の血清における、タンパク質GSTP1（a）、PRDX1（b）、及びS100B（c）のELISA測定値を示す図である。

【図4】最終標準化ステップ前後のExp a~fについてのTMT2レポーターイオンの相対的存在量の分布を示す図である。基本的に、平行移動は、両方の分布の間の共通の面積が最大となる（つまり、両方の集団の間の定量的差異を最小限にする）ように、m/z = 126.1（赤色の分布）及び127.1（緑色の分布）でのレポーターイオンについての両方のデータについての相対的存在量に対して操作した。

【図5】Exp a~c及びExp fに関する微小透析試料の銀染色1-D PAGE画像を示す図である。10 μ Lのそれぞれの微小透析液を手製15% Tris-グリシゲル上にロードした。これらの画像は、TMT2ベースの定量的研究を設計するために使用した。

【図6】ヒト脳微小透析液のTMT2ベースの定量的実験を設定するためのカットオフ値の実験的評価を示す図である。製品において詳述される実験手順に従って、TMT6は、IC、P、及びCT微小透析液の同一の試料にタグを付けるために使用した。差異が同一の試料（例えば2つのIC試料）の間で予想されなかったため、1:1比からの偏りは、偽陽性に関して評価した。平均カットオフ値は、IC、P、及びCTの結果から平均した。1%FDRで対称的なカットオフ値を有するように、1.68及び0.59（0.61の代わりに）のカットオフ比を選ぶ必要があった。

【図7】MDにおけるいくつかのタンパク質のレベルの進行の棒グラフである。示される結果は、MSによって得られる比から進展を決定することができる、対応する表において報告されるタンパク質に相当する。

10

20

30

40

50

【図 8】MDにおけるPRDX1及びPRDX6のレベルの進展の棒グラフである；これらの傾向は、MSによって得られる比から決定した。

【図 9】脳卒中患者のヒト脳MDの分析に使用したプロテオミクス定量的ワークフローの略図である。

【図 10】IC及びPのMDを比較する場合に得られるタンデム質量スペクトル(a)及びTMTレポーターイオン面積をズームしたタンデム質量スペクトル(b)の例を示す図である。

【図 11】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるDENATLDGGDVLF TGRペプチド(DDAH1タンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【図 12】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるTPEEYPESAKペプチド(DDAH1タンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【図 13】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるSQVVAGTNYFIKペプチド(CYTBタンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【図 14】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるGYGYGQGAGT LSTDKペプチド(CSRP1タンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【図 15】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるGLESTTLADKペプチド(CSRP1タンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【図 16】トリプシンを用いて消化したヒト血漿におけるLYEQLSGKペプチド(PBEP1タンパク質)のiSRMクロマトグラムである。

【0208】

本発明は、ここでは、実施例として記載される。これらの例は、例証となるように意図され、添付の請求項を限定するようには意図されない。

[実施例]

【0209】

実施例の要約

脳卒中患者のインビボヒト大脳微小透析体液は、脳血管障害に関連する、可能性のあるタンパク質バイオマーカーの発見のために調査した。虚血発作を患っている患者の梗塞中心部(IC)、ペナンブラ(P)、及び無影響の対側(CT)脳領域からの微小透析液は、ショットガンプロテオミクスアプローチを使用して質的量的に比較した。タンパク質量における変化は、いくつかのケースにおいて評価した；例えばIC対P(n=2)、IC対CT(n=2)、及びP対CT(n=2)。タンデム質量タグ(TMT)は、還元、アルキル化、及びトリプシンを用いる消化後に微小透析体液の内容物を標識するために使用した。TMT標識後、プールした試料は、オフゲル電気泳動を用いて分画し、結果として生じる画分は、RP-LC MALDI TOF/TOFを用いて分析した。156のタンパク質が、全脳微小透析液において同定された。MS/MS定量分析は、P及びCT試料と比較して、ICにおいて量が増加した43のタンパク質を示した。26のタンパク質が、CTと比較してPにおいて増加した。グルタチオンS-トランスフェラーゼP(GSTP1)、ペルオキシレドキシニン-1(PRDX1)、及びタンパク質S100-B(S100B)の変化は、プールした微小透析試料に対する免疫プロット及び/又は無関係な対照及び脳卒中患者(n=28)の血液に対するELISAを用いて検証した。結論として、ヒト脳微小透析のプロテオミクス定量的データ及び脳卒中患者由来の血液試料に対する初期の検証の間の相関は、本明細書において記載される方法及びバイオマーカーパネルの価値を実証する。

【0210】

実験手順：

材料

ウシ乳由来の -ラクトグロブリン(LACB)(約90%)、ブタ膵臓由来のトリプシン、ヨードアセトアミド(IAA、99%以上)、組換えGSTP1(ヒト由来、大腸菌において発現)、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド(TCEP) 0.5M、及び -シアノ4-ヒドロキシケイ皮酸は、Sigma社(S t . L

10

20

30

40

50

ouis、MO、USA)から購入した。トリエチルアンモニウム炭酸水素バッファー (TEAB) 1M pH = 8.5、ドデシル硫酸ナトリウム (SDS、98%以上)、及びトリフルオロ酢酸 (TFA、99.5%以上)は、Fluka社 (Buchs, Switzerland)からのものであった。H₂O中ヒドロキシルアミン溶液50重量% (99.999%)は、Aldrich社 (Milwaukee, WI, USA)からのものであった。塩酸 (25%)及びリン酸二水素アンモニウム ((NH₄)(H₂PO₄)は、Merck社 (Darmstadt, Germany)からのものであった。クロマトグラフィーLiChrosolv (登録商標)用の水及びHPLC用のアセトニトリルChromasolv (登録商標) (99.9%)は、それぞれ、Merck社及びSigma-Aldrich社 (Buchs, Switzerland)からのものであった。2連及び6連TMT (TMT2及びTMT6)は、Proteome Sciences社 (Frankfurt am Main, Germany)によって提供された。Oasis (登録商標) HLB 1cc (10及び30mg)抽出カートリッジは、Waters社 (Milford, MA, USA)からのものであった。Immobiline (商標) DryStryp pH 3~10、13cm及びIPGバッファーpH 3~10は、GE Healthcare社 (Uppsala, Sweden)からのものであった。グリセロール50%及び鉱油は、Agilent Technologies社 (Wilmington, DE, USA)からのものであった。

10

【0211】

試料採取

微小透析液

中大脳動脈 (MCA) 領域における重症の、いわゆる悪性の梗塞を有する患者は、減圧開頭術と低体温麻酔療法 (induced moderate hypothermia) (32.5) を組み合わせる施設内のプロトコルに従って、Vall d'Hebron University HospitalのNeurointensive Care Unitにおいて治療した。6人の悪性MCA梗塞患者が、含まれた (平均年齢50 ± 9.3歳; 悪性MCA梗塞の側: 2人左、4人右; 性別: 4人女性、2人男性)。

20

【0212】

悪性MCA梗塞患者は、異なる脳領域 (CT、P、及びIC) に挿入した高カットオフ (100kDa) 大脳微小透析カテーテル (CMA-71、CMA Microdialysis社、Stockholm, Sweden) を用いてモニターした。コンピューター断層撮影は、脳微小透析カテーテルの位置を確認するために使用した。微小透析液試料は、CMA 106 micropump (CMA microdialysis社) を使用することによって人工CSF溶液 (つまりNaCl 147mM、KCl 2.7mM、CaCl₂ 1.2mM、及びMgCl₂ 0.85mM) を用いる灌流後に5日間、1時間ごとに得た。

30

【0213】

- 80 での凍結及び保存前に、微小透析試料におけるグルコース、乳酸、ピルビン酸、及びグリセロール/グルタミン酸/尿素濃度のためのルーチン分析は、CMA600 analyser (CMA microdialysis社) を用いて実行した。プロテオミクス分析は、脳モニタリングの最初の24時間の間に得たプールした脳微小透析液について実行した。表1は患者、試料採取した様々な脳領域、及び使用した実験標識を要約する。

【0214】

【表5】

表1.研究下の脳微小透析試料の概要

実験	患者	梗塞中心部 (IC)	ペナンプラ(P)	対側(CT)
Exp _a	患者a	IC _a	P _a	
Exp _b	患者b	IC _b	P _b	
Exp _c	患者c	IC _c		CT _c
Exp _d	患者d	IC _d		CT _d
Exp _e	患者e		P _e	CT _e
Exp _f	患者f		P _f	CT _f

10

【0215】

CSF試料

死亡患者及び生きている患者の死前及び死後CSFの採取及び臨床データは、以前に報告されている(Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C. G., Burgess, J. A., Hughes-Frutiger, S., Burkhard, P. R., Sanchez, J. C., and Hochstrasser, D. F. (2004) Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. Proteomics 4, 2234-2241)。手短に言えば、対照の死前CSF試料は、生きている健康な患者からルーチン的な診断用腰椎穿刺によって採取した。死後CSF試料は、死体解剖での脳室穿刺によって採取した。

20

【0216】

血液試料

対照及び脳卒中患者の血液試料は、Geneva University Hospitals (HUG)で2005年10月～2008年1月に採取した。この期間に、HUGに入院していた急性又は亜急性脳卒中の明白な症状及び徴候を示したすべての患者を、研究に登録した。除外基準は、以下のように定めた：(1)発病期間が3日間を上回る又は前3か月間における以前の脳卒中後に生じる脳卒中；(2)SAH、硬膜下血腫、又は外傷性脳障害(TBI)などの脳外出血又は傷害；(3)癌、腎又は肝不全、心筋梗塞、及び精神状態などの他の可能性として混同する病態の存在。研究において含まれる患者はそれぞれ、臨床及び神経放射線学アセスメントの標準化プロトコル並びにHUGのDepartment of Neurologyからの熟練した神経科医によって管理される治療的介入を受けた。

30

【0217】

対照は、患者の家族親戚として、様々なタイプの医学的及び外科的状态又はさらに非脳血管性神経学的状態に罹患している患者として定めた。彼らは、脳卒中、脳血管疾患、又は血栓疾患の過去及び現在の病歴を有しないことが必要とされる。

【0218】

血液試料は、SOP Internal Working Groupによって記載される標準操作手順(SOP, Standard Operating Procedures)に従って採取した(Tuck, M. K., Chan, D. W., Chia, D., Godwin, A. K., Grizzle, W. E., Krueger, K. E., Rom, W., Sanda, M., Sorbara, L., Stass, S., Wang, W., and Brenner, D. E. (2009) Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. J Proteome Res 8, 113-117)。手短に言えば、血液試料は、赤色栓血液採取チューブに得(シリカコーティングチューブ、6mL、13*100mm、ref 368815、BD vacutainers、Plymouth、UK)、血餅を形成させるために45分間、室温で保存した。添加剤(抗凝固剤、プロテアーゼ阻害剤、又は保存剤)は使用しなかった。凝固時間の終わりに、試料は、遠心分離機にかけ(室温で10分間、1000xg)、細胞ペレットを廃棄した。直後に、血清試料はそれぞれ、等分し、使用まで-80で保存した。本明細書で報告される研究については、年齢及び性別が一致する14人の対照及び14人の脳卒中患

40

50

者は、採取したすべての参加者の間でランダムに選択した。表2は、脳卒中患者及び対照の特徴を要約する。

【0219】

【表6】

表2.研究集団の全般的な特徴(血液試料)

	対照	脳卒中
n	14	14
年齢(歳)		
平均±標準偏差	69.3±14.5	69.5±15.6
中央値(最小-最大)	72.5 (40-88)	72.0 (39-89)
性別		
女性 n(%)	5 (25.7)	5 (25.7)
男性 n(%)	9 (64.3)	9 (64.3)
症状の発現時間(分)		
平均±標準偏差		486.1±542.8
中央値(最小-最大)		150 (90-1440)

10

【0220】

20

地域の倫理委員会は、これらの研究を承認し、承諾書は、ヘルシンキ宣言に従って患者(又は親戚)から得た。

【0221】

S D S P A G E

10 μ Lの脳微小透析液は、手製15% Tris - グリシゲル(8×7×0.1cm)上で一次元(1-D)SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を用いて分離した。20 μ Lの死前及び死後CSF試料(172及び359 μ g・mL-1のそれぞれの濃度は、Bradford社のアッセイを用いて決定した(Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254))もロードし、対照として使用した。ゲルは、硝酸銀を用いて染色した(Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis 8, 93-99)。ゲル画像は、ImageQuant TL software(GE Healthcare社)を用いて分析した。それぞれのレーンのシグナルは、統合し、同じゲル上で得られた他のレーンシグナルと比較して相対的に定量化した。

30

【0222】

還元、アルキル化、消化、及びTMT標識

微小透析試料の適切な容量は、それぞれの定量的実験(つまり表1におけるExp a ~ f)において等タンパク質量(つまり重量)を比較するために1-D PAGE分析に従って採取した。LACBは、予想タンパク質量(つまり重量)の1/50でそれぞれの試料対に同量でスパイクした。6×2試料を乾燥させた。

40

【0223】

試料は、希釈HClを用いてpH=8に調整した、100 μ LのTEAB 100mM中に溶解した。1 μ LのSDS 1%及び2 μ L TCEP 50mMをそれぞれのチューブに添加した。還元は、1時間、60 で実行した。アルキル化は、暗中で、30分間、実行した(1 μ LのIAA 400mMの添加)。TEAB溶液中で新たに調製した10 μ Lトリプシン0.2 μ g・ μ L-1を添加した。消化は、37 で一晩実行した。

【0224】

TMT2標識は、CH3CN中40.3 μ LのTMT2試薬(つまり0.83mg、2.42×10⁻⁶モル)の添加後に1時間で達成された。タグは、表3において記載されるよう

50

に使用した。

【0225】

【表7】

表3.TMT²実験の概要

実験	レポーター1 26.1	レポーター1 27.1	LACB (レポーター126.1) ⁵	LACB (レポーター127.1) ⁵
Exp _a	P _a	IC _a	0.58±0.04	0.42±0.04
Exp _b	IC _b	P _b	0.45±0.07	0.55±0.07
Exp _c	CT _c	IC _c	0.51±0.07	0.49±0.07
Exp _d	IC _d	CT _d	0.45±0.06	0.55±0.06
Exp _e	CT _e	P _e	0.54±0.04	0.46±0.04
Exp _f	P _f	CT _f	0.47±0.08	0.53±0.08

⁵標準化した平均存在量;同位体による補正を行った。これらのデータは、操作による偏りを低下させるための続く標準化のために使用した。

【0226】

標識に対するペプチドの量は、様々な利用可能なタンパク質量のために、微小透析液試料の対によって変動した。これらの量は、使用した微小透析液容量に従って、1.5~27 μgに及ぶことが推定され、推定濃度は、死前CSFと比較して決定した(上記を参照されたい)。8 μLのヒドロキシルアミン5%を15分間の反応に添加した。差次的にTMT2標識した試料は、新しいチューブ中にプールした。プールした試料は、乾燥させた。TMT6実験は、同じプロトコルを用いて実行した。

【0227】

オフゲル電気泳動

試料は、Oasis(登録商標)HLB 1cc(30mg)抽出カートリッジを用いて脱塩した。乾燥後、試料は、172.8 μLグリセロール50%及び10.8 μLの担体両性電解質IPGバッファーpH3~10と共に1616.4 μL H₂O中に溶解した。IPGストリップ(pH3~10、13cm)は、オフゲルトレー上に構築し、89.8% H₂O、9.6%グリセロール50%、及び0.6%の担体両性電解質の溶液を用いて30分間、再水和した。試料は、12のオフゲルウェル上にロードした。等電点電気泳動(IEF, isoelectric focusing)分離は、電圧を500Vに保持する前に50 μAの限界電流及び20 kV·h限界と共に3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies)を使用して実行した。画分は、採取し、それらのpHを測定した(Metrohm社(Herissau, Switzerland)からの744 pH Meter及びBiotrode)。画分は、乾燥させ、Oasis(登録商標)HLB 1cc(10mg)抽出カートリッジを用いてきれいにし、再び乾燥させた。

【0228】

RP-LC MALDI TOF/TOF

マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)タンデム飛行時間(TOF/TOF)MSは、Applied Biosystems社(Foster City, CA, USA)からの4800 Proteomics Analyzerで実行した。オフゲル画分は、フロースプリッターを装備したWaters社からのAlliance systemを使用して、逆相液体クロマトグラフィー(RP-LC)を用いて最初に分離した。自社製の(home-packed)5 μm 200 Magic C18 AQ 0.1×100 mmカラムを使用した。分離は、H₂O/CH₃CN/TFA 97%/3%/0.1%(溶媒A)及びH₂O/CH₃CN/TFA 5%/95%/0.1%(溶媒B)の勾配を使用して、60分間実行した。勾配は、以下のように実行した: 400 nL·min⁻¹と推定される流速で0~10分、98%A及び2%B、次いで、1

10

20

30

40

50

2分で90% A及び10% B、55分で50% A及び50% B、60分で98% B。1分間の画分は、手製LCロボットを使用して、MALDIプレート上に置いた。次いで、マトリックス(10mM NH₄H₂PO₄を有するH₂O/CH₃CN/TFA 50%/50%/0.1%中-シアノ4-ヒドロキシケイ皮酸)は、プレート上にスポットした。質量スペクトルはすべて、800~4000のm/zスキャン範囲により陽性イオン化モードにおいて得た(4000 a.u.のレーザー強度による1000回の発射)。最大で20の最も強度の前駆物質を選択した後に、MS/MS実験(4500 a.u.のレーザー強度による1500回の発射)は、中程度の衝突エネルギーで実行した。

【0229】

タンパク質同定及び定量化

ピークリストは、Applied Biosystems社からの4000 Series Explorer softwareを使用して生成した。それぞれの試料について、12オフゲル画分の分析から結果として生じるmgfファイルを組み合わせ、Phenyx 2.6(GeneBio、Geneva、Switzerland)を使用して、UniProt-Swiss-Prot/TrEMBLデータベース(12.6_04-Dec-2007、5610855のタンパク質エントリー)に対して検索した。ホモサピエンスタクソノミー(93005タンパク質エントリー)(これとは別に、スパイクしたLACBを探索するためのウシ(Bos taurus)(17268タンパク質エントリー))をデータベース検索のために指定した。可変アミノ酸修飾(variable amino acid modification)は、酸化メチオニンであった。

【0230】

TMT2標識ペプチドアミノ末端及びTMT2標識リシン(+225.1558 Da)は、システインのカルバミドメチル化(carbamidomethylation)と同様に固定修飾(fixed modification)として設定した。TMT6を使用する場合、+229.1629 Daの質量インクリメントは、TMT6標識ペプチドアミノ末端及びTMT6標識リシンについて特定された。トリプシンは、1の切断もれ(missed cleavage)の可能性と共に、酵素として選択し、通常の切断モード(cleavage mode)を使用した。1回の検索ラウンドのみを「ターボ」スコアリングの選択と共に使用した。ペプチドp値は、すべての実行について1E-6であった。AC及びペプチドスコアは、ペプチド偽ペプチド発見率を1%未満にペプチドを制御するために設定した(スコアは7.0~7.5まで変動した)。親イオン許容差は、1.1 Daとした。2つの異なるペプチド配列に一致するタンパク質のみを選択し、専用のPhenyxエクスポートを使用してexcelファイルに抽出した。さらなるフィルターを適用した。2つの異なる固有のペプチドにより同定されたタンパク質のみを最終的に保存した。質量スペクトルがいくつかのペプチド配列に帰した場合、一致したペプチドはすべて、除去した。

【0231】

レポーターイオンの面積は、4000 Series Explorer softwareの分析ツールを使用してタンデム質量スペクトルから抽出した。定量化は、タンパク質に特有であったペプチドのみにより実行した。異なる配列を有する少なくとも2つのペプチドがタンパク質を定量化するために必要であった。データの処理は、既に記載されているように実行した(Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. Anal. Chem. 80, 2921-2931)。処理は、スパイクしたLACB標準物質を用いる同位体補正及び標準化を含んだ。それぞれのペプチドについては、それぞれのレポーターイオンの相対的存在量は、すべてのレポーターイオン存在量の合計によるレポーターイオン存在量の比として計算した。次いで、タンパク質比は、Trans-Proteomic Pipelineにおいて使用されるLibra moduleに従って、それらのペプチド相対的存在量(それぞれのレポーターイオンチャンネルに対応する)の単純平均の比として計算した。最終的な標準化ステップは、ほとんどのペプチドが比較した試料中で同量であることを仮定して実行した、つまり、両方のTMT2標識群の相対的存在量度数分布の間の共通の面積は、最大となる必要があった(図4に示す)。標

10

20

30

40

50

準化係数は、全レポーターイオンデータセット全体について（つまり、ペプチドがあらゆる配列に一致しなかった場合でさえ）得た。

【0232】

定量的カットオフ値は、以前に記載されるプロトコールにより分析した同一の微小透析試料の比較によって決定した。基本的に、TMT6試薬は、IC、P、及びCT微小透析液の同一の試料にタグを付けるために使用した。差異が同一の試料（例えば2つのIC試料）の間で予想されなかったので、1:1比からの偏りは、偽陽性として見なした。それぞれのTMTチャンネルにおいて提供される相対的存在量は、ランダムに混合した。次いで、比は、同一の試料の間で計算し、相乗平均は、10の比のデータポイントのクラスターから得た。次いで、これらの平均比は、所与の偽陽性率でカットオフ値を評価するために使用した。最終的なカットオフ値は、IC、P、及びCTの結果から平均した。

10

【0233】

プールしたIC及びCT微小透析液の免疫プロット分析

1.5 µgのプールしたIC (n = 3; つまりICa ~ c) 及び1.5 µgのプールしたCT微小透析液 (n = 3; つまりCTd ~ f) は、1-D SDS PAGEにより分離した。20 µLの死前CSF、10 µLの死後CSF、及び31.25 ngの組換えGSTP1もまた、分離した。分離されたタンパク質は、(Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 4350-4354) によって記載されるように、ニトロセルロース膜上にエレクトロプロットした。膜は、ブロッキングのために5%ミルク-PBS-Tween 0.05%と共に1時間インキュベートした。免疫検出は、1%ミルク-PBS-Tween 0.05%中で1/2000に希釈した抗ヒトGSTPウサギポリクローナル抗体 (MBL International Corp.社、Woburn, MA, USA) により実行した。数回の洗浄ステップ後に、適切な二次抗体HRP (Dako社、Glostrup, Denmark) を、1/2000で1時間インキュベートした。ECL plus Western Blotting detection system Kit (GE Healthcare社) を検出に使用した。膜は、Typhoon 9400 (GE Healthcare社) により最終的にスキャンした。

20

【0234】

E L I S A

S100B及びPRDX1は、メーカーの推奨に従って、それぞれ、Abnova Corp.社 (Taipei city, Taiwan) 及びBiovendor GmbH社 (Heidelberg, Germany) からの市販の酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) キットを使用して検証した。GSTP1に関して、市販のアッセイが現在入手可能でないので、以前に記載される (Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. J. Proteome Res. 5, 1674-1681, Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D. M., Matovu, E., Enyaru, J. C., Fouda, C., Ndung'u, J. M., Lisacek, F., Muller, M., Turck, N., and Sanchez, J. C. (2009) A Combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP Panel for the Staging of Human African Trypanosomiasis Patients. PLoS Neglected Tropical Diseases 3, e459) ように、サンドイッチアッセイを社内で開発し、使用した。統計分析及び図は、GraphPad Prism software (version 4.03, GraphPad software Inc.社、San Diego, CA, USA) を使用して実行した。

30

40

【実施例1】

【0235】

微小透析分析

タンデム質量タグ (TMT) (Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative qua

50

ntification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. Anal. Chem. 80, 2921-2931, Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., and Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. Anal. Chem. 75, 1895-1904) は、虚血発作患者の脳微小透析試料を比較するために本明細書において使用した。TMTは、アイソバリック標識のセットを含む。これらのアイソバリック標識は、同じ質量合計を示すが、衝突解離による活性化及び続くタンデム質量分析 (MS/MS) 後に異なる質量でレポーターイオンを提供する重い同位体及び軽い同位体により合成される。レポーターイオン存在量は、TMTの異なるバージョンにより標識したペプチドの相対的定量化を実行するために使用され、ひいては、相対的タンパク質量を決定する。

10

【0236】

脳卒中を患っている患者の梗塞中心部 (IC)、ペナンプラ (P)、及び対側 (CT) 脳領域からの試料を調査した。このプロテオミクス研究は、P及びCT微小透析液と比較して、ICにおいて量が増加した43のタンパク質を目立たせた。26のタンパク質は、CT試料と比較して、Pにおいて増加した。候補マーカーとして、グルタチオンS-トランスフェラーゼP (GSTP1)、ペルオキシレドキシシン-1 (PRDX1)、及びS100Bは、脳卒中の症例においてそれらのレベルの増加を最終的に確認した、脳卒中患者の微小透析試料及び/又は血液に対するイムノアッセイによりさらに評価した。

20

【0237】

ヒト脳微小透析液は、6人の脳卒中患者の2つの脳領域から対で試料採取した。m/z = 126.1及び127.1でのレポーターイオンと共に、TMT2による6つの定量的MS/MSベースの比較は、実験E x p a ~ fにおいて実行した(表3)。

【0238】

IC、P、及びCT微小透析試料の濃度

図1に、1-D PAGEにより分離した脳微小透析液ICd、CTd、Pe、及びCTeを示す(他の試料の1-D PAGE画像は、図5に示す)。10µLの微小透析液中のタンパク質量は、試料ごとに不均一であった。

【0239】

TMTベースの実験についての定量的カットオフの決定

TMT2実験についてのタンパク質量における有意な増加及び減少を反映する定量的カットオフは、実験的に評価した(図6に示す)。TMT6は、実験手順において詳述されるTMT2実験について使用した同じプロトコールに従って、IC、P、及びCT微小透析液の2つの同一の試料を標識するために使用した(つまり還元、アルキル化、消化、特異なTMT6標識、オフゲル電気泳動(Horth, P., Miller, C. A., Preckel, T., and Wenz, C. (2006) Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. Mol. Cell. Proteomics 5, 1968-1974, Ros, A., Faupeil, M., Mees, H., van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., and Girault, H. H. (2002) Protein purification by Off-Gel electrophoresis. Proteomics 2, 151-156)、RP-LC MS/MS、同定、及び定量化)。定量的データのランダムな混合の後に、所与のカットオフでの偽陽性率を評価した。例えば、偽陽性の1%は、1.68及び0.59のカットオフ比で見出された(実験手順を参照されたい、また図6に示す)。最終的に、0.5及び2.0のカットオフ値を選んだ。これらの値は、実際に実験的に評価したカットオフと比較してより大きな間隔に相当し、偽陽性を見出すためにさらなる危険性を減少させた。さらに、免疫プロットを用いる検証中にそのような差異を評価することができた。

30

40

【0240】

定性的及び定量的MS分析

タンパク質試料は、還元し、アルキル化し、トリプシンにより消化し、結果として生じるペプチドは、表3において報告されるようにTMT2により標識した。オフゲル電気泳

50

動を実行した。12の採取したオフゲル画分は、RP-LC MALDI TOF/TOF MSを用いて分析した。定量的ワークフローは、以前に特徴づけられている (Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. Anal. Chem. 80, 2921-2931; Dayon, L., Turck, N., Kienle, S., Schulz-Knappe, P., Hochstrasser, D. F., Scherl, A., and Sanchez, J. C. (2010) Isobaric tagging-based selection and quantitation of cerebrospinal fluid tryptic peptides with reporter calibration curves. Anal. Chem., DOI 10.1021/ac901854k)。定量的データの品質管理は、スパイクしたLACBタンパク質標準物質により評価した(表3)。12.1%及び17.0%(Expf)の平均及び最大相対的標準偏差は、アイソパリックタギング技術性能と相関した(表3)(Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. Anal. Chem. 80, 2921-2931)。

10

【0241】

これらのプロテオミクス分析から、156のタンパク質が、939の固有のペプチドと共に同定された。より正確に、108のタンパク質が、ICにおいて同定され、137が、Pにおいて、134が、CT微小透析液において同定された。

20

【0242】

TMT2を用いて実行した6つの比較は、94のタンパク質を示し、これらは、比較した試料の対内で増加した(比が2.0を超える; 53のタンパク質)又は減少した(比が0.5未満; 47のタンパク質)(表3)。要約すると、25のタンパク質は、P試料と比較してICにおいて増加し、24のタンパク質は、CT試料と比較してICにおいて増加し、26のタンパク質は、CT試料と比較してPにおいて増加した(表7~9)。それぞれの脳領域の間の調節性タンパク質の全リストを表4~6に提供する。

【0243】

【表8】

表4:ペナンブラと比べた梗塞中心部における調節性タンパク質のリスト。比が1を超える、ICにおいて増加;比が1未満、ICにおいて減少

30

Nr.	データバンク	AC	ID	MW	PI	固有のペプチドの数	説明	相関的比 IC/P
29	uniprotKB_sptr	P07108	ACBP_HUMAN	11,793.38	5.71	5	アシルCoA結合タンパク質(ACBP)(ジアゼパム結合阻害剤)(DBI,Diazepam-binding inhibitor)(エンドゼピン)(EP, Endozepine)	1.95
32	uniprotKB_sptr	P07108	ACBP_HUMAN	11,793.38	5.71	5	アシルCoA結合タンパク質(ACBP)(ジアゼパム結合阻害剤)(DBI)(エンドゼピン)(EP)	2.67
20	uniprotKB_sptr	P02763	A1AG1_HUMAN	23,539.62	5.12	4	アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質(AGP 1,Alpha-1-acid glycoprotein 1)(オロソムコイド-1)(OMD 1,Orosomucoid-1)	0.48
25	uniprotKB_sptr	P02763	A1AG1_HUMAN	21,560.13	5.10	3	アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質(AGP 1)(オロソムコイド-1)(OMD 1)	0.47
13	uniprotKB_sptr	P01009_C HAIN_0	A1AT_HUMAN	44,324.56	5.44	8	アルファ1アンチトリプシン前駆物質(アルファ-1プロテアーゼ阻害剤)(アルファ-1-抗プロテイナーゼ)[CHAIN0]	0.61
30	uniprotKB_sptr	P01009_C HAIN_0	A1AT_HUMAN	44,324.56	5.44	5	アルファ1アンチトリプシン前駆物質(アルファ-1プロテアーゼ阻害剤)(アルファ-1-抗プロテイナーゼ)[CHAIN0]	0.40
74	uniprotKB_sptr	P04217	A1BG_HUMAN	51,940.72	5.72	2	アルファ1B糖タンパク質前駆物質(アルファ-1-B糖タンパク質)	0.46
71	uniprotKB_sptr	P02765_C HAIN_0	FETUA_HUMAN	30,221.95	4.57	2	アルファ-2-HS糖タンパク質前駆物質(フェチュインA)(アルファ-2-Zグロブリン)(Ba-アルファ-2-糖タンパク質)[アルファ-2-HS糖タンパク質鎖A;アルファ-2-HS糖タンパク質鎖Bを含有][CHAIN0]	1.07
8	uniprotKB_sptr	P01023	A2MG_HUMAN	160,796.89	5.98	11	アルファ-2-マクログロブリン前駆物質(アルファ-2-M)	0.90
6	uniprotKB_sptr	P01023	A2MG_HUMAN	160,796.89	5.98	16	アルファ-2-マクログロブリン前駆物質(アルファ-2-M)	0.69
47	uniprotKB_sptr	P02647	APOA1_HUMAN	30,777.84	5.68	3	アポリポタンパク質A-I前駆物質(Apo-AI,Apolipoprotein A-I)(ApoA-I)[アポリポタンパク質A-I(1~242)を含有]	1.41
8	uniprotKB_sptr	P02647_C HAIN_0	APOA1_HUMAN	27,950.50	5.36	12	アポリポタンパク質A-I前駆物質(Apo-AI)(ApoA-I)[アポリポタンパク質A-I(1~242)を含有] [CHAIN 0]	0.79

40

31	uniprotKB_sptr	P02652	APOA2_HUMAN	8,579.77	5.39	4	アポリポタンパク質A-II前駆物質(Apo-AII,Apolipoprotein A-II)(Apo A-II)[アポリポタンパク質A-II(1~76)を含有]	1.03
38	uniprotKB_sptr	P61769	B2MG_HUMAN	11,731.17	6.46	3	ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質[ベータ-2-ミクログロブリン形態pl 5.3を含有]。	1.49
65	uniprotKB_sptr	P61769	B2MG_HUMAN	11,731.17	6.46	2	ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質[ベータ-2-ミクログロブリン形態pl 5.3を含有]。	2.09
66	uniprotKB_sptr	P62158	CALM_HUMAN	16,706.39	4.12	2	カルモジュリン(CaM,Calmodulin)	1.53
59	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28,870.21	6.83	2	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラターゼI)(CA-I)	0.45
38	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28,739.02	6.92	4	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラターゼI)(CA-I)	1.60
42	uniprotKB_sptr	P00918	CAH2_HUMAN	29,246.06	7.22	4	カルボニックアンヒドラーゼ2(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼII)(カルボネートデヒドラターゼII)(CA-II)(カルボニックアンヒドラーゼC)	1.89
67	uniprotKB_sptr	P13987	CD59_HUMAN	8,961.10	5.70	2	CD59糖タンパク質前駆物質(膜攻撃複合体阻害因子)(MACIF,Membrane attack complex inhibition factor)(MAC阻害性タンパク質)(MAC-I P,MAC-inhibitory protein)(プロテクティン)(MEM43抗原)(反応性溶解の膜抑制因子)(MIRL,Membrane inhibitor of reactive lysis)(20kDaホモログス制限因子)(HRF-20,20 kDa homologous restriction factor)(HRF20)(1F5抗原)	1.50
29	uniprotKB_sptr	P00450	CERU_HUMAN	122,205.23	5.46	5	セルロプラスミン前駆物質(EC 1.16.3.1)(フェロキシダーゼ)	0.44
11	uniprotKB_sptr	P36222	CH3L1_HUMAN	40,488.87	8.80	8	キチナーゼ-3様タンパク質1前駆物質(軟骨糖タンパク質39)(GP-39)(39kDa滑膜タンパク質)(HCgp-39)(YKL-40)	0.66
54	uniprotKB_sptr	P36222	CH3L1_HUMAN	40,488.87	8.80	3	キチナーゼ-3様タンパク質1前駆物質(軟骨糖タンパク質39)(GP-39)(39kDa滑膜タンパク質)(HCgp-39)(YKL-40)	1.31
70	uniprotKB_sptr	Q14019	COTL1_HUMAN	15,944.98	5.86	2	コアクトシン様タンパク質	1.72
73	uniprotKB_sptr	Q14019	COTL1_HUMAN	15,944.98	5.86	2	コアクトシン様タンパク質	2.04
17	uniprotKB_sptr	P02452	CO1A1_HUMAN	94,766.11	9.36	7	コラーゲンアルファ-1(I)鎖前駆物質(アルファ-1 I型コラーゲン)	1.71
37	uniprotKB_sptr	P08123	CO1A2_HUMAN	91,754.77	10.10	3	コラーゲンアルファ-2(I)鎖前駆物質(アルファ-2 I型コラーゲン)	1.97

10

20

19	uniprotKB_sptr	P01024	CO3_HUMAN	187,148.13	6.05	6	補体C3前駆物質[:補体C3ベータ鎖;補体C3アルファ鎖;C3aアナフィラトキシン;補体C3bアルファ鎖;補体C3cアルファ鎖断片1;補体C3dg断片;補体C3g断片;補体C3d断片;補体C3f断片;補体C3cアルファ鎖断片2を含有]	1.45
3	uniprotKB_sptr	P01024_C HAIN_0	CO3_HUMAN	184,951.41	6.04	24	補体C3前駆物質[:補体C3ベータ鎖;補体C3アルファ鎖;C3aアナフィラトキシン;補体C3bアルファ鎖;補体C3cアルファ鎖断片1;補体C3dg断片;補体C3g断片;補体C3d断片;補体C3f断片;補体C3cアルファ鎖断片2を含有][CHAIN0]	0.74
40	uniprotKB_sptr	P0C0L4	CO4A_HUMAN	84,183.35	5.38	3	補体C4-A前駆物質(酸性補体C4)[補体C4ベータ鎖;補体C4-Aアルファ鎖;C4aアナフィラトキシン;C4b-A;C4d-A;補体C4ガンマ鎖を含有]	2.50
24	uniprotKB_sptr	P0C0L4	CO4A_HUMAN	192,742.53	6.72	6	補体C4-A前駆物質(酸性補体C4)[補体C4ベータ鎖;補体C4-Aアルファ鎖;C4aアナフィラトキシン;C4b-A;C4d-A;補体C4ガンマ鎖を含有]	1.10
53	uniprotKB_sptr	P08603	CFAH_HUMAN	137,052.63	6.17	3	補体因子H前駆物質(H因子1)	0.59
60	uniprotKB_sptr	P04080	CYTB_HUMAN	11,139.59	7.91	2	シスタチン-B(ステフィン-B)(肝臓チオールプロテイナーゼ阻害剤)(CPI-B)	2.68
22	uniprotKB_sptr	P01034	CYTC_HUMAN	15,799.22	9.21	4	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン)	1.73
62	uniprotKB_sptr	P01034	CYTC_HUMAN	15,799.22	9.21	2	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン)	1.86
48	uniprotKB_sptr	P21291	CSRP1_HUMAN	20,436.21	8.99	2	システイングリシンリッチタンパク質1(システインリッチタンパク質1)(CRP1)(CRP)	3.33
57	uniprotKB_sptr	P21291	CSRP1_HUMAN	20,372.30	9.39	2	システイングリシンリッチタンパク質1(システインリッチタンパク質1)(CRP1)(CRP)	2.88
58	uniprotKB_sptr	O15540	FABPB_HUMAN	14,888.91	5.70	2	脂肪酸結合タンパク質、脳(B-FABP)(脳脂質結合タンパク質)(BLBP)(乳房由来成長抑制物質関連)	2.65
12	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94,973.07	5.75	7	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	2.97
4	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94,973.07	5.75	20	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	0.61
13	uniprotKB_sptr	P02675	FIBB_HUMAN	55,928.17	8.64	8	フィブリノゲンベータ鎖前駆物質[フィブリノペプチドBを含有]	0.46
27	uniprotKB_sptr	P02679	FIBG_HUMAN	49,496.55	5.81	6	フィブリノゲンガンマ鎖前駆物質	0.41
37	uniprotKB_sptr	P14136	GFAP_HUMAN	49,880.22	5.47	3	グリア線維酸性タンパク質(GFAP)	1.76

30

40

63	uniprotKB_sptr	P09211	GSTP1_HUMAN	23,355.84	5.72	2	グルタチオンS-トランスフェラーゼP(EC 2.5.1.18)(GSTクラスpi)(GSTP1-1)	2.79
7	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	43,349.02	6.25	12	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖を含有]	0.46
5	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	45,205.32	6.24	16	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖を含有]	0.36
31	uniprotKB_sptr	P69905	HBA_HUMAN	15,126.36	9.07	4	ヘモグロビンサブユニットアルファ(ヘモグロビンアルファ鎖)(アルファグロビン)	0.34
23	uniprotKB_sptr	P69905	HBA_HUMAN	15,126.36	9.07	5	ヘモグロビンサブユニットアルファ(ヘモグロビンアルファ鎖)(アルファグロビン)	0.70
30	uniprotKB_sptr	P68871	HBB_HUMAN	15,998.41	7.13	4	ヘモグロビンサブユニットベータ(ヘモグロビンベータ鎖)(ベータグロビン)[LVVヘモルフィン-7を含有]	0.37
7	uniprotKB_sptr	P68871	HBB_HUMAN	15,867.22	7.26	9	ヘモグロビンサブユニットベータ(ヘモグロビンベータ鎖)(ベータグロビン)[LVVヘモルフィン-7を含有]	0.80
25	uniprotKB_sptr	P02790	HEMO_HUMAN	51,676.39	6.67	4	ヘモペキシン前駆物質(ベータ1B糖タンパク質)	0.68
16	uniprotKB_sptr	P02790	HEMO_HUMAN	51,676.39	6.67	7	ヘモペキシン前駆物質(ベータ1B糖タンパク質)	0.57
61	uniprotKB_sptr	P38159	HNRPG_HUMAN	40,846.19	10.08	2	ヘテロ核リボヌクレオタンパク質G(hnRNP G,Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein G)(RNA結合モチーフタンパク質、X染色体)(糖タンパク質p43)[処理されたヘテロ核リボヌクレオタンパク質Gを含有]	2.35
57	uniprotKB_sptr	Q86YZ3	HORN_HUMAN	282,390.06	10.06	2	ホルネリン	1.08
16	uniprotKB_sptr	P01876	IGHA1_HUMAN	52,865.03	7.06	7	Igアルファ-1鎖C領域	0.76
36	uniprotKB_sptr	P01834	KAC_HUMAN	25,772.87	6.31	3	Igカッパー鎖C領域	0.51
26	uniprotKB_sptr	P01834	KAC_HUMAN	13,152.70	7.70	5	Igカッパー鎖C領域	0.28
9	uniprotKB_sptr	Q6PI81	Q6PI81_HUMAN	52,666.63	7.87	4	IGHMタンパク質	0.62

10

75	uniprotKB_sptr	Q14624	ITIH4_HUMAN	103,325.40	6.64	2	インタ-アルファ-トリプシン阻害剤重鎖H4前駆物質(ITI重鎖H4)(インタ-アルファ-阻害剤重鎖4)(インタ-アルファ-トリプシン阻害剤ファミリー重鎖関連タンパク質)(IHRP,Inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein)(血漿カリクレイン感受性糖タンパク質120)(PK-120,Plasma kallikrein sensitive glycoprotein 120)(GP120)[70kDaインタ-アルファ-トリプシン阻害剤重鎖H4;35kDaインタ-アルファ-トリプシン阻害剤重鎖H4を含有]	0.83
26	uniprotKB_sptr	Q92876	KLK6_HUMAN	26,855.73	7.57	5	カリクレイン-6前駆物質(EC 3.4.21.-)(プロテアーゼM)(ニューロシン(Neurosin))(ザイム(Zyme))(SP59)(セリンプロテアーゼ9)(セリンプロテアーゼ18)	0.79
4	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	56,561.89	5.13	13	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(ケラチン-10)(K10)	0.72
20	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	56,561.89	5.13	6	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(ケラチン-10)(K10)	0.39
5	uniprotKB_sptr	P35527	K1C9_HUMAN	62,129.47	5.24	11	ケラチン、I型細胞骨格9(サイトケラチン-9)(CK-9)(ケラチン-9)(K9)	0.64
3	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66,017.70	8.45	20	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(ケラチン-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.60
14	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66,017.70	8.45	5	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(ケラチン-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.51
6	uniprotKB_sptr	P35908	K22E_HUMAN	65,865.35	8.35	9	ケラチン、II型細胞骨格2上皮(サイトケラチン-2e)(K2e)(CK 2e)(ケラチン-2)	0.68
21	uniprotKB_sptr	A2NUT2	A2NUT2_HUMAN	24,960.80	5.40	5	ラムダ鎖前駆物質(アミノ酸-20~215)	0.74
28	uniprotKB_sptr	A2NUT2	A2NUT2_HUMAN	25,020.97	8.45	2	ラムダ鎖前駆物質(アミノ酸-20~215)	0.66
41	uniprotKB_sptr	P61626	LYSC_HUMAN	16,537.02	9.50	4	リゾチームC前駆物質(EC 3.2.1.17)(1,4-ベータN-アセチルラムミダーゼC)	1.42
35	uniprotKB_sptr	P25713	MT3_HUMAN	6,926.97	5.00	3	メタロチオネイン-3(MT-3,Metallothionein-3)(メタロチオネインIII)(MT-III)(成長抑制因子)(GIF,Growth inhibitory factor)(GIFB)	2.10
44	uniprotKB_sptr	P25713	MT3_HUMAN	6,926.97	5.00	3	メタロチオネイン-3(MT-3)(メタロチオネインIII)(MT-III)(成長抑制因子)(GIF)(GIFB)	2.79
51	uniprotKB_sptr	P02686.1 SOFORM3	MBP_HUMAN	21,493.21	11.45	2	ミエリン塩基性タンパク質(MBP)(ミエリンA1タンパク質)(ミエリン膜脳炎誘発性タンパク質)[アイソフォーム3]	1.71

20

30

40

36	uniprotKB_sptr	P02686_1 SOFORM 3	MBP_HUMAN	20,245.79	11.27	2	ミエリン塩基性タンパク質(MBP)(ミエリンA1タンパク質)(ミエリン膜脳炎誘発性タンパク質)[アイソフォーム3]	3.11
43	uniprotKB_sptr	O94760	DDAH1_HUMAN	31,121.78	5.64	3	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1(EC 3.5.3.18)(ジメチルアルギニナーゼ-1)(ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1)(DDAHI)(DDAH-1)	1.26
62	uniprotKB_sptr	P07197	NFM_HUMAN	102,316.84	4.90	2	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド(NF-M,Neurofilament medium polypeptide)(ニューロフィラメントトリプレットMタンパク質)(160kDaニューロフィラメントタンパク質)(ニューロフィラメント3)	1.54
66	uniprotKB_sptr	P59665	DEF1_HUMAN	6,350.36	8.32	2	好中球デフェンシン1前駆物質(HNP-1)(HP-1)(HP1)(デフェンシン、アルファ1)[HP 1~56;好中球デフェンシン2(HNP-2)(HP-2)(HP2)を含む]	2.45
24	uniprotKB_sptr	P10451	OSTP_HUMAN	33,016.56	4.59	4	オステオポンチン前駆物質(骨シアロタンパク質1)(分泌リンタンパク質1)(SPP-1,Secreted phosphoprotein 1)(尿路結石タンパク質)(ネフロポンチン(Nephropontin))(ウロポンチン)	1.50
54	uniprotKB_sptr	O75781	PALM_HUMAN	37,157.28	4.96	2	バラレミン	3.52
15	uniprotKB_sptr	P62937	PPIA_HUMAN	18,012.50	8.34	7	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA(EC 5.2.1.8)(PPIase A)(ロタマーゼ(Rotamase)A)(シクロフィリンA)(サイクロスポリン結合タンパク質)	2.45
34	uniprotKB_sptr	P62937	PPIA_HUMAN	18,012.50	8.34	5	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA(EC 5.2.1.8)(PPIase A)(ロタマーゼA)(シクロフィリンA)(サイクロスポリン結合タンパク質)	1.60
72	uniprotKB_sptr	Q06830	PRDX1_HUMAN	22,110.36	8.59	2	ペルオキシレドキシシン-1(EC 1.11.1.15)(チオレドキシシンペルオキシダーゼ2)(チオレドキシシン依存性ペルオキシレダクターゼ2)(増殖関連遺伝子タンパク質)(PAG)(ナチュラルキラー細胞増強因子A)(NKEF-A,Natural killer cell-enhancing factor A)	1.93
60	uniprotKB_sptr	P32119	PRDX2_HUMAN	16,102.26	6.74	2	ペルオキシレドキシシン-2(EC 1.11.1.15)(チオレドキシシンペルオキシダーゼ1)(チオレドキシシン依存性ペルオキシレダクターゼ1)(チオール特異的酸化防止タンパク質)(TSA)(PRP)(ナチュラルキラー細胞増強因子B)(NKEF-B,Natural killer cell-enhancing factor B)	2.72

10

20

45	uniprotKB_sptr	P30041	PRDX6_HUMAN	25,034.99	6.34	3	ペルオキシレドキシシン-6(EC 1.11.1.15)(酸化防止タンパク質2)(1-Cysペルオキシレドキシシン)(1-Cys PRX)(酸性カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2)(EC 3.1.1.-)(aiPLA2)(非セレングルタチオンペルオキシダーゼ)(EC 1.11.1.7)(NSGPx)(24kDaタンパク質)(肝臓2Dページスポット40)(赤血球ページスポット12)	2.15
56	uniprotKB_sptr	P30041	PRDX6_HUMAN	25,034.99	6.34	3	ペルオキシレドキシシン-6(EC 1.11.1.15)(酸化防止タンパク質2)(1-Cysペルオキシレドキシシン)(1-Cys PRX)(酸性カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2)(EC 3.1.1.-)(aiPLA2)(非セレングルタチオンペルオキシダーゼ)(EC 1.11.1.7)(NSGPx)(24kDaタンパク質)(肝臓2Dページスポット40)(赤血球ページスポット12)	2.16
10	uniprotKB_sptr	P30086	PEBP1_HUMAN	21,056.79	7.76	7	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1(PEBP-1,Phosphatidylethanolamine-binding protein 1)(前立腺結合タンパク質)(HCNPpp)(ニューロポリペプチド(Neuropolypeptide)h3)(Rafキナーゼ阻害剤タンパク質)(RKIP,Raf kinase inhibitor protein)[海馬コリン作動性神経刺激ペプチドを含む(HCNP,Hippocampal cholinergic neurostimulating peptide)]	2.06
21	uniprotKB_sptr	P30086	PEBP1_HUMAN	21,056.79	7.76	7	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1(PEBP-1)(前立腺結合タンパク質)(HCNPpp)(ニューロポリペプチドh3)(Rafキナーゼ阻害剤タンパク質)(RKIP)[海馬コリン作動性神経刺激ペプチドを含む(HCNP)]	1.60
59	uniprotKB_sptr	P05155	IC1_HUMAN	52,843.38	6.10	2	血漿プロテアーゼC1阻害剤前駆物質(C1 Inh)(C1Inh)(C1エステラーゼ阻害剤)(C1阻害因子)	0.79
72	uniprotKB_sptr	P02753	RETBP_HUMAN	21,071.60	5.48	2	血漿レチノール結合タンパク質前駆物質(PRBP)(RBP)[血漿レチノール結合タンパク質(1~182);血漿レチノール結合タンパク質(1~181);血漿レチノール結合タンパク質(1~179);血漿レチノール-結合タンパク質(1~176)を含む]	2.83
77	uniprotKB_sptr	P02753	RETBP_HUMAN	22,933.85	6.73	2	血漿レチノール結合タンパク質前駆物質(PRBP)(RBP)[血漿レチノール結合タンパク質(1~182);血漿レチノール結合タンパク質(1~181);血漿レチノール結合タンパク質(1~179);血漿レチノール-結合タンパク質(1~176)を含む]	1.63

30

40

55	uniprotKB_sptr	P00747	PLMN_HUMAN	15,443.72	8.91	2	プラスミノーゲン前駆物質(EC 3.4.21.7)[プラスミン重鎖A;活性化ペプチド;アンジオスタチン;プラスミン重鎖A、短形態;プラスミン軽鎖Bを含有]	2.27
49	uniprotKB_sptr	P02775	SCYB7_HUMAN	9,105.57	8.74	2	血小板塩基性タンパク質前駆物質(PBP,Platelet basic protein precursor)(C-X-Cモチーフモカイン7)(小分子誘発性サイトカインB7)(白血球由来増殖因子)(LDGF,Leukocyte-derived growth factor)(マクロファージ由来増殖因子)(MDGF,Macrophage-derived growth factor)[結合組織活性化ペプチドIII(CTAP-III,Connective tissue-activating peptide III)(低親和性血小板因子IV)(LA-PF4);TC-2;結合組織活性化ペプチドIII(1~81)(CTAP-III(1~81));ベータトロンボグロブリン(ベータ-TG);好中球活性化ペプチド2(74)(NAP-2(74),Neutrophil-activating peptide 2(74));好中球活性化ペプチド2(73)(NAP-2(73),Neutrophil-activating peptide 2(73));好中球活性化ペプチド2(NAP-2,Neutrophil-activating peptide 2);TC-1;好中球活性化ペプチド2(1~66)(NAP-2(1~66),Neutrophil-activating peptide 2(1-66));好中球活性化ペプチド2(1~63)(NAP-2(1~63),Neutrophil-activating peptide 2(1-63))を含有]	2.51
49	uniprotKB_sptr	P02775	SCYB7_HUMAN	9,105.57	8.74	3	血小板塩基性タンパク質前駆物質(PBP)(C-X-Cモチーフモカイン7)(小分子誘発性サイトカインB7)(白血球由来増殖因子)(LDGF)(マクロファージ由来増殖因子)(MDGF)[結合組織活性化ペプチドIII(CTAP-III)(低親和性血小板因子IV)(LA-PF4);TC-2;結合組織活性化ペプチドIII(1~81)(CTAP-III(1~81));ベータトロンボグロブリン(ベータ-TG);好中球活性化ペプチド2(74)(NAP-2(74));好中球活性化ペプチド2(73)(NAP-2(73));好中球活性化ペプチド2(NAP-2);TC-1;好中球活性化ペプチド2(1~66)(NAP-2(1~66),Neutrophil-activating peptide 2(1-66));好中球活性化ペプチド2(1~63)(NAP-2(1~63),Neutrophil-activating peptide 2(1-63))を含有]	0.85

10

34	uniprotKB_sptr	P07602	SAP_HUMAN	26,308.66	5.88	3	プロアクチベーターポリペプチド前駆物質[サボシン-A(プロテインA);サボシン-B-Val;サボシン-B(スフィンゴ脂質アクチベータータンパク質1)(SAP-1)(セレブロシド硫酸エステル活性化因子)(CSAct)(ジスペルシン)(Dispersin))(スルファチド/GM1活性化因子);サボシンC(コペータ-グルコシダーゼ)(A1活性化因子)(グルコシルセラミダーゼ活性化因子)(スフィンゴ脂質アクチベータータンパク質2)(SAP-2);サボシンD(プロテインC)(構成成分C)を含有]	1.60
58	uniprotKB_sptr	P07602	SAP_HUMAN	26,308.66	5.88	3	プロアクチベーターポリペプチド前駆物質[サボシン-A(プロテインA);サボシン-B-Val;サボシン-B(スフィンゴ脂質アクチベータータンパク質1)(SAP-1)(セレブロシド硫酸エステル活性化因子)(CSAct)(ジスペルシン)(スルファチド/GM1活性化因子);サボシンC(コペータ-グルコシダーゼ)(A1活性化因子)(グルコシルセラミダーゼ活性化因子)(スフィンゴ脂質アクチベータータンパク質2)(SAP-2);サボシンD(プロテインC)(構成成分C)を含有]	1.25
53	uniprotKB_sptr	P07737	PROF1_HUMAN	15,054.23	8.79	2	プロフィリン-1(プロフィリンI)	2.40
46	uniprotKB_sptr	P07737	PROF1_HUMAN	15,054.23	8.79	3	プロフィリン-1(プロフィリンI)	0.91
28	uniprotKB_sptr	P41222_C HAIN_0	PTGDS_HUMAN	18,698.03	8.68	4	プロスタグランジンH2 D-イソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リボカリンタイププロスタグランジンDシンターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシンターゼ)(プロスタグランジンD2シンターゼ)(PGD2シンターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレースタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	0.84
50	uniprotKB_sptr	P41222_C HAIN_0	PTGDS_HUMAN	18,698.03	8.68	3	プロスタグランジンH2 D-イソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リボカリンタイププロスタグランジンDシンターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシンターゼ)(プロスタグランジンD2シンターゼ)(PGD2シンターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレースタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	1.63
64	uniprotKB_sptr	A0N5G5	A0N5G5_HUMAN	12,766.37	9.45	2	リウマチ因子D5軽鎖(断片)	0.96
67	uniprotKB_sptr	A0N5G5	A0N5G5_HUMAN	12,766.37	9.45	2	リウマチ因子D5軽鎖(断片)	0.75
2	uniprotKB_sptr	P02787	TRFE_HUMAN	76,959.79	7.16	29	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル結合グロブリン)	0.42

20

30

2	uniprotKB_sptr	P02787	TRFE_HUMAN	77,049.89	6.97	24	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル-結合グロブリン)	0.50
1	uniprotKB_sptr	P02768	ALBU_HUMAN	66,472.22	5.73	46	血清アルブミン前駆物質	0.40
1	uniprotKB_sptr	P02768	ALBU_HUMAN	69,366.70	5.98	49	血清アルブミン前駆物質	0.33
33	uniprotKB_sptr	O75368	SH3L1_HUMAN	12,774.25	5.53	3	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	2.17
48	uniprotKB_sptr	O75368	SH3L1_HUMAN	12,774.25	5.53	3	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	1.92
32	uniprotKB_sptr	P00441	SODC_HUMAN	16,122.00	6.04	4	スーパーオキシドジスムターゼ[Cu-Zn](EC 1.15.1.1)	1.18
71	uniprotKB_sptr	P10599	THIO_HUMAN	9,451.99	6.56	2	チオレドキシシン(Trx,Thioredoxin)(ATL由来因子)(ADF,ATL-derived factor)(表面結合スルフヒドリルタンパク質)(SASP, Surface-associated sulphhydryl protein)	2.17
46	uniprotKB_sptr	P04216	THY1_HUMAN	12,553.22	9.33	2	Thy-1膜糖タンパク質前駆物質(Thy-1抗原)(CD90抗原)(CDw90)	1.29
68	uniprotKB_sptr	P62328	TYB4_HUMAN	7,312.18	8.84	2	チモシンベータ-4(Tベータ4)(Fv)[造血系調節性ペプチド(セラスペニド(Seraspenide)を含有]	1.69
41	uniprotKB_sptr	P60174	TPIS_HUMAN	26,669.50	6.90	3	トリオースリン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.1)(TIM,Triosephosphate isomerase)(トリオースリン酸イソメラーゼ)	0.82
51	uniprotKB_sptr	P60174	TPIS_HUMAN	27,126.45	8.70	3	トリオースリン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.1)(TIM)(トリオースリン酸イソメラーゼ)	0.68
27	uniprotKB_sptr	P62988	UBIQ_HUMAN	61,523.80	7.25	4	ユビキチン	2.09
39	uniprotKB_sptr	P62988	UBIQ_HUMAN	25,761.65	7.78	4	ユビキチン	1.50
15	uniprotKB_sptr	A6NGU3	A6NGU3_HUMAN	57,019.61	8.48	2	特徴づけられていないタンパク質IGHG3(断片)	0.61
65	uniprotKB_sptr	Q9GZP4	CA128_HUMAN	24,177.85	5.58	2	UPF0424タンパク質C1orf128	1.76
43	uniprotKB_sptr	P02774	VTDB_HUMAN	52,963.66	5.47	4	ビタミンD結合タンパク質前駆物質(DBP)(群特異成分)(Gc-グロブリン)(VDB)	0.63
69	uniprotKB_sptr	P04004_C HAIN_0	VTNC_HUMAN	43,029.62	5.64	2	ビトロネクチン前駆物質(血清拡散因子(Serum-spreading factor))(S-タンパク質)(V75)[ビトロネクチンV65サブユニット;ビトロネクチンV10サブユニット;ソマトメジンBを含有][CHAIN0]	1.47
76	uniprotKB_sptr	P25311	ZA2G_HUMAN	34,244.70	5.85	2	亜鉛アルファ-2-糖タンパク質前駆物質(Znアルファ-2-糖タンパク質)(Znアルファ-2-GP,Zn-alpha-2-glycoprotein)	0.56

10

20

【 0 2 4 4 】

【 表 9 】

表 5: 対側脳半球と比べた梗塞中心部における調節性タンパク質のリスト.比が 1 を超える、IC において増加;比が 1 未満、IC において減少

Nr.	データバンク	AC	ID	MW	PI	固有のペプチドの数	説明	相関的比 IC/P
20	uniprotKB_sptr	P60709	ACTB_HUMAN	41,004.97	5.67	4	アクチン、細胞質内1(ベータアクチン)	1.65
26	uniprotKB_sptr	P07108	ACBP_HUMAN	11793.375	5.71	3	アシルCoA結合タンパク質(ACBP)(ジアゼパム結合阻害剤)(DBI)(エンドゼピン)(EP)	12.53
26	uniprotKB_sptr	P01009	A1AT_HUMAN	22,828.35	6.35	4	アルファ1アンチトリプシン前駆物質(アルファ-1プロテアーゼ阻害剤)(アルファ-1-抗プロテイナーゼ)	0.49
50	uniprotKB_sptr	P01023	A2MG_HUMAN	160,796.89	5.98	2	アルファ-2-マクログロブリン前駆物質(アルファ-2-M)	0.36
40	uniprotKB_sptr	P02760	AMBP_HUMAN	38,999.49	6.18	3	AMBPタンパク質前駆物質[アルファ1-ミクログロブリン(タンパク質HC)(荷電ヘテロ複合体形成糖タンパク質(Complex-forming glycoprotein heterogeneous in charge))(アルファ-1マイクロ糖タンパク質(microglycoprotein));インタ-アルファ-トリプシン阻害剤軽鎖(ITI-LC)(ビクニン)(HI-30)を含有]	1.82
27	uniprotKB_sptr	QSEFE5	QSEFE5_HUMAN	52362.454	8.73	2	抗RhDモノクローナルT125 ガンマ1重鎖前駆物質	0.82
24	uniprotKB_sptr	P02647	APOA1_HUMAN	27,950.50	5.36	4	アポリポタンパク質A-I前駆物質(Apo-AI)(ApoA-I)[アポリポタンパク質A-I(1~242)を含有]	0.80
59	uniprotKB_sptr	P02652	APOA2_HUMAN	8,579.77	5.39	2	アポリポタンパク質A-II前駆物質(Apo-AII)(ApoA-II)[アポリポタンパク質A-II(1~76)を含有]	2.28
60	uniprotKB_sptr	P06727	APOA4_HUMAN	28,157.53	5.45	2	アポリポタンパク質A-IV前駆物質(Apo-AIV)(ApoA-IV)	3.79
33	uniprotKB_sptr	P61769	B2MG_HUMAN	11731.167	6.46	2	ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質[ベータ-2-ミクログロブリン形態 pl 5.3を含有]。	0.80
53	uniprotKB_sptr	P61769	B2MG_HUMAN	11,731.17	6.46	2	ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質[ベータ-2-ミクログロブリン形態 pl 5.3を含有]。	0.44
25	uniprotKB_sptr	P62158	CALM_HUMAN	16706.394	4.12	3	カルモジュリン(CaM)	1.06

30

40

19	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28739.022	6.92	4	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラーゼI)(CA-I)	0.29
12	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28,739.02	6.92	5	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラーゼI)(CA-I)	4.68
28	uniprotKB_sptr	P00918	CAH2_HUMAN	29,246.06	7.22	4	カルボニックアンヒドラーゼ2(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼII)(カルボネートデヒドラーゼII)(CA-II)(カルボニックアンヒドラーゼC)	3.18
56	uniprotKB_sptr	P49913	CAMP_HUMAN	19,301.39	9.59	2	カテリシジン抗菌ペプチド前駆物質(18kDaカチオン抗菌タンパク質)(CAP-18,18 kDa cationic antimicrobial protein)(hCAP-18)[抗菌性タンパク質FALL-39(FALL-39ペプチド抗生物質);抗菌性タンパク質LL-37を含有]	1.53
9	uniprotKB_sptr	P36222	CH3L1_HUMAN	40488.867	8.80	6	キチナーゼ-3様タンパク質前駆物質(軟骨糖タンパク質39)(GP-39)(39 kDa滑膜タンパク質)(HCgp-39)(YKL-40)	2.44
39	uniprotKB_sptr	P10645	CMGA_HUMAN	48960.312	4.57	2	クロモグラニンA前駆物質(CgA,Chromogranin-A precursor)(脳下垂体分泌タンパク質I)(SP-1,Pituitary secretory protein I)[パソスタチン-1(パソスタチンI);パソスタチン-2(パソスタチンII);EA-92;ES-43;パンクレアスタチン;SS-18;WA-8;WE-14;LF-19;AL-11;GV-19;GR-44;ER-37を含有]	0.29
63	uniprotKB_sptr	P23528	COF1_HUMAN	18,502.50	8.53	2	コフィリン-1(コフィリン、非筋肉アイソフォーム)(18kDaリントタンパク質)(p18)	2.00
16	uniprotKB_sptr	P01024	CO3_HUMAN	184,951.41	6.04	5	補体C3前駆物質[補体C3ベータ鎖;補体C3アルファ鎖;C3aアナフィラトキシン;補体C3bアルファ鎖;補体C3cアルファ鎖断片1;補体C3dg断片;補体C3g断片;補体C3d断片;補体C3f断片;補体C3cアルファ鎖断片2を含有]	0.43
49	uniprotKB_sptr	P04080	CYTB_HUMAN	11,139.59	7.91	2	シスタチン-B(ステフィン-B)(肝臓チオールプロテイナーゼ阻害剤)(CPI-B)	2.10
24	uniprotKB_sptr	P01034 CHAIN_0	CYTC_HUMAN	13347.14	9.00	3	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン) [CHAIN 0]	0.62
31	uniprotKB_sptr	P01034	CYTC_HUMAN	15,799.22	9.21	3	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン)	0.03

10

20

20	uniprotKB_sptr	P81605	DCD_HUMAN	11283.862	6.72	4	ダームシジン前駆物質(プレプロテオリシン(Preproteolysin))[生存促進ペプチド;DCD-1を含有]	0.85
61	uniprotKB_sptr	P81605	DCD_HUMAN	4,705.34	5.61	2	ダームシジン前駆物質(プレプロテオリシン)[生存促進ペプチド;DCD-1を含有]	0.35
14	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94973.068	5.75	5	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	0.46
11	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94,973.07	5.75	5	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	2.33
47	uniprotKB_sptr	P02675	FIBB_HUMAN	55,928.17	8.64	2	フィブリノゲンベータ鎖前駆物質[フィブリノペプチドBを含有]	0.38
48	uniprotKB_sptr	P30043	BLVRB_HUMAN	22,119.35	7.86	2	フラビンレダクターゼ(EC 1.5.1.30)(FR,Flavin reductase)(NADPH依存性シアホラーゼ)(NADPHフラビンレダクターゼ)(FLR)(ビリベルジンレダクターゼB)(EC 1.3.1.24)(BVR-B)(ビリベルジンIXベータレダクターゼ)(緑色ヘム結合タンパク質)(GHBP,Green heme-binding protein)	2.22
15	uniprotKB_sptr	P14136	GFAP_HUMAN	49880.22	5.47	4	グリア線維酸性タンパク質(GFAP)	4.13
38	uniprotKB_sptr	P14136	GFAP_HUMAN	49,505.89	5.95	2	グリア線維酸性タンパク質(GFAP)	0.37
13	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	45205.318	6.24	5	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖を含有]	0.83
41	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	45,205.32	6.24	3	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖を含有]	0.14
42	uniprotKB_sptr	P69905	HBA_HUMAN	15,126.36	9.07	2	ヘモグロビンサブユニットアルファ(ヘモグロビンアルファ鎖)(アルファグロビン)	3.21
40	uniprotKB_sptr	P68871	HBB_HUMAN	15867.217	7.26	2	ヘモグロビンサブユニットベータ(ヘモグロビンベータ鎖)(ベータグロビン)[LVVヘモルフィン-7を含有]	0.81
13	uniprotKB_sptr	P16403	H12_HUMAN	21,233.57	11.02	2	ヒストンH1.2(ヒストンH1d)	2.97
14	uniprotKB_sptr	P16401	H15_HUMAN	22,448.99	10.98	4	ヒストンH1.5(ヒストンH1a)	2.03
15	uniprotKB_sptr	P01859	IGHG2_HUMAN	35,884.65	8.01	2	Igガンマ-2鎖C領域	0.18
16	uniprotKB_sptr	Q92876	KLK6_HUMAN	24499.85	7.26	5	カリクレイン-6前駆物質(EC 3.4.21.-)(プロテアーゼM)(ニューロシン(Neurosin))(ザイム)(SP59)(セリンプロテアーゼ9)(セリンプロテアーゼ18)	0.60
4	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	59510.708	5.18	16	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(Cytokeratin-10)(K10)	0.99

30

40

5	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	59,510.71	5.18	9	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(Cytokeratin-10)(K10)	0.48
7	uniprotKB_sptr	P02533	K1C14_HUMAN	51490.331	5.13	6	ケラチン、I型細胞骨格14(サイトケラチン-14)(K14,Cytokeratin-14)(ケラチン-14)(CK-14)	0.91
10	uniprotKB_sptr	P08779	K1C16_HUMAN	51,267.84	5.03	6	ケラチン、I型細胞骨格16(サイトケラチン-16)(K16)(ケラチン-16,Cytokeratin-16)(CK-16)	1.28
5	uniprotKB_sptr	P35527	K1C9_HUMAN	62129.473	5.24	14	ケラチン、I型細胞骨格9(サイトケラチン-9)(CK-9)(Cytokeratin-9)(K9)	0.84
4	uniprotKB_sptr	P35527	K1C9_HUMAN	62,129.47	5.24	10	ケラチン、I型細胞骨格9(サイトケラチン-9)(CK-9)(Cytokeratin-9)(K9)	0.67
2	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66017.701	8.45	23	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(Cytokeratin-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.96
2	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66,017.70	8.45	16	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(Cytokeratin-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.52
3	uniprotKB_sptr	P35908	K22E_HUMAN	65865.354	8.35	13	ケラチン、II型細胞骨格2上皮(サイトケラチン-2e)(K2e)(CK 2e)(ケラチン-2)	0.97
3	uniprotKB_sptr	P35908	K22E_HUMAN	65,865.35	8.35	7	ケラチン、II型細胞骨格2上皮(サイトケラチン-2e)(K2e)(CK 2e)(ケラチン-2)	0.43
8	uniprotKB_sptr	P13647	K2C5_HUMAN	62378.367	8.14	2	ケラチン、II型細胞骨格5(サイトケラチン-5)(CK-5,Cytokeratin-5)(ケラチン-5)(K5)(58kDaサイトケラチン)	0.75
6	uniprotKB_sptr	P13647	K2C5_HUMAN	62,378.37	8.14	4	ケラチン、II型細胞骨格5(サイトケラチン-5)(CK-5,Cytokeratin-5)(ケラチン-5)(K5)(58kDaサイトケラチン)	0.63
8	uniprotKB_sptr	P02538	K2C6A_HUMAN	60,044.97	8.38	2	ケラチン、II型細胞骨格6A(サイトケラチン6A)(CK 6A,Cytokeratin-6A)(K6aケラチン)(サイトケラチン6D)(CK 6D)	1.07
22	uniprotKB_sptr	A2NUT2	A2NUT2_HUMAN	25,020.97	8.45	2	ラムダ鎖前駆物質(アミノ酸-20~215)	0.21
9	uniprotKB_sptr	P61626	LYSC_HUMAN	16,537.02	9.50	4	リゾチームC前駆物質(EC 3.2.1.17)(1,4-ベータN-アセチルムラミダーゼC)	2.75
36	uniprotKB_sptr	P25713	MT3_HUMAN	6926.967	5.00	2	メタロチオネイン-3(MT-3)(メタロチオネインIII)(MT-III)(成長抑制因子)(GIF)(GIFB)	1.39
54	uniprotKB_sptr	P02686	MBP_HUMAN	17,343.36	11.29	2	ミエリン塩基性タンパク質(MBP)(ミエリンA1タンパク質)(ミエリン膜脳炎誘発性タンパク質)	0.30

10

20

41	uniprotKB_sptr	O94760	DDAH1_HUMAN	31121.782	5.64	2	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1(EC 3.5.3.18)(ジメチルアルギニンナーゼ-1)(ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1)(DDAH1)(DDAH-1)	6.31
11	uniprotKB_sptr	P07197	NFM_HUMAN	102316.835	4.90	7	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド(NF-M)(ニューロフィラメントトリプレットMタンパク質)(160kDaニューロフィラメントタンパク質)(ニューロフィラメント3)	4.68
44	uniprotKB_sptr	P59665	DEF1_HUMAN	6,350.36	8.32	2	好中球デフェンシン1前駆物質(HNP-1)(HP-1)(HP1)(デフェンシン、アルファ1)[HP 1~56;好中球デフェンシン2(HNP-2)(HP-2)(HP2)を含む]	4.23
43	uniprotKB_sptr	P80188	NGAL_HUMAN	22,902.42	9.15	2	好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン前駆物質(NGAL,Neutrophil gelatinase-associated lipocalin precursor)(p25)(MMP-9の25kDa アルファ2-ミクログロブリン関連サブユニット)(リポカリン-2)(癌遺伝子24p3)	1.85
18	uniprotKB_sptr	P10451	OSTP_HUMAN	33016.56	4.59	3	オステオポンチン前駆物質(骨シアロタンパク質1)(分泌リンタンパク質1)(SPP-1)(尿路結石タンパク質)(ネフロポンチン)(ウロポンチン)	0.88
22	uniprotKB_sptr	P62937	PPIA_HUMAN	18012.497	8.34	3	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA(EC 5.2.1.8)(PPIase A)(ロタマーゼ(Rotamase)A)(シクロフィリンA)(サイクロスポリン結合タンパク質)	8.25
55	uniprotKB_sptr	P62937	PPIA_HUMAN	18,012.50	8.34	2	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA(EC 5.2.1.8)(PPIase A)(ロタマーゼA)(シクロフィリンA)(サイクロスポリン結合タンパク質)	1.69
21	uniprotKB_sptr	P30086	PEBP1_HUMAN	21056.788	7.76	3	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1(PEBP-1)(前立腺結合タンパク質)(HCNPPp)(ニューロポリペプチド(Neuropolypeptide)h3)(Rafキナーゼ阻害剤タンパク質)(RKIP)[海馬コリン作動性神経刺激ペプチドを含む(HCNP)]	4.88
51	uniprotKB_sptr	P00747	PLMN_HUMAN	9,019.20	6.78	2	プラスミノーゲン前駆物質(EC 3.4.21.7)[プラスミン重鎖A;活性化ペプチド;アンジオスタチン;プラスミン重鎖A、短形態;プラスミン軽鎖Bを含む]	1.22

30

40

44	uniprotKB_sptr	P07602	SAP_HUMAN	26308.661	5.88	2	プロアクチペーターポリペプチド前駆物質[サボシン-A(プロテインA);サボシン-B-Val;サボシン-B(スフィンゴ脂質アクチペータータンパク質1)(SAP-1)(セレブロシド硫酸エステル活性化因子)(CSAct)(ジスベルシン(Dispersin))(スルファチド/GM1活性化因子);サボシンC(コペーターグルコシダーゼ)(A1活性化因子)(グルコシルセラミダーゼ活性化因子)(スフィンゴ脂質アクチペータータンパク質2)(SAP-2);サボシンD(プロテインC)(構成成分C)を含有]	1.93
12	uniprotKB_sptr	P41222 CHAIN_0	PTGDS_HUMAN	18698.032	8.68	6	プロスタグランジンH2 Dイソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リボカリンタイププロスタグランジンDシンターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシンターゼ)(プロスタグランジンD2シンターゼ)(PGD2シンターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレストタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	0.27
30	uniprotKB_sptr	P41222 CHAIN_0	PTGDS_HUMAN	18,698.03	8.68	3	プロスタグランジンH2 Dイソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リボカリンタイププロスタグランジンDシンターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシンターゼ)(プロスタグランジンD2シンターゼ)(PGD2シンターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレストタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	0.46
29	uniprotKB_sptr	P05109	S10A8_HUMAN	10,834.51	6.96	3	タンパク質S100-A8(S100カルシウム結合タンパク質A8)(カルグラニユリン-A)(遊走阻止因子関連タンパク質8)(MRP-8)(囊胞性線維症抗原)(CFAG)(P8)(白血球L1複合体軽鎖)(カルプロテクチンL1Lサブユニット)(尿路結石タンパク質バンドA)	0.98
19	uniprotKB_sptr	Q6P5S8	Q6P5S8_HUMAN	25,772.87	6.31	2	推定上の特徴づけられていないタンパク質	0.15
62	uniprotKB_sptr	A0N5G5	A0N5G5_HUMAN	12,766.37	9.45	2	リウマチ因子D5軽鎖(断片)	0.67
6	uniprotKB_sptr	P02787	TRFE_HUMAN	77049.89	6.97	17	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル-結合グロブリン)	1.47
7	uniprotKB_sptr	P02787	TRFE_HUMAN	77,049.89	6.97	8	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル-結合グロブリン)	0.42
1	uniprotKB_sptr	P02768	ALBU_HUMAN	69366.701	5.98	33	血清アルブミン前駆物質	1.17
1	uniprotKB_sptr	P02768	ALBU_HUMAN	69,366.70	5.98	32	血清アルブミン前駆物質	0.38
18	uniprotKB_sptr	Q9UP60	Q9UP60_HUMAN	53,088.18	6.70	3	SNC73タンパク質	0.30
29	uniprotKB_sptr	P00441	SODC_HUMAN	16122.002	6.04	2	スーパーオキシドジスムターゼ[Cu-Zn](EC 1.15.1.1)	1.83

10

20

43	uniprotKB_sptr	P63313	TYB10_HUMAN	5025.673	6.21	2	チモシンベータ-10	4.16
37	uniprotKB_sptr	P62328	TYB4_HUMAN	7312.177	8.84	2	チモシンベータ-4(Tベータ4)(Fx)[造血系調節性ペプチド(セラスペニド)を含有]	2.39
17	uniprotKB_sptr	P60174	TPIS_HUMAN	26669.495	6.90	5	トリオースリン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.1)(TIM)(トリオースリン酸イソメラーゼ)	3.50
57	uniprotKB_sptr	P06753	TPM3_HUMAN	28,809.25	4.75	2	トロポミオシンアルファ-3鎖(トロポミオシン-3)(トロポミオシンガンマ)(hTMS)	2.04
32	uniprotKB_sptr	P62988	UBIQ_HUMAN	25761.65	7.78	2	ユビキチン	1.71

【 0 2 4 5 】

30

【表 10】

表 6: 対側脳半球と比べたペナンプラにおける調節性タンパク質のリスト. 比が 1 を超える、P において増加; 比が 1 未満、P において減少

Nr.	データバンク	AC	ID	MW	PI	固有のペプチドの数	説明	相関的比 IC/P
38	uniprotKB_sptr	P63104	1433Z_HUMAN	27,745.11	4.77	3	14-3-3タンパク質ゼータ/デルタ(プロテインキナーゼC阻害剤タンパク質1)(KCIP-1)	1.51
57	uniprotKB_sptr	P60709	ACTB_HUMAN	41,004.97	5.67	2	アクチン、細胞質内I(ベータアクチン)	1.15
25	uniprotKB_sptr	Q13747	Q13747_HUMAN	22,828.35	6.35	8	アルファ-1アンチトリプシン(断片)	1.05
27	uniprotKB_sptr	Q13747	Q13747_HUMAN	22,828.35	6.35	7	アルファ-1アンチトリプシン(断片)	0.35
39	uniprotKB_sptr	P02763	A1AG1_HUMAN	21,560.13	5.10	2	アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質(AGP 1)(オロソムコイド-1)(OMD 1)	1.38
53	uniprotKB_sptr	P02763	A1AG1_HUMAN	23,539.62	5.12	2	アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質(AGP 1)(オロソムコイド-1)(OMD 1)	0.38
42	uniprotKB_sptr	P04217	A1BG_HUMAN	51,940.72	5.72	3	アルファ1B糖タンパク質前駆物質(アルファ-1-B糖タンパク質)	1.11
24	uniprotKB_sptr	P01023	A2MG_HUMAN	160,796.89	5.98	7	アルファ-2-マクログロブリン前駆物質(アルファ-2-M)	0.68
47	uniprotKB_sptr	P01023	A2MG_HUMAN	160,796.89	5.98	4	アルファ-2-マクログロブリン前駆物質(アルファ-2-M)	0.36
55	uniprotKB_sptr	P06733	ENOA_HUMAN	47,037.78	7.55	3	アルファエノラーゼ(EC 4.2.1.11)(2-ホスホ-Dグリセリン酸ヒドロリアーゼ)(非神経エノラーゼ)(NNE, Non-neural enolase)(エノラーゼ1)(ホスホピルビン酸ヒドラーターゼ)(C-mycプロモーター結合タンパク質)(MBP-1)(MPB-1)(プラスミノーゲン結合タンパク質)	0.45
92	uniprotKB_sptr	P51693	APLP1_HUMAN	72,176.41	5.58	2	アミロイド様タンパク質1前駆物質(APLP)(APLP-1)[C30を含有]	0.86
91	uniprotKB_sptr	P01019	ANGT_HUMAN	53,777.91	6.07	2	アンジオテンシノゲン前駆物質(セルピンA8)[アンジオテンシン1(アンジオテンシンI)(Ang I);アンジオテンシン2(アンジオテンシンII)(Ang II);アンジオテンシン3(アンジオテンシンIII)(Ang III)(Des-Asp[1]-アンジオテンシンII)を含有]	0.71
51	uniprotKB_sptr	P01008	ANT3_HUMAN	52,691.56	6.32	3	抗トロンビンIII前駆物質(ATIII, Antithrombin-III)	1.19

10

20

73	uniprotKB_sptr	P02652	APOA2_HUMAN	8,579.77	5.39	2	アポリポタンパク質A-II前駆物質(Apo-AII, Apolipoprotein A-II)(ApoA-II)[アポリポタンパク質A-II(1~76)を含有]	1.27
96	uniprotKB_sptr	P02652	APOA2_HUMAN	8,579.77	5.39	2	アポリポタンパク質A-II前駆物質(Apo-AII)(ApoA-II)[アポリポタンパク質A-II(1~76)を含有]	1.01
61	uniprotKB_sptr	P02649_C HAIN_0	APOE_HUMAN	34,236.69	5.65	2	アポリポタンパク質E前駆物質(Apo-E, Apolipoprotein E)[CHAIN0]	0.30
87	uniprotKB_sptr	P55087	AQP4_HUMAN	34,829.70	8.09	2	アクアポリン-4(AQP-4, Aquaporin-4)(WCH4)(水銀非感受性水チャネル)(Mercurial-insensitive water channel)(MIWC)	2.00
68	uniprotKB_sptr	A6XND9	A6XND9_HUMAN	11,748.41	6.28	2	ベータ-2-ミクログロブリン	0.92
88	uniprotKB_sptr	A6XND9	A6XND9_HUMAN	11,748.41	6.28	2	ベータ-2-ミクログロブリン	0.25
70	uniprotKB_sptr	Q96KN2	CNDP1_HUMAN	56,734.20	5.24	2	ベータ-Ala-Hisジペプチターゼ前駆物質(EC 3.4.13.20)(カルノシンジペプチターゼ1)(CNDPジペプチターゼ1)(血清カルノシナーゼ)(グルタミン酸カルボキシペプチターゼ様タンパク質2)	0.32
80	uniprotKB_sptr	Q96GW7	PGCB_HUMAN	92,811.83	4.58	2	プレピカンコアタンパク質前駆物質(脳濃縮ヒアルロン結合タンパク質)(タンパク質BEHAB)	0.72
75	uniprotKB_sptr	Q9BRL5	Q9BRL5_HUMAN	16,506.53	4.38	3	CALM3タンパク質	1.53
36	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28,739.02	6.92	4	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラーターゼI)(CA-I)	1.09
39	uniprotKB_sptr	P00915	CAH1_HUMAN	28,870.21	6.83	5	カルボニックアンヒドラーゼ1(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼI)(カルボネートデヒドラーターゼI)(CA-I)	0.71
71	uniprotKB_sptr	P00918	CAH2_HUMAN	29,246.06	7.22	3	カルボニックアンヒドラーゼ2(EC 4.2.1.1)(カルボニックアンヒドラーゼII)(カルボネートデヒドラーターゼII)(CA-II)(カルボニックアンヒドラーゼC)	1.77
60	uniprotKB_sptr	P13987	CD59_HUMAN	14,177.29	6.38	2	CD59糖タンパク質前駆物質(膜攻撃複合体阻害因子)(MACIF, Membrane attack complex inhibition factor)(MAC阻害性タンパク質)(MAC-IP, MAC-inhibitory protein)(プロテクティン)(MEM43抗原)(反応性溶解の膜抑制因子)(MIRL, Membrane inhibitor of reactive lysis)(20kDaホモログス制限因子)(HRF-20, 20 kDa homologous restriction factor)(HRF20)(IF5抗原)	1.54
95	uniprotKB_sptr	P13987	CD59_HUMAN	8,961.10	5.70	2	CD59糖タンパク質前駆物質(膜攻撃複合体阻害因子)(MACIF)(MAC阻害性タンパク質)(MAC-IP)(プロテクティン)(MEM43抗原)(反	1.19

30

40

							応性溶解の膜抑制因子)(MIRL)(20kDaホモログス制限因子)(HRF-20,20 kDa homologous restriction factor)(HRF20)(1F5抗原)	
16	uniprotKB_sptr	A8K866	A8K866_HUMAN	30,777.84	5.68	11	cDNA FLJ75790、ホモサピエンスアポリポタンパク質A-I(APOA1,apolipoprotein A-I)、mRNA(アポリポタンパク質A-1、アイソフォームCRA_a)に高度に類似	0.85
22	uniprotKB_sptr	A8K866	A8K866_HUMAN	30,777.84	5.68	8	cDNA FLJ75790、ホモサピエンスアポリポタンパク質A-I(APOA1,apolipoprotein A-I)、mRNA(アポリポタンパク質A-1、アイソフォームCRA_a)に高度に類似	0.76
17	uniprotKB_sptr	P00450	CERU_HUMAN	122,205.23	5.46	9	セルロプラスミン前駆物質(EC 1.16.3.1)(フェロキシダーゼ)	0.87
35	uniprotKB_sptr	P00450	CERU_HUMAN	122,205.23	5.46	5	セルロプラスミン前駆物質(EC 1.16.3.1)(フェロキシダーゼ)	0.45
64	uniprotKB_sptr	Q2TU75	Q2TU75_HUMAN	52,494.59	5.97	2	クラスタリン	0.49
89	uniprotKB_sptr	Q14019	COTL1_HUMAN	15,944.98	5.86	2	コアクトシン様タンパク質	2.64
32	uniprotKB_sptr	P0C0L4	CO4A_HUMAN	84,183.35	5.38	5	補体C4-A前駆物質(酸性補体C4)[補体C4ベータ鎖;補体C4-Aアルファ鎖;C4aアナフィラトキシン;C4b-A;C4d-A;補体C4ガンマ鎖を含有]	1.15
72	uniprotKB_sptr	P0C0L4	CO4A_HUMAN	84,183.35	5.38	3	補体C4-A前駆物質(酸性補体C4)[補体C4ベータ鎖;補体C4-Aアルファ鎖;C4aアナフィラトキシン;C4b-A;C4d-A;補体C4ガンマ鎖を含有]	0.78
8	uniprotKB_sptr	A7E236	A7E236_HUMAN	187,148.13	6.05	4	補体成分3(補体成分3、アイソフォームCRA_b)	0.72
12	uniprotKB_sptr	A7E236	A7E236_HUMAN	187,148.13	6.05	12	補体成分3(補体成分3、アイソフォームCRA_b)	0.48
72	uniprotKB_sptr	P00751	CFAB_HUMAN	83,000.83	6.80	2	補体因子B前駆物質(EC 3.4.21.47)(C3/C5コンベルターゼ)(プロバージン因子B)(グリシンリッチペータ糖タンパク質)(GBG)(PBF2)[補体因子B Ba断片;補体因子B Bb断片を含有]	1.15
93	uniprotKB_sptr	P00751	CFAB_HUMAN	83,000.83	6.80	2	補体因子B前駆物質(EC 3.4.21.47)(C3/C5コンベルターゼ)(プロバージン因子B)(グリシンリッチペータ糖タンパク質)(GBG)(PBF2)[補体因子B Ba断片;補体因子B Bb断片を含有]	0.36
63	uniprotKB_sptr	P04080	CYTB_HUMAN	11,139.59	7.91	2	シスタチン-B(ステフィン-B)(肝臓チオールプロテイナーゼ阻害剤)(CPI-B)	2.16
79	uniprotKB_sptr	P04080	CYTB_HUMAN	11,139.59	7.91	2	シスタチン-B(ステフィン-B)(肝臓チオールプロテイナーゼ阻害剤)(CPI-B)	1.81

10

20

49	uniprotKB_sptr	P01034	CYTC_HUMAN	15,799.22	9.21	2	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン)	0.17
57	uniprotKB_sptr	P01034	CYTC_HUMAN	15,799.22	9.21	3	シスタチンC前駆物質(シスタチン-3)(神経内分泌塩基性ポリペプチド)(ガンマトレース)(ポストガンマグロブリン)	0.38
67	uniprotKB_sptr	P21291	CSRPI_HUMAN	20,436.21	8.99	2	システイングリシンリッチタンパク質1(システインリッチタンパク質1)(CRP1)(CRP)	4.58
56	uniprotKB_sptr	P81605_P EPT_1	DCD_HUMAN	4,705.34	5.61	4	ダームシジン前駆物質(プレプロテオリシン(Preproteolysin))[生存促進ペプチド;DCD-1を含有]	0.34
33	uniprotKB_sptr	Q4VWZ6	Q4VWZ6_HUMAN	10,144.58	6.74	6	ジアゼパム結合阻害剤、スプライス形態1c	2.21
102	uniprotKB_sptr	Q16555	DPYL2_HUMAN	62,270.61	6.00	2	ジヒドロポリミジナーゼ関連タンパク質2(DRP-2,Dihydropyrimidinase-related protein 2)(コラプシン応答メジエータータンパク質2)(CRMP-2,Collapsin response mediator protein 2)(N2A3)	1.14
44	uniprotKB_sptr	Q13822	ENPP2_HUMAN	105,210.85	8.54	4	エクトヌクレオチドピロホスファターゼ(ホスホジェステラーゼファミリーメンバー2前駆物質(EC 3.1.4.39)(E-NPP 2,Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2)(細胞外リゾホスホリパーゼD)(LysoPLD)(オータキシン)	0.46
30	uniprotKB_sptr	Q53HR3	Q53HR3_HUMAN	47,140.92	7.57	2	エノラーゼ(EC 4.2.1.11)(断片)	1.87
26	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94,973.07	5.75	7	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	2.98
23	uniprotKB_sptr	P02671	FIBA_HUMAN	94,973.07	5.75	7	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質[フィブリノペプチドAを含有]	1.05
68	uniprotKB_sptr	P04075	ALDOA_HUMAN	39,420.03	8.49	3	フルクトース二リン酸アルドラーゼA(EC 4.1.2.13)(筋肉型アルドラーゼ)(肺癌抗原NY-LU-1)	1.42
61	uniprotKB_sptr	P09104	ENOG_HUMAN	47,268.59	4.95	2	ガンマエノラーゼ(EC 4.2.1.11)(2-ホスホ-Dグリセリン酸ヒドロリアーゼ)(神経エノラーゼ)(ニューロン特異的エノラーゼ)(NSE)(エノラーゼ2)	1.19
38	uniprotKB_sptr	P14136	GFAP_HUMAN	49,505.89	5.95	4	グリア線維酸性タンパク質(GFAP)	0.31
16	uniprotKB_sptr	P14136	GFAP_HUMAN	49,880.22	5.47	9	グリア線維酸性タンパク質(GFAP)	2.33
13	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	45,205.32	6.24	12	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロビンベータ鎖を含有]	0.86
10	uniprotKB_sptr	P00738	HPT_HUMAN	27,265.07	6.53	14	ハプトグロビン前駆物質[ハプトグロビンアルファ鎖;ハプトグロ	0.45

30

40

							ビンベータ鎖を含有]	
31	uniprotKB_sptr	P69905	HBA_HUMAN	15,126.36	9.07	5	ヘモグロビンサブユニットアルファ(ヘモグロビンアルファ鎖)(アルファグロビン)	0.11
41	uniprotKB_sptr	P69905	HBA_HUMAN	15,126.36	9.07	4	ヘモグロビンサブユニットアルファ(ヘモグロビンアルファ鎖)(アルファグロビン)	0.55
34	uniprotKB_sptr	P68871	HBB_HUMAN	15,867.22	7.26	5	ヘモグロビンサブユニットベータ(ヘモグロビンベータ鎖)(ベータグロビン)[LVVヘモルフィン-7を含有]	0.11
40	uniprotKB_sptr	P68871	HBB_HUMAN	15,998.41	7.13	5	ヘモグロビンサブユニットベータ(ヘモグロビンベータ鎖)(ベータグロビン)[LVVヘモルフィン-7を含有]	0.59
20	uniprotKB_sptr	P02790	HEMO_HUMAN	51,676.39	6.67	8	ヘモベキシン前駆物質(ベータ1B糖タンパク質)	0.90
25	uniprotKB_sptr	P02790	HEMO_HUMAN	51,676.39	6.67	6	ヘモベキシン前駆物質(ベータ1B糖タンパク質)	0.52
83	uniprotKB_sptr	Q16775	GLO2_HUMAN	28,860.02	7.19	2	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ(EC 3.1.2.6)(グリオキサラーゼII)(Glx II,Glyoxalase II)	2.64
37	uniprotKB_sptr	P01876	IGHA1_HUMAN	37,654.65	6.26	4	Igアルファ-1鎖C領域	0.66
82	uniprotKB_sptr	P01877	IGHA2_HUMAN	53,776.22	6.91	2	Igアルファ-2鎖C領域	0.51
27	uniprotKB_sptr	P01859	IGHG2_HUMAN	35,884.65	8.01	2	Igガンマ-2鎖C領域	0.87
24	uniprotKB_sptr	P01859	IGHG2_HUMAN	35,884.65	8.01	2	Igガンマ-2鎖C領域	0.22
67	uniprotKB_sptr	P01871	IGHM_HUMAN	65,290.86	8.57	2	Igミュー鎖C領域	0.59
29	uniprotKB_sptr	Q6GMW0	Q6GMW0_HUMAN	25,772.87	6.31	4	IGKV1-5タンパク質	0.71
35	uniprotKB_sptr	Q16270	IBP7_HUMAN	26,443.00	8.25	4	インスリン様増殖因子結合タンパク質7前駆物質(IGFBP-7,Insulin-like growth factor-binding protein 7)(IBP-7)(IGF結合タンパク質7)(MAC25タンパク質)(プロスタサイクリン刺激因子)(PGI2刺激因子)(IGFBP-rP1)	0.02
31	uniprotKB_sptr	Q92876	KLK6_HUMAN	26,855.73	7.57	5	カリクレイン-6前駆物質(EC 3.4.21.-)(プロテアーゼM)(ニューロシン)(ザイム)(SP59)(セリンプロテアーゼ9)(セリンプロテアーゼ18)	0.41
11	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	59,510.71	5.18	10	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(ケラチン-10)(K10)	0.76
11	uniprotKB_sptr	P13645	K1C10_HUMAN	59,510.71	5.18	8	ケラチン、I型細胞骨格10(サイトケラチン-10)(CK-10)(ケラチン-10)(K10)	0.53

10

20

19	uniprotKB_sptr	P02533	K1C14_HUMAN	51,490.33	5.13	3	ケラチン、I型細胞骨格14(サイトケラチン-14)(K14)(ケラチン-14)(ケラチン-14)(CK-14)	0.59
26	uniprotKB_sptr	P02533	K1C14_HUMAN	51,621.52	5.13	2	ケラチン、I型細胞骨格14(サイトケラチン-14)(K14)(ケラチン-14)(ケラチン-14)(CK-14)	0.68
12	uniprotKB_sptr	P08779	K1C16_HUMAN	51,267.84	5.03	5	ケラチン、I型細胞骨格16(サイトケラチン-16)(K16)(ケラチン-16,Cytokeratin-16)(CK-16)	0.60
10	uniprotKB_sptr	P35527	K1C9_HUMAN	62,129.47	5.24	12	ケラチン、I型細胞骨格9(サイトケラチン-9)(CK-9)(ケラチン-9)(K9)	0.76
8	uniprotKB_sptr	P35527	K1C9_HUMAN	62,129.47	5.24	12	ケラチン、I型細胞骨格9(サイトケラチン-9)(CK-9)(ケラチン-9)(K9)	0.79
5	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66,017.70	8.45	18	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(ケラチン-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.73
7	uniprotKB_sptr	P04264	K2C1_HUMAN	66,017.70	8.45	15	ケラチン、II型細胞骨格1(サイトケラチン-1)(CK-1)(ケラチン-1)(K1)(67kDaサイトケラチン)(毛髪アルファタンパク質)	0.63
14	uniprotKB_sptr	P35908	K22E_HUMAN	65,865.35	8.35	5	ケラチン、II型細胞骨格2上皮(サイトケラチン-2e)(K2e)(CK 2e)(ケラチン-2)	1.08
9	uniprotKB_sptr	P35908	K22E_HUMAN	65,865.35	8.35	7	ケラチン、II型細胞骨格2上皮(サイトケラチン-2e)(K2e)(CK 2e)(ケラチン-2)	0.33
18	uniprotKB_sptr	P13647	K2C5_HUMAN	62,378.37	8.14	4	ケラチン、II型細胞骨格5(サイトケラチン-5)(CK-5)(ケラチン-5)(K5)(58kDaサイトケラチン)	0.69
20	uniprotKB_sptr	P13647	K2C5_HUMAN	62,378.37	8.14	3	ケラチン、II型細胞骨格5(サイトケラチン-5)(ケラチン-5)(K5)(58kDaサイトケラチン)	0.58
15	uniprotKB_sptr	P02538	K2C6A_HUMAN	60,044.97	8.38	5	ケラチン、II型細胞骨格6A(サイトケラチン6A)(CK 6A)(K6aケラチン)(サイトケラチン6D)(CK 6D)	0.58
65	uniprotKB_sptr	P01042	KNG1_HUMAN	69,896.73	6.29	2	キニノーゲン-1前駆物質(アルファ-2-チオールプロテイナーゼ阻害剤)[キニノーゲン-1重鎖;ブラジキニン(カリジンI);リシルブラジキニン(カリジンII);キニノーゲン-1軽鎖;低分子量成長促進因子を含有]	3.97
30	uniprotKB_sptr	A2NUT2	A2NUT2_HUMAN	25,020.97	8.45	3	ラムダ鎖前駆物質(アミノ酸-20~215)	0.89
46	uniprotKB_sptr	A2NUT2	A2NUT2_HUMAN	24,960.80	5.40	2	ラムダ鎖前駆物質(アミノ酸-20~215)	0.35
43	uniprotKB_sptr	P61626	LYSC_HUMAN	16,537.02	9.50	3	リゾチームC前駆物質(EC 3.2.1.17)(1,4-ベータN-アセチルムラミ	2.21

30

40

										ダーゼC)	
81	uniprotKB_sptr	P40925	MDHC_HUMAN	36,426.13	7.61	2				リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、細胞質内(EC 1.1.1.37)(細胞質ゾリリンゴ酸デヒドロゲナーゼ)	1.11
62	uniprotKB_sptr	P02795	MT2_HUMAN	6,042.16	8.38	2				メタロチオネイン-2(MT-2)(メタロチオネインII)(MT-II)(メタロチオネイン2A)	6.02
60	uniprotKB_sptr	P02795	MT2_HUMAN	6,042.16	8.38	3				メタロチオネイン-2(MT-2)(メタロチオネインII)(MT-II)(メタロチオネイン2A)	4.73
62	uniprotKB_sptr	P25713	MT3_HUMAN	6,926.97	5.00	3				メタロチオネイン-3(MT-3)(メタロチオネインIII)(MT-III)(成長抑制因子)(GIF)(GIFB)	4.57
76	uniprotKB_sptr	P78559	MAP1A_HUMAN	##### #	4.86	2				微小管関連タンパク質1A(MAP 1A, Microtubule-associated protein 1A)(増殖関連タンパク質p80)[MAP1軽鎖LC2を含有]	1.56
58	uniprotKB_sptr	P46821	MAP1B_HUMAN	192,380.44	4.50	3				微小管関連タンパク質1B(MAP 1B, Microtubule-associated protein 1B)[MAP1軽鎖LC1を含有]	1.83
70	uniprotKB_sptr	P02686_1 SOFORM 3	MBP_HUMAN	21,493.21	11.45	3				ミエリン塩基性タンパク質(MBP)(ミエリンA1タンパク質)(ミエリン膜脳炎誘発性タンパク質)[アインフォーム3]	1.60
90	uniprotKB_sptr	P20916	MAG_HUMAN	69,040.49	4.97	2				ミエリン関連糖タンパク質前駆物質(Siglec-4a)	0.98
53	uniprotKB_sptr	P02144	MYG_HUMAN	17,052.62	8.02	2				ミオグロビン	3.09
29	uniprotKB_sptr	O94760	DDAH1_HUMAN	31,121.78	5.64	6				N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1(EC 3.5.3.18)(ジメチルアルギニナーゼ-1)(ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1)(DDAH1)(DDAH-1)	2.21
44	uniprotKB_sptr	P07197	NFM_HUMAN	102,316.84	4.90	5				ニューロフィラメントミディアムポリペプチド(NF-M)(ニューロフィラメントトリプレットMタンパク質)(160kDaニューロフィラメントタンパク質)(ニューロフィラメント3)	2.62
47	uniprotKB_sptr	P59665	DEF1_HUMAN	10,244.95	6.54	2				好中球デフェンシン1前駆物質(HNP-1)(HP-1)(HP1)(デフェンシン、アルファ1)[HP 1~56;好中球デフェンシン2(HNP-2)(HP-2)(HP2)を含有]	0.17
98	uniprotKB_sptr	P10451	OSTP_HUMAN	33,016.56	4.59	2				オステオポンチン前駆物質(骨シアロタンパク質1)(分泌リンタンパク質1)(SPP-1)(尿路結石タンパク質)(ネフロポンチン(Nephropontin))(ウロポンチン)	0.52
15	uniprotKB_sptr	P62937	PPIA_HUMAN	18,012.50	8.34	10				ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA(EC 5.2.1.8)(PPI	3.28

10

20

										ase A)(ロタマーゼ(Rotamase)A)(シクロフィリンA)(サイクロスポリン結合タンパク質)	
74	uniprotKB_sptr	Q06830	PRDX1_HUMAN	22,110.36	8.59	3				ペルオキシレドキシニン-1(EC 1.11.1.15)(チオレドキシニンペルオキシダーゼ2)(チオレドキシニン依存性ペルオキシレドクターゼ2)(増殖関連遺伝子タンパク質)(PAG)(ナチュラルキラー細胞増強因子A)(NKEF-A)	1.24
51	uniprotKB_sptr	P30041	PRDX6_HUMAN	208,794.31	5.37	4				ペルオキシレドキシニン-6(EC 1.11.1.15)(酸化防止タンパク質2)(1-Cysペルオキシレドキシニン)(1-Cys PRX)(酸性カルシウム非依存性ホスホリパーゼA2)(EC 3.1.1.-)(aiPLA2)(非セレングルタチオンペルオキシダーゼ)(EC 1.11.1.7)(NSGPx)(24kDaタンパク質)(肝臓2Dページスポット40)(赤血球ページスポット12)	1.69
19	uniprotKB_sptr	P30086	PEBP1_HUMAN	21,056.79	7.76	7				ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1(PEBP-1)(前立腺結合タンパク質)(HCNPpp)(ニューロポリペプチド(Neuropolypeptide)h3)(Rafキナーゼ阻害剤タンパク質)(RKIP)[海馬コリン作動性神経刺激ペプチドを含有(HCNP)]	3.35
28	uniprotKB_sptr	P36955	PEDF_HUMAN	46,342.31	6.12	6				色素上皮由来因子前駆物質(PEDF)(セルピン-F1)(EPC-1)	0.15
54	uniprotKB_sptr	P00747	PLMN_HUMAN	63,245.42	6.99	2				プラスミノーゲン前駆物質(EC 3.4.21.7)[プラスミン重鎖A;活性化ペプチド;アンジオスタチン;プラスミン重鎖A、短形態;プラスミン軽鎖Bを含有]	2.52
40	uniprotKB_sptr	P02775	SCYB7_HUMAN	6,982.36	9.64	3				血小板塩基性タンパク質前駆物質(PBP)(C-X-Cモチーフケモカイン7)(小分子誘発性サイトカインB7)(白血球由来増殖因子)(LDGF)(マクロファージ由来増殖因子)(MDGF)[結合組織活性化ペプチドII(CTAP-III)(低親和性血小板因子IV)(LA-PF4);TC-2;結合組織活性化ペプチドIII(1~81)(CTAP-III(1~81));ベータトロンボグロブリン(ベータ-TG);好中球活性化ペプチド2(74)(NAP-2(74));好中球活性化ペプチド2(73)(NAP-2(73));好中球活性化ペプチド2(NAP-2);TC-1;好中球活性化ペプチド2(1~66)(NAP-2(1~66));好中球活性化ペプチド2(1~63)(NAP-2(1~63))を含有]	3.13
46	uniprotKB_sptr	P20742	PZP_HUMAN	140,363.79	5.95	2				妊娠関連タンパク質前駆物質	0.78
45	uniprotKB_sptr	P07602	SAP_HUMAN	26,308.66	5.88	3				プロアクチベーターポリペプチド前駆物質[サボシン-A(プロテインA);サボシン-B-Val;サボシン-B(スフィンゴ脂質アクチベータータンパク質1)(SAP-1)(セレブロシド硫酸エステル活性化因子)(CS	1.54

30

40

							Act)(ジスペルシン(Dispersin))(スルファチド/GM1活性化因子);サボシンC(コペータ-グルコシダーゼ)(A1活性化因子)(グルコシルセラミダーゼ活性化因子)(スフィンゴ脂質アクトベータータンパク質2)(SAP-2);サボシンD(プロテインC)(構成成分C)を含有]	
50	uniprotKB_sptr	P07602	SAP_HUMAN	26,308.66	5.88	4	プロアクトベーターポリペプチド前駆物質[サボシン-A(プロテインA);サボシン-B-Val;サボシン-B(スフィンゴ脂質アクトベータータンパク質1)(SAP-1)(セレプロシド硫酸エステル活性化因子)(CS Act)(ジスペルシン(Dispersin))(スルファチド/GM1活性化因子);サボシンC(コペータ-グルコシダーゼ)(A1活性化因子)(グルコシルセラミダーゼ活性化因子)(スフィンゴ脂質アクトベータータンパク質2)(SAP-2);サボシンD(プロテインC)(構成成分C)を含有]	1.70
66	uniprotKB_sptr	P07737	PROF1_HUMAN	15,054.23	8.79	2	プロフィリン-1(プロフィリン1)	3.81
33	uniprotKB_sptr	P41222_C HAIN_0	PTGDS_HUMAN	18,698.03	8.68	5	プロスタグランジンH2 D-イソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リポカラリタイププロスタグランジンDシターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシターゼ)(プロスタグランジンD2シターゼ)(PGD2シターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレースタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	0.20
17	uniprotKB_sptr	P41222_C HAIN_0	PTGDS_HUMAN	18,698.03	8.68	9	プロスタグランジンH2 D-イソメラーゼ前駆物質(EC 5.3.99.2)(リポカラリタイププロスタグランジンDシターゼ)(グルタチオン非依存性PGDシターゼ)(プロスタグランジンD2シターゼ)(PGD2シターゼ)(PGDS2)(PGDS)(ベータトレースタンパク質)(セレブリン-28)[CHAIN0]	0.64
56	uniprotKB_sptr	P00734	THRB_HUMAN	70,008.83	5.69	2	プロトロンビン前駆物質(EC 3.4.21.5)(凝固第II因子)[活性化ペプチド断片1;活性化ペプチド断片2;トロンビン軽鎖;トロンビン重鎖を含有]	2.64
18	uniprotKB_sptr	Q6N030	Q6N030_HUMAN	57,019.61	8.48	2	推定上の特徴づけられていないタンパク質DKFZp686I15212	0.37
34	uniprotKB_sptr	P14618_I SOFORM M1	KPYM_HUMAN	58,062.08	7.99	5	ビルビン酸キナーゼアイソザイムM1/M2(EC 2.7.1.40)(ビルビン酸キナーゼ筋肉アイソザイム)(ビルビン酸キナーゼ2/3)(細胞質ゾル甲状腺ホルモン結合タンパク質)(CTHBP,Cytosolic thyroid hormone-binding protein)(THBP1)[アイソフォームM1]	1.61
59	uniprotKB_sptr	A0N5G5	A0N5G5_HUMAN	12,766.37	9.45	2	リウマチ因子D5軽鎖(断片)	1.06

10

20

101	uniprotKB_sptr	A0N5G5	A0N5G5_HUMAN	12,766.37	9.45	2	リウマチ因子D5軽鎖(断片)	0.53
85	uniprotKB_sptr	P05060	SCG1_HUMAN	78,246.25	5.03	2	セクレトグラニン-1前駆物質(セクレトグラニン1)(Sg1)(クロモグラニン-B)(CgB)[GAWKペプチド;CCBペプチドを含有]	1.29
69	uniprotKB_sptr	Q13228	SBP1_HUMAN	52,390.99	6.03	2	セレン結合タンパク質1(56kDaセレン結合タンパク質)(SP56)	1.42
6	uniprotKB_sptr	P02787	TRFE_HUMAN	77,049.89	6.97	23	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル-結合グロブリン)	0.91
5	uniprotKB_sptr	P02787_C HAIN_0	TRFE_HUMAN	76,959.79	7.16	29	セロトランスフェリン前駆物質(トランスフェリン)(シデロフィリン)(ベータ-1-メタル-結合グロブリン) [CHAIN 0]	0.36
48	uniprotKB_sptr	Q9H299	SH3L3_HUMAN	10,437.72	5.03	3	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質(SH3ドメイン結合タンパク質1)(SH3BP-1)	1.88
84	uniprotKB_sptr	Q9H299	SH3L3_HUMAN	23,838.08	9.43	2	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質(SH3ドメイン結合タンパク質1)(SH3BP-1)	1.76
52	uniprotKB_sptr	O75368	SH3L1_HUMAN	12,774.25	5.53	4	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	2.77
48	uniprotKB_sptr	Q01082	SPTB2_HUMAN	274,609.33	5.40	4	スペクトリンベータ鎖、脳1(スペクトリン、非赤血球ベータ鎖1)(ベータIIスペクトリン)(フォドリベータ鎖)	2.25
42	uniprotKB_sptr	P16949	STMN1_HUMAN	17,336.53	5.94	4	スタスミン(リンタンパク質p19)(pp19)(オンコプロテイン18)(Op18)(白血病関連リンタンパク質p18)(pp17)(プロソリン)(メタブラチン)(タンパク質Pr22)	2.15
49	uniprotKB_sptr	P00441	SODC_HUMAN	16,122.00	6.04	4	スーパーオキシドジスムターゼ[Cu-Zn](EC 1.15.1.1)	1.88
94	uniprotKB_sptr	P10599	THIO_HUMAN	9,451.99	6.56	2	チオレドキシシン(Trx)(ATL由来因子)(ADF)(表面結合スルフヒドリルタンパク質)(SASP)	1.86
77	uniprotKB_sptr	P04216	THY1_HUMAN	12,553.22	9.33	2	Thy-1膜糖タンパク質前駆物質(Thy-1抗原)(CD90抗原)(CDw90)	1.34
45	uniprotKB_sptr	P60174	TPIS_HUMAN	26,669.50	6.90	4	トリオースリン酸イソメラーゼ(EC 5.3.1.1)(TIM)(トリオースリン酸イソメラーゼ)	1.41
99	uniprotKB_sptr	P09936	UCHL1_HUMAN	24,824.35	5.45	2	ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL1(EC 3.4.19.12)(EC 6.-.-)(UCH-L1,Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 isozyme L1)(ユビキチンチオエステラーゼL1)(ニューロン細胞質内タンパク質9.5)(PGP 9.5)(PGP9.5)	2.06
69	uniprotKB_sptr	P62988	UBIQ_HUMAN	25,761.65	7.78	2	ユビキチン	2.16
36	uniprotKB_sptr	P62988	UBIQ_HUMAN	61,523.80	7.25	5	ユビキチン	2.76

30

40

74	uniprotKB_sptr	P02774	VTDB_HUMAN	52,963.66	5.47	2	ビタミンD結合タンパク質前駆物質(DBP)(群特異成分)(Gc-グロブリン)(VDB)	0.83
73	uniprotKB_sptr	P25311	ZA2G_HUMAN	34,244.70	5.85	3	亜鉛アルファ-2-糖タンパク質前駆物質(Znアルファ-2-糖タンパク質)(Znアルファ-2-GP)	0.60

【 0 2 4 6 】

S 1 0 0 B、グリア線維酸性タンパク質 (G F A P)、及びミエリン塩基性タンパク質

50

(MBP) などの数個のタンパク質が、脳卒中又は他の脳病理に関連することが既に報告されている (Herrmann, M., Vos, P., Wunderlich, M. T., de Bruijn, C., and Lamers, K. J. B. (2000) Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke - A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31, 2670-2677、Jauch, E. C., Lindsell, C., Broderick, J., Fagan, S. C., Tilley, B. C., Levine, S. R., and Grp, N. r.-P. S. S. (2006) Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke - The National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke* 37, 2508-2513、Lamers, K. J. B., Vos, P., Verbeek, M. M., Rosmalen, F., van Geel, W. J. A., and van Engelen, B. G. M. (2003) Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res. Bull.* 61, 261-264)。S 1 0 0 B タンパク質は、Exp b においてであるが、1つの固有のペプチドのみによって実際に同定された(11.67のPhenyxペプチドスコア)。そのIC/P比は、3.38であった。死後CSFにおいて増加することが最初に発見されたタンパク質であるGSTP1 (Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C. G., Burgess, J. A., Hughes-Frutiger, S., Burkhard, P. R., Sanchez, J. C., and Hochstrasser, D. F. (2004) Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics* 4, 2234-2241、Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 5, 1674-1681) は、Exp a において2.79のIC/P比を示した。数個のペルオキシレドキシンもまた、表7において報告されるようにIC試料において増加した。

10

20

【0247】

【表 1 1】

表7:微小透析試料におけるIC/P比の増加

タンパク質の説明	IC/P比 (Exp _a)	IC/P比 (Exp _b)	
アシルCoA結合タンパク質	1.95	2.67	
ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質	1.49	2.09	
コアクトシン様タンパク質	1.72	2.04	
補体C4-A前駆物質	2.50	1.10	
シスタチン-B		2.68	10
システイングリシンリッチタンパク質1	3.33	2.88	
脂肪酸結合タンパク質、脳	2.65		
フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	2.97	0.61	
グルタチオンS-トランスフェラーゼP	2.79		
ヘテロ核リボヌクレオタンパク質G	2.35		
メタロチオネイン-3	2.10	2.79	
ミエリン塩基性タンパク質[アイソフォーム3]	1.71	3.11	
好中球デフェンシン1前駆物質		2.45	
パラレミン	3.52		20
ペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼA	2.45	1.60	
ペルオキシレドキシニン-2	2.72		
ペルオキシレドキシニン-6	2.15	2.16	
ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1	2.06	1.60	
血漿レチノール結合タンパク質前駆物質	2.83	1.63	
プラスミノーゲン前駆物質	2.27		
血小板塩基性タンパク質前駆物質	2.51	0.85	
プロフィリン-1	2.40	0.91	
SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	2.17	1.92	30
チオレドキシニン	2.17		
ユビキチン	2.09	1.50	

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する。太字で報告される値は、両方の患者(つまり、患者a及びb)についての比の増加(つまり2を上回る)を示す。

【0248】

40

カットオフ未満の比の値のために表において報告されなかったが、PRDX1は、Exp_bにおいて1.93の比で測定された。P及びCT微小透析試料の比較において、PRDX1及びペルオキシレドキシニン-6 (PRDX6)は、Exp_fにおいて1.24及び1.69の比でそれぞれ測定された。

【0249】

【表 1 2】

表8.微小透析試料におけるIC/CT比の増加

タンパク質の説明	IC/CT比 (Exp _c)	IC/CT比 (Exp _d)	
アシルCoA結合タンパク質	12.53		
アポリポタンパク質A-II前駆物質		2.28	
アポリポタンパク質A-IV前駆物質		3.79	
カルボニックアンヒドラーゼ1	0.29	4.78	10
カルボニックアンヒドラーゼ2		3.18	
キチナーゼ-3様タンパク質1前駆物質	2.44		
コフィリン-1		2.00	
シスタチン-B		2.10	
フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	0.46	2.33	
フラビンレダクターゼ		2.22	
グリア線維酸性タンパク質	4.13	0.37	
ヘモグロビンサブユニットアルファ		3.21	
ヒストンH1.2		2.97	
ヒストンH1.5		2.03	20
リゾチームC前駆物質		2.75	
N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1	6.31		
ニューロフィラメントミディアムポリペプチド	4.68		
好中球デフェンシン1前駆物質		4.23	
ペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼA	8.25	1.69	
ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1	4.88		
チモシンベータ-10	4.16		
チモシンベータ-4	2.39		30
トリオースリン酸イソメラーゼ	3.50		
トロポミオシンアルファ-3鎖		2.04	

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する

。

【 0 2 5 0 】

【表 1 3】

表9.微小透析試料におけるP/CT比の増加

タンパク質の説明	P/CT比 (Exp _e)	P/CT比 (Exp _f)	
アクアポリン-4		2.00	
コアクトシン様タンパク質		2.64	
シスタチン-B	2.16	1.81	
システイングリシンリッチタンパク質1		4.58	
ジアゼパム結合阻害剤、スプライス形態1c		2.21	10
フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	2.98	1.05	
グリア線維酸性タンパク質	0.31	2.33	
ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ		2.64	
キニノーゲン-1前駆物質	3.97		
リゾチームC前駆物質	2.21		
メタロチオネイン-2	6.02	4.73	
メタロチオネイン-3		4.57	
ミオグロビン	3.09		
N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1		2.21	20
ニューロフィラメントミディウムポリペプチド		2.62	
ペプチジルプロリルシス-トランスイソメラーゼA		3.28	
ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1		3.35	
プラスミノーゲン前駆物質	2.52		
血小板塩基性タンパク質前駆物質	3.13		
プロフィリン-1	3.81		
プロトロンビン前駆物質	2.64		
SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質		2.77	30
スペクトリンベータ鎖、脳1		2.25	
スタスミン		2.15	
ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL1		2.06	
ユビキチン	2.16	2.76	

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する。太字で報告される値は、両方の患者(つまり、患者e及びf)についての比の増加(つまり2を上回る)を示す。

40

【0 2 5 1】

0.5より下の比を有するタンパク質を表10~12に報告する。

【0 2 5 2】

【表 1 4】

表10:微小透析試料におけるIC/P比の減少

タンパク質の説明	IC/P比 (Exp _a)	IC/P比 (Exp _b)
アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質	0.48	0.47
アルファ1アンチトリプシン前駆物質	0.61	0.40
アルファ1B糖タンパク質前駆物質		0.46
カルボニックアンヒドラーゼ1	0.45	1.60
セルロプラスミン前駆物質		0.44
フィブリノゲンベータ鎖前駆物質		0.46
フィブリノゲンガンマ鎖前駆物質		0.41
ハプトグロビン前駆物質	0.46	0.36
ヘモグロビンサブユニットアルファ	0.34	0.70
ヘモグロビンサブユニットベータ	0.37	0.80
Igカッパ鎖C領域	0.51	0.28
ケラチン、I型細胞骨格10	0.72	0.39
セロトランスフェリン前駆物質	0.42	0.50
血清アルブミン前駆物質	0.40	0.33

10

20

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する。太字で報告される値は、両方の患者(つまり、患者a及びb)についての比の増加(つまり0.5より下)を示す。

【 0 2 5 3】

【表 15】

表11:微小透析試料におけるIC/CT比の減少

タンパク質の説明	IC/CT比 (Exp _c)	IC/CT比 (Exp _d)
アルファ1アンチトリプシン前駆物質		0.49
アルファ-2-マクログロブリン前駆物質		0.36
ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質	0.80	0.44
カルボニックアンヒドラーゼ1	0.29	4.68
クロモグラニンA前駆物質	0.29	
補体C3前駆物質		0.43
シスタチンC前駆物質	0.62	0.03
ダームシジン前駆物質	0.85	0.35
フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	0.46	2.33
フィブリノゲンベータ鎖前駆物質		0.38
グリア線維酸性タンパク質	4.13	0.37
ハプトグロビン前駆物質	0.83	0.14
Igガンマ-2鎖C領域		0.18
ケラチン、I型細胞骨格10	0.99	0.48
ケラチン、II型細胞骨格2上皮	0.97	0.43
ラムダ鎖前駆物質		0.21
ミエリン塩基性タンパク質		0.30
プロスタグランジンH2 Dイソメラーゼ前駆物質	0.27	0.46
推定上の特徴づけられていないタンパク質		0.15
セロトランスフェリン前駆物質	1.47	0.42
血清アルブミン前駆物質	1.17	0.38
SNC73タンパク質		0.30

10

20

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する。太字で報告される値は、両方の患者(つまり、患者c及びd)についての比の増加(つまり0.5より下)を示す。

30

【0254】

【表 16】

表12:微小透析試料におけるP/CT比の減少

タンパク質の説明	P/CT比 (Exp _e)	P/CT比 (Exp _f)
アルファ1アンチトリプシン	1.05	0.35
アルファ-1-酸性糖タンパク質1前駆物質	1.38	0.38
アルファ-2-マクログロブリン前駆物質	0.68	0.36
アルファエノラーゼ	0.45	
アポリポタンパク質E前駆物質	0.30	
ベータ-2-ミクログロブリン	0.92	0.25
ベータ-Ala-Hisジペプチターゼ前駆物質	0.32	
セルロプラスミン前駆物質		0.45
クラスタリン	0.49	
補体成分3	0.72	0.48
補体因子B前駆物質	1.15	0.36
シスタチンC前駆物質	0.17	0.38
ダームシジン前駆物質		0.34
エクトヌクレオチドピロホスファターゼ/ホスホジ エステラーゼファミリーメンバー2前駆物質	0.46	
グリア線維酸性タンパク質	0.31	2.33
ハプトグロビン前駆物質		0.45
ヘモグロビンサブユニットアルファ	0.11	0.55
ヘモグロビンサブユニットベータ	0.11	0.59
Igガンマ-2鎖C領域	0.87	0.22
インスリン様増殖因子結合タンパク質7前駆物質	0.02	
カリクレイン-6前駆物質		0.41
ケラチン、II型細胞骨格2上皮	1.08	0.33
ラムダ鎖前駆物質	0.89	0.35
好中球デフェンシン1前駆物質	0.17	
色素上皮由来因子前駆物質	0.15	
プロスタグランジンH2 Dイソメラーゼ前駆物質	0.20	0.64
推定上の特徴づけられていないタンパク質DKFZp6 86I15212		0.37
セロトランスフェリン前駆物質	0.91	0.36

空のケースは、研究した試料におけるタンパク質同定/定量化の欠如に由来する。太字で報告される値は、両方の患者(つまり、患者e及びf)についての比の増加(つまり0.5より下)を示す。

【実施例 2】

【0255】

候補バイオマーカーの検証

イムノアッセイ実験は、MS/MSにより得られた定量的測定値を確認するために実行した。評価されることとなる候補バイオマーカーの選択は、市販及び社内で開発したイムノアッセイの有用性に本質的に基づいた。

【0256】

10

20

30

40

50

G S T P 1 タンパク質 (M W = 2 3 k D a) は、図 2 において例証されるように、プールした微小透析液試料 (n = 3) において免疫プロット分析によりプローブした。C T と比較した I C 微小透析液における増加は、疑う余地がなく、死後及び死前 C S F の以前の研究と同様に T M T ベースの発見による結果を確認した (Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C. G., Burgess, J. A., Hughes-Frutiger, S., Burkhard, P. R., Sanchez, J. C., and Hochstrasser, D. F. (2004) Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. Proteomics 4, 2234-2241、Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. J. Proteome Res. 5, 1674-1681) 。

10

【 0 2 5 7 】

次に、E L I S A は、対照及び脳卒中患者 (n = 2 8) の血清に対して G S T P 1、P R D X 1、及び S 1 0 0 B について実行した。E L I S A 結果は、図 3 に示し、表 1 3 に要約する。

【 0 2 5 8 】

【 表 1 7 】

表13.ELISAを用いて定量化した血清試料におけるGSTP1、PRDX1、及びS100Bレベルについての結果の要約

20

	対照(n = 14)	脳卒中(n = 14)	p [§]
GSTP1 (μ g · L ⁻¹)			
平均±標準偏差	16.9±5.1	143.1±67.5	0.0002
中央値(最小-最大)	15.7 (8.6-29.0)	119.0 (63.5-320.0)	
PRDX1 (ng · L ⁻¹)			
平均±標準偏差	7.3±12.7	145.7±144.0	0.0001
中央値(最小-最大)	0.0 (0.0- 41.2)	81.9 (26.7-519.5)	
S100B (μ g · L ⁻¹)			
平均±標準偏差	7.5±10.0	78.9±113.1	0.0093
中央値(最小-最大)	1.8 (0.0-28.7)	23.1 (0.0-369.2)	

30

§ ウィルコクソン順位和検定

【 0 2 5 9 】

G S T P 1 は、対照と比較して、脳卒中患者の血液において著しく上昇することが分かった (p = 0 . 0 0 0 2、ウィルコクソン順位和検定)。脳卒中患者及び対照の間の血液中の平均比は 8 . 4 7 であった (表 1 3)、つまり、脳微小透析試料において分かった比 I C / P よりも 3 倍高かった (E x p a、表 7)。ペルオキシレドキシシンファミリーの間で、血液 P R D X 1 は、p = 0 . 0 0 0 1 の有意水準で対照と脳卒中患者を区別するのを可能にした。約 2 0 倍のそのレベルの増加が、脳卒中集団において観察された。文献において先に記載されている結果に従って (Buttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., and Kuhn, W. (1997) S-100 protein: Serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. Stroke 28, 1961-1965、Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., and Kaps, M. (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. Stroke 28, 1956-1960)、血液 S 1 0 0 B の濃度測定値は、対照よりも脳卒中患者において有意に高度であった (p = 0 . 0 0 9 3)。

40

【 0 2 6 0 】

したがって、本発明者らは、虚血発作患者の I C、P、及び C T 由来の微小透析試料の

50

比較によって例証した、脳卒中のタンパク質マーカを開示する。ヒト脳微小透析液は、ペプチド等電点電気泳動分画に連結されたアイソバリックタギング技術及びRP-LC MS/MS分析を使用して分析した。IC微小透析液中のGSTP1、PRDX1、及びS100Bのレベルの増加は、プールした微小透析試料に対する免疫プロット並びに/又は対照及び脳卒中患者の血液に対するELISAによりさらに検証した。したがって、本発明者らは、本明細書において示されるマーカー及び方法の有用性及び適用可能性を明確に確立した。

【実施例3】

【0261】

微小透析試料中のタンパク質量

10

研究下の異なる微小透析試料の1-D PAGEによる分析は、試料の間のタンパク質の全濃度においてわずかに異なるパターン及び大きな差を明らかにした(図1及び図5)。これらの差は、おそらく、生物学的差及び/又は脳卒中の重症度に加えて、例えば、微小透析膜を通しての回収の問題から結果として生じ得る。脳卒中患者のCT微小透析液の以前の研究において、18の試料中でタンパク質濃度は、 $0.083 \sim 0.395 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ に及び、平均含有量は $0.21 \pm 0.11 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ であることが決定された(Maurer, M. H., Berger, C., Wolf, M., Futterer, C. D., Feldmann, R. E., Jr., Schwab, S., and Kuschinsky, W. (2003) The proteome of human brain microdialysate. *Proteome Science* 1, 7)。グルタミン酸、グリセロール、乳酸、及びピルビン酸などのより小さな分子は、CT微小透析液において、 $3.9 \pm 0.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $38.9 \pm 1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $2.0 \pm 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、及び $58.4 \pm 3.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ で、同じ試料採取期間にわたり50の患者においてそれぞれ測定されたのに対して、ICにおいて、同じ分子についての中央値は、それぞれ、 $196.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($126.0 \sim 453.0$ に及ぶ)、 $600.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($464.2 \sim 1187.1$ に及ぶ)、 $6.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($0.1 \sim 12.0$ に及ぶ)、及び $17.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($4.2 \sim 591.7$ に及ぶ)であった(Berger, C., Dohmen, C., Maurer, M. H., Graf, R., and Schwab, S. (2004) Cerebral microdialysis in stroke. *Nervenarzt* 75, 113-123)。手短かに言えば、タンパク質濃度は、CT微小透析液において試料ごとによりかなり変動したのに対して、小分子の濃度は、CTが均一であったが、ICにおいてより不均一であった。したがって、大きなタンパク質の濃度変化は、IC試料及びP微小透析液において予想され得る。タンパク質濃度変化を本明細書で確認した。

20

30

【0262】

全タンパク質濃度における差異のために、試料の均一化は、定量的プロテオミクス研究を実行するために必要であった。

【0263】

比較するための試料は、定量分析の前にそれらのタンパク質量(つまり重量)によって均一にした。

【0264】

1-D PAGE画像は、濃度測定により試料濃度を比較するために使用した(実験手順を参照されたい)。この相対的タンパク質量定量化に従って、比較するための対の間の等タンパク質量を、TMT2ベースの定量的アセスメントのために使用した。

40

【0265】

結果として、さらなる標準化をTMT2定量的データに対して実行した。本発明者らは、ほとんどのタンパク質、そのため、ほとんどのペプチド及びレポーターイオンシグナルが、試料の間で等しいはずであることを仮定した(図4に示す)。したがって、両方のTMT2標識対のペプチド相対的存在量の度数分布の間の共通の面積は、最大となる必要があった。そのうえ、この処理は、1-D PAGE画像から実行した第1の標準化と一貫性があった。

【実施例4】

【0266】

50

タンパク質の増加及び減少

本発明者らの知っている限りでは、これは、ヒト脳微小透析液の最も広範囲なプロテオミクス研究であり、脳虚血を標的にする最初のものであるMaurer, M. H. (2008) Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). *Mass Spectrom. Rev.*, DOI:10.1002/mas.20213。研究を通して、本発明者らは、脳卒中患者の脳におけるECFのモニタリングとして、ヒト脳微小透析液の定量的マップを得た。微小透析によりプローブした脳領域によって、脳卒中の関連タンパク質マーカーを発見した。

【0267】

発見したタンパク質の多くは、CSFにおいて以前に同定されている (Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921-2931、Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 5, 1674-1681、Zougman, A., Pilch, B., Podtelejnikov, A., Kiehnopf, M., Schnabel, C., Kurnar, C., and Mann, M. (2008) Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J. Proteome Res.* 7, 386-399)。より正確には、比較した対内で量が増加した数個のタンパク質 (表7~9) は、死前及び死後CSFの比較研究において以前に同定されている (Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921-2931)。これは、例えば、シスタチン-B、GFAP、S100B、PRDX1、及びペルオキシレドキシニン-2 (PRDX2) についてのケースであった。その以前の研究において、PRDX1は、死前CSFと比較して、死後CSFにおいて14.74の比で増加した。両方の研究の間の定量的結果の多くの相関は、重症の脳外傷のモデルとして死後CSFを検証しただけではなく、微小透析試料で得られた定量的プロテオームマップの値を強調した。

【0268】

表7~9において、いくつかのタンパク質は、量の増加及び減少を示した。これは、フィブリノゲンアルファ鎖 (FIBA)、血小板塩基性タンパク質、プロフィリン-1、カルボニックアンヒドラーゼ1、及びGFAPについてのケースであった。95kDaの分子量で、FIBAは、透析膜を通して非効率的に回収された可能性がある。差は、他のタンパク質について直接、説明することができなかったが、例えば、GFAP (50kDa) は、ピメンチン、デスミン、及びアネキシンのような他のタンパク質と二量体化し、オリゴマー形成し、共重合し得る (da Silva, S. F., Correa, C. L., Tortelote, G. G., Einicker-Lamas, M., Martinez, A. M. B., and Allodi, S. (2004) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Uca cordatus* (Crustacea, Decapoda). *Biol. Cell* 96, 727-734)。次いで、その回収が改変された可能性がある。本発明の方法における試料が微小透析液以外である場合、例えば、試料がCSF又は血液である場合、そのような試料を使用する場合に分子量カットオフがないので、そのような問題 (複数可) は、好都合にも回避される。

【0269】

虚血発作は、脳に供給される血流の妨害によって引き起こされる。脳血流は、ペナンプラにおいて減少し、梗塞中心部においてさらにより減少することが示された (Kaufmann, A. M., Firlik, A. D., Fukui, M. B., Wechsler, L. R., Jungries, C. A., and Yonas, H. (1999) Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke* 30, 93-99)。興味深いことには、IC対P、IC対CT、及びP対CT研究において見つけられる減少したタンパク質のほとんどは (表10~12)、血液タンパク質 (例えば血清アルブミン、血清トランスフェリン (serotransferrin)、ハプトグロビン、ヘモグロビン) であり、こ

これらの別個の脳エリアにおける血流の改変についての局所的な差をどういう訳か反映した。

【 0 2 7 0 】

図 7 は、上記の表において報告されるタンパク質について M D において観察されたタンパク質レベルの進展を示す。ほとんどのこれらのタンパク質は、C T から P 及び P から I C の M D で増加することが分かった。図 8 において示されるように、P R D X 1 及び P R D X 6 は、C T、P、及び I C の M D から増加することが分かった。ほとんどのケースにおいて、C T から I C へのタンパク質レベルの進展 / 上昇は、図 7 及び 8 において示されるように、脳損傷の深刻さとの直接的な関係を反映する。これらの結果は、本発明の医学的に関連する態様を強化する、関連する生物学的傾向を示す。

10

【 実施例 5 】

【 0 2 7 1 】

バイオマーカーのさらなる検証

数個の同定されたタンパク質を、代替の診断ツール（つまり E L I S A ）の有用性及び / 又は脳虚血への関与についての強力な科学的な論理的根拠に基づいて本発明者らの発見アプローチの有効性を実証するために選択した。脳損傷の十分に立証されているバイオマーカーである S 1 0 0 B は (Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. M., and Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60, 614-632)、脳組織において高度に発現しているカルシウム結合及び成長調節分泌タンパク質である Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668。S 1 0 0 B の濃度は、多くの脳傷害及び機能不全において評価されている。S 1 0 0 B は、脳卒中 (Buttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., and Kuhn, W. (1997) S-100 protein: Serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 28, 1961-1965、Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., and Kaps, M. (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 28, 1956-1960)、S A H (Wiesmann, M., Missler, U., Hagenstrom, H., and Gottmann, D. (1997) S-100 protein plasma levels after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien)*. 139, 1155-1160)、及び T B I (Romner, B., Ingebrigtsen, T., Kongstad, F., and Borgeesen, S. E. (2000) Traumatic brain damage: Serum S-100 protein measurements related to neuroradiological findings. *J. Neurotrauma* 17, 641-647) において増加した。S 1 0 0 B は、微小透析技術を使用して、急性脳外傷を有する 2 人の患者の脳 E C F において以前に測定された (Sen, J., Belli, A., Petzold, A., Russo, S., Keir, G., Thompson, E. J., Smith, M., and Kitchen, N. (2005) Extracellular fluid S100B in the injured brain: a future surrogate marker of acute brain injury? *Acta Neurochir. (Wien)*. 147, 897-900)。P 試料と比較したある I C 微小透析液における S 1 0 0 B の検出及び増加したレベルの決定並びに脳卒中患者の血液におけるその検証は、本明細書で報告される知見を確認し、研究試料の優れた価値を実証した。

20

30

40

【 0 2 7 2 】

G S T P 1 タンパク質は、多くの毒性求電子試薬及び有機過酸化物を不活性化することができる酵素である (Salinas, A. E., and Wong, M. G. (1999) Glutathione S-transferases - A review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279-309)。G S T P 1 は、中枢神経系において記載される 3 つのグルタチオン S - トランスフェラーゼのうちの一つである (Theodore, C., Singh, S. V., Hong, T. D., and Awasthi, Y. C. (1985) Glutathione S-transferases of human brain. Evidence for two immunologically distinct types of 26500-Mr subunits. *Biochem. J.* 225, 375-382)。いくつかの研究は、パーキンソン病とのその関連を示唆した (Shi, M., Bradner, J., Bammler, T. K., Eaton, D. L., Zhang, J. P., Ye, Z. C., Wilson, A. M., Montine, T. J., Pan, C., and Zhang, J. (2009) Identifi

50

fication of Glutathione S-Transferase Pi as a Protein Involved in Parkinson Disease Progression. *Am. J. Pathol.* 175, 54-65)。高レベルのGSTP1は、ヒトアフリカトリパノソーマ症を患っている末期患者のCSFにおいて最近報告された (Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D. M., Matovu, E., Enyaru, J. C., Fouda, C., Ndung'u, J. M., Lisacek, F., Muller, M., Turck, N., and Sanchez, J. C. (2009) A Combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP Panel for the Staging of Human African Trypanosomiasis Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e459)。このタンパク質は、生きている患者と比較して死亡した患者のCSFにおいて濃度が増加したことが分かったので、初期の脳細胞死に関連することが知られている (Burgess, J. A., Le scuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 5, 1674-1681)。微小透析及び血液試料におけるGSTP1の増加の高度な相関は、脳マーカーの発見のための適切なモデルとしての脳卒中患者の脳微小透析液の得られた定量的プロテオームマップの関連を強調した。

10

【0273】

ペルオキシレドキシンは、酸素ペルオキシド及び他の活性酸素種の分解に関与する遍在性の酸化防止酵素である (Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., and Chang, T. S. (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 619-626、Wood, Z. A., Schroder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40)。これらのチオール特異的酸化防止タンパク質もまた、チオレドキシンペルオキシダーゼと呼ばれる。ペルオキシレドキシンのファミリーは、還元プロセスに関与するシステイン残基の数によって、2つの種類、1-Cys及び2-Cysペルオキシレドキシンに分類することができる6つの別個の群から構成される。ペルオキシレドキシン-6 (PRDX6)は、実際に、唯一の1-Cysメンバーである。脳において、PRDX1及びPRDX6は、星状細胞において主として発現されることが示されたのに対して、PRDX2は、もっぱら、ニューロンにおいて発現した (Power, J. H. T., Asad, S., Chataway, T. K., Chegini, F., Manavis, J., Temlett, J. A., Jensen, P. H., Blumbergs, P. C., and Gai, W. P. (2008) Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 611-622、Sarafian, T. A., Verity, M. A., Vinters, H. V., Shih, C. C. Y., Shi, L. R., Ji, X. D., Dong, L. P., and Shau, H. Y. (1999) Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J. Neurosci. Res.* 56, 206-212)。PRDX2は、パーキンソン病患者由来の黒質 (Basso, M., Giraud, S., Corpillo, D., Bergamasco, B., Lopiano, L., and Fasano, M. (2004) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 4, 3943-3952)並びにダウン症候群、アルツハイマー病、及びピック病を有する患者の前頭皮質及び小脳において (Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2003) Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 967, 152-160)、有意に増加した。PRDX1は、脳内皮細胞における酸化ストレスに対する適応応答の一部であり、損傷した血液脳関門で保護効果を有することが実証された (Schreibelt, G., van Horssen, J., Haseloff, R. F., Reijerkerk, A., van der Pol, S. M. A., Nieuwenhuizen, O., Krause, E., Blasig, I. E., Dijkstra, C. D., Ronken, E., and de Vries, H. E. (2008) Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 256-264)。本明細書において、それぞれ、脳卒中患者の脳の損傷した部分の微小透析液及び血液におけるPRDX1の増加した量及び増加した濃度は、そのため、脳血管疾患におけるさらなる調査について高度に関連

20

30

40

50

するように思われた。非常に、興味深いことには、PRDX1及びGSTP1は、同様のレドックス防御メカニズムに関係し、ともに相互作用することが証拠づけられた (Kim, Y. J., Lee, W. S., Ip, C., Chae, H. Z., Park, E. M., and Park, Y. M. (2006) Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH2-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase pi/c-Jun NH2-terminal kinase complex. *Cancer Res.* 66, 7136-7142)。同様に、GSTP1は、複合体の形成 (Ralat, L. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2006) Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry (Moscow)*. 45, 360-372)を通して酸化PRDX6 (Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3780-3785)を再活性化することが示された。

10

20

30

40

50

【0274】

本発明者らの研究に含まれる患者のような悪性MCA梗塞患者は、記載されるタンパク質のうちのいくつかの発現パターンを修飾する可能性がある、低体温療法 (moderate hypothermia) など、神経疾患集中治療施設でいくつかの治療を受ける、重度に障害性の患者である。他の妨げは、100kDa微小透析プローブによる回収率がほとんどの発見されたタンパク質について未知であるということである。分子量が限られた経路を通して採取されない試料を選ぶことによって、例えば試料としてCSF又は血液を使用することによって、これらの妨げを軽減することは好都合にも可能であり得る。

【0275】

結論として、本発明の研究は、プロテオミクス分析を通して脳卒中患者の脳微小透析液を調査した。質的な結果は、ヒト脳由来の微小透析液及び細胞外液の広範囲なプロテオームマップを提供した。さらに、ヒト虚血脳のいくつかのエリアの微小透析液の定量的比較は、脳血管疾患についてのバイオマーカーの有益な供給源を提供することが示された。増加したタンパク質のいくつかのものは、対照及び脳卒中患者の小さなコホートの血液試料に対して検証された。発見及び初期の検証データの間の相関は、発見されたタンパク質の多くが、脳卒中及び他の急性脳損傷関連障害の診断及び/又は予後判断についてのバイオマーカーに相当することを実証した。

【実施例6】

【0276】

脳血流の減少に関連するタンパク質レベルにおける変化

急性虚血発作患者のインビボヒト脳細胞外液 (ECF) は、脳血流の減少に関連するタンパク質レベルにおける変化を評価するために調査した。虚血発作を患っている患者の梗塞中心部 (IC)、ペナブラ (P)、及び無影響の対側 (CT) 脳領域からの微小透析液 (MD, microdialysate) は、アイソパリックタギング及び質量分析 (MS) に基づいて、ショットガンプロテオミクスアプローチを使用して比較した。定量分析は、CT試料と比較して、IC又はPにおいて量が増加した53のタンパク質を示した。グルタチオンS-トランスフェラーゼP (GSTP1)、ペルオキシレドキシン-1 (PRDX1)、及びタンパク質S100-B (S100B) は、無関係な対照及び脳卒中患者 (n = 28) の血液に対するELISAを用いてさらに評価した。8、20、及び11倍の有意な増加が、それぞれ見出された。まとめると、これらの結果は、虚血性障害に関連するP及びICの間のECFタンパク質レベルにおける明らかな差異を実証した。さらに、PRDX1の評価は、血液脳卒中マーカーをさらに発見するための効率的な供給源としてECFの価値を目立たせた。

【0277】

脳卒中患者の微小透析試料採取は、地域の施設倫理委員会によって承認された。悪性中大脳動脈梗塞患者は、高カットオフ (100kDa) 大脳微小透析カテーテルを用いてモニターした。コンピューター断層撮影は、脳微小透析カテーテルの位置を確認するために

使用した。MDは、人工CSF溶液による灌流後に5日間、1時間ごとに得た。プロテオミクス分析は、脳モニタリングの最初の24時間の間に得た脳MDについて実行した。2連アイソパリックTandem Mass Tag (TMT) 技術 (Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921-2931) は、脳卒中を患っている6人の患者の2つの脳領域由来のトリプシン消化抽出物を標識するために使用した (図9)。標識に続いて、プールした試料は、オフゲル電気泳動 (OGE, off-gel electrophoresis) によって最初に分画した。次いで、画分は、逆相液体クロマトグラフィー (RP-LC) 及びマトリックス支援レーザー脱離タンデム飛行時間 (MALDI-TOF/TOF) MSによって分析した (図10)。タンパク質の同定及び定量化は、Swiss-ProtヒトデータベースにおいてPhenyx検索を使用して、ストリンジェントな基準を用いて評価した。

10

【0278】

免疫プロット検証は、GSTP1について実行した。プールしたIC及びCT MD (n = 3) は、1-D SDS PAGE (15%) を用いて分離した。免疫検出は、抗ヒトGSTP1ウサギポリクローナル抗体を用いて実行した。S100B、GSTP1、及びPRDX1は、対照及び脳卒中患者 (n = 28) の血液のELISAを用いてさらに検証した。S100B及びPRDX1は、市販のELISAキットを使用して検証した。GSTP1に関して、現在入手可能な市販のアッセイがなかったので、手製のサンドイッチを、(Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 5, 1674-1681, Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D. M., Matovu, E., Enyaru, J. C., Fouda, C., Ndung'u, J. M., Lisacek, F., Muller, M., Turck, N., and Sanchez, J. C. (2009) A Combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP Panel for the Staging of Human African Trypanosomiasis Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e459) において以前に記載されるように開発した。

20

【0279】

微小透析は、生きている組織において生じる事象を連続的にモニターするための生物分析試料採取ツールである。それは、ECFのプロープに基づき、細胞外空間から内因性物質を採取するのを可能にし、これは、微小透析プロープの先端の半透性膜を通して拡散することができる。そのような技術は、多くの器官においてリアルタイムで生化学的マーカーを検索し、追うのにかなり適切である。ヒト脳MDのプロテオミクス比較は、CT及びPの対応物と比較して、ICにおいて、有意に過剰に示されるタンパク質 (2を上回る比) を示した (図10)。グリア線維酸性タンパク質 (GFAP) 及びS100Bなどのタンパク質は、脳損傷に関連することが既に報告されており、1つ又はいくつかのIC MDにおいて増加するように思われた。図8は、2つのペルオキシレドキシタンパク質についてMDにおいて観察された、タンパク質レベルの進展の例を示す。多くのタンパク質は、CTからP及びPからICのMDで増加することが分かった。

30

40

【0280】

同様に、GSTP1における増加は、図2において例証されるように、プールしたMD (n = 3) における免疫プロット実験を用いて検証した。

【0281】

血清におけるS100B、GSTP1、及びPRDX1のレベルはまた、14人の脳卒中患者及び14人の対照の血清におけるELISAによっても測定し (図3)、虚血性脳卒中における血流の低下によって引き起こされた脳損傷の周辺のマーカーとしてそれらの有用性を実証した。

【0282】

50

G S T P 1 濃度は、対照と比較して、脳卒中患者の血液において著しく上昇することが分かった (p = 0 . 0 0 0 2、ウィルコクソン順位和検定)。脳卒中患者及び対照の間の血液中の平均比は 8 . 4 7 であった。血液 P R D X 1 レベルは、 p = 0 . 0 0 0 1 の有意水準で対照と脳卒中患者を区別するのを可能にした。約 2 0 倍のそのレベルの増加が、脳卒中集団において観察された。以前の結果 (Buttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., and Kuhn, W. (1997) S-100 protein: Serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. Stroke 28, 1961-1965、Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., and Kaps, M. (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. Stroke 28, 1956-1960) に一致して、血液 S 1 0 0 B の濃度測定値は、対照よりも脳卒中患者において有意に高度であった (p = 0 . 0 0 9 3)。

10

【 0 2 8 3 】

本実施例は、プロテオミクス分析を用いて脳卒中患者の脳 M D を調査した。質的な結果は、ヒト脳由来の微小透析液及び E C F の広範囲なプロテオームマップを提供した。さらに、ヒト脳の I C、P、及び C T 部分の M D の定量的比較は、脳血管疾患についてのバイオマーカーの有益な供給源を提供することが示された。増加したタンパク質のいくつかのものは、対照及び脳卒中患者の小さなコホートに対して検証された。発見及び初期の検証データの間の相関は、脳卒中及び他の脳損傷関連障害の診断及び / 又は予後判断についての本発明の工業的応用を実証した。

20

【 実施例 7 】

【 0 2 8 4 】

拡大パネルタンパク質の選択

急性虚血発作患者のインビボヒト脳細胞外液 (E C F) は、本明細書に記載されるように、脳血流の減少に関連するタンパク質レベルにおける変化を評価するために以前に調査された。虚血発作を患っている患者の梗塞中心部 (I C)、ペナンプラ (P)、及び無影響の対側 (C T) 脳領域からの微小透析液 (M D) (n = 6) は、アイソバリックタギング及び質量分析 (M S) に基づいて、ショットガンプロテオミクスアプローチを使用して比較した。定量分析は、C T 試料と比較して、I C 又は P において量が増加した 5 3 のタンパク質を示した。これらの結果は、虚血性障害に関連する C T、P、及び I C の間の E C F タンパク質レベルにおける明らかな差異を実証した。グルタチオン S - トランスフェラーゼ P (G S T P 1)、ペルオキシレドキシニン - 1 (P R D X 1)、及びタンパク質 S 1 0 0 - B (S 1 0 0 B) は、無関係な対照 (n = 1 4) 及び脳卒中患者 (n = 1 4) の血液に対する E L I S A を用いてさらに評価した。8 (p = 0 . 0 0 0 2)、2 0 (p = 0 . 0 0 0 1)、及び 1 1 倍 (p = 0 . 0 0 9 3) の有意な増加が、それぞれ見出された。これらは、血液脳卒中マーカーをさらに発見するための効率的な供給源として E C F の価値を目立たせた。

30

【 0 2 8 5 】

G S T P - 1 及びペルオキシレドキシニン 1 及び 6 は、脳卒中の管理のための有用なマーカーを示すが、本発明者らは、診断感度及び / 若しくは特異性をさらに改善するため並びに / 又は予後情報を提供するためのタンパク質のより大きなパネルを構築したかった。そのため、本発明者らは、M D において以前に見つけられた脳卒中バイオマーカー候補の立証及び検証を行った。

40

【 0 2 8 6 】

候補タンパク質の包括的な生物情報学分析に従って、バイオマーカーの 3 つの群が、降順の優先度順に選択された。

パネル A	I D	説明
N ° 1	A C B P __ H U M A N	アシル C o A 結合タンパク質
N ° 2	C S R P 1 __ H U M A N	システイングリシンリッチタンパク質 1
N ° 3	P E B P 1 __ H U M A N	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 1

50

N° 4	DDAH1__HUMAN	N (G) , N (G) - ジメチルアルギニンジメチル アミノヒドロラーゼ 1	
N° 5	MT3__HUMAN	メタロチオネイン - 3 (MT - 3)	
N° 6	CYTB__HUMAN	シスタチン - B	
パネル B	ID	説明	
N° 1	PPIA__HUMAN	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼ A	
N° 2	NFM__HUMAN	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド	
N° 3	UBIQ__HUMAN	ユビキチン	
N° 4	B2MG__HUMAN	ベータ - 2 - ミクログロブリン前駆物質	
N° 5	CYTC__HUMAN	シスタチン C 前駆物質 (シスタチン - 3)	10
N° 6	SH3L1__HUMAN	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク 質	
N° 7	TPIS__HUMAN	トリオースリン酸イソメラーゼ	
N° 8	MBP__HUMAN	ミエリン塩基性タンパク質 (MBP)	
N° 9	MT2__HUMAN	メタロチオネイン - 2 (MT - 2 , Metallothionei n-2)	
パネル C	ID	説明	
N° 1	NFM__HUMAN	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド	
N° 2	COTL1__HUMAN	コアクトシン様タンパク質	
N° 3	THY1__HUMAN	Thy - 1 膜糖タンパク質前駆物質	20
N° 4	PROF1__HUMAN	プロフィリン - 1	
N° 5	TYB4__HUMAN	チモシンベータ - 4	
N° 6	MT1E__HUMAN	メタロチオネイン - 1 E	
N° 7	FABPB__HUMAN	脂肪酸結合タンパク質、脳 (B - FABP)	
N° 8	GFA P__HUMAN	グリア線維酸性タンパク質 (GFA P , Glial fibr illary acidic protein)	
N° 9	CAH2__HUMAN	カルボニックアンヒドラーゼ 2	
N° 10	CERU__HUMAN	セルロプラスミン前駆物質	
N° 11	DCD__HUMAN	ダームシジン前駆物質	
N° 12	DEF1__HUMAN	好中球デフェンシン 1 前駆物質 (HNP - 1)	30

【 0 2 8 7 】

ともに、パネル A、B、及び C は、拡大パネル A B C と呼ばれる拡大パネルを形成する。

【 0 2 8 8 】

上記に報告される 53 のバイオマーカー候補の中で、N (G) ; N (G) - ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 (DDAH1__HUMAN)、シスタチン - B (CYTB__HUMAN)、アシル Co A 結合タンパク質 (ACBP__HUMAN)、システイングリシンリッチタンパク質 1 (CSRP1__HUMAN)、メタロチオネイン - 3 (MT3__HUMAN)、並びにホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質 1 (PEPB1__HUMAN) (パネル A) を優先させた。

【 実施例 8 】

【 0 2 8 9 】

脳卒中バイオマーカー候補のシグネチャペプチドを測定するための選択反応モニタリング質量分析法

拡大パネルタンパク質の検証をさらに提供するために、単一タンパク質及び多重タンパク質アッセイを、イムノアッセイ (ELISA) 及び質量分析 (MRM) 法を使用して開発する。

【 0 2 9 0 】

本実施例は、多重パネルを開発するための MRM の迅速な能力を実証する。本実施例では、本発明者らは、方法を例証するために使用する実施例 7 のパネル A からタンパク質を

選択した。しかしながら、この方法が、バイオマーカーのその特定のパネルに制限されるように意図されない。検出のある好都合なモードを実行する方法を理解するのを支援するために、バイオマーカーのこのパネルは便利なパネルとして使用されている。検出の同じモードは、単に本明細書で説明される方法に従うが、その代りに、開示される異なるパネル又は群のマーカーを使用することによって、本明細書において開示されるマーカーの任意の他の群について使用することができる。

【0291】

したがって、本実施例は、パネルAの優先された脳卒中バイオマーカー候補のシグネチャペプチドを選択的に検出するための選択反応モニタリング(SRM) MSに基づく方法の開発及び評価を示す。

【0292】

方法の設計

MRM方法の設計は、最初に、それぞれのマーカータンパク質を代表する標的ペプチド(プロテオタイプペプチド)の選択を必要とする。第2のステップは、タンデム質量分析の間に親ペプチドの衝突解離において生じる特異的なペプチド断片の選択を含む。親及び娘イオンの質量電荷(m/z)比における差異は、トランジションとして知られている。

【0293】

インシリコアプローチは、それぞれの脳卒中バイオマーカー候補を代表するプロテオタイプトリプシンシグネチャペプチドを選択するために使用した。合計7、4、7、3、3、及び6のプロテオタイプシグネチャペプチドが、DDAH1、CYTB、ACBP(3つのアイソフォーム)、CSRP1、MT3、及びPEPB1についてそれぞれ選択された。

【0294】

シグネチャペプチド選択は、i)手製Proteotypeソフトウェアを用いて決定したヒトタンパク質データベース(UniProt Swiss-Prot)におけるペプチド配列の特有性、ii)関連するMSの検出のためのペプチド前駆イオンのm/z値、iii)可能な場合、配列におけるシステイン及びメチオニン残基の非存在に基づく(下記の表14)。

【0295】

【表18】

表14:急性脳損傷を有する対象の診断及び/又は予後モニタリングにおいて有用なタンパク質のプロテオタイプペプチド

受託	説明	prev.res	配列	next.res	Peptide Atlas(05/04/2011)にアクセスしたhttp://www.peptideatlas.org/における観測値	開示(J. Proteome Res., 2011, 10(3), pp 1043-1051)における観測値	位置	human_uniprot_sprot_varsplciにおける頻度	質量	予測される電荷	m/z	Rt因子
sp O94760 DDAH1_HUMAN	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドrolラーゼ1	R	ALPESLGQHALR	S	3	3	20:31	1	1291.712	3	431.2	42.3
		K	DENATLDGGDVLFTGR	E	6	0	121:136	1	1679.787	2	840.4	55.2
		K	DYAVSTVPVADGLHLK	S	55	0	160:175	1	1684.89	3	562.3	56.2
		R	GAEILADTFK	D	4	2	150:159	1	1064.562	2	532.8	56.1
		K	GEEVDVAR	A	0	0	35:42:00	1	874.4265	2	437.7	26.6
		R	QHQLYVGVLSGSK	L	0	0	46:57:00	1	1328.732	3	443.6	42.9
R	TPEEYPESAK	V	4	2	238:247	1	1150.526	2	575.8	17.8		
sp P04080 CYTB_HUMAN	シスタチン-B	K	HDELTYF	H	0	0	92:98	1	924.4098	2	462.7	49.6
		K	SQVVAGTNYFK	V	56	0	45:56:00	1	1326.705	2	663.9	51.7
		R	VFQSLPHENKPLTLSNYQTNK	A	367	0	69:89	1	2458.272	4	615.3	47.1
		K	VHVGDEDFVHLR	V	564	4	57:68	1	1422.712	4	356.4	38.4
sp P07108 ACBP_HUMAN	アシルCoA結合タンパク質	-	MSQAEFEK	A	0	0	01:08	1	969.4346	2	485.2	23.3
		K	AAEEVR	H	0	1	09:14	3	674.3468	2	337.7	19.0
		K	QATVGDINTERPGMLDFTGK	A	342	0	34:53:00	3	2150.055	3	717.4	55.0
		K	TKPSDEMLFIYGHYK	Q	63	6 (3×酸化)	18:33	3	1957.936	4	490.2	58.1
		K	WDAWNELK	G	12	7	56:63	3	1061.505	2	531.3	41.1
sp P07108-2 ACBP_HUMAN	アシルCoA結合タンパク質のアイソフォーム2	-	MWGDLLWLPASANPGTGTEAEFEK	A	0	0	7108:7132	1	2717.292	2	1359	88.9
sp P07108-3 ACBP_HUMAN	アシルCoA結合タンパク質のアイソフォーム3	-	MPFAAEFEK	A	0	0	7108:7116	1	1069.502	2	535.3	38.9
sp P21291 CSRPI_HUMAN	システイングリシンリッチタンパク質1	K	GFGFGQGAGALVHSE	G	30	3	179:193	1	1433.681	2	717.3	59.2

10

20

30

40

		K	GLESTTLADK	D	2	0	152:161	1	1034.536	2	517.8	41.9
		K	GYGYGGAGLSTDK	G	4	0	70:84	1	1474.681	2	737.8	31.1
sp P25713 MT3_HUMAN	メタロチオネイン-3	K	GGEEAAEAEAEK	C	0	8	53:63	1	1061.475	2	531.2	20.0
		-	MDPETPCPCPGSGSCTCADSCK	C	0	0	01:21	1	2376.833	2	1189	-5.4
		K	SCCSCCPAECEK	C	0	6	33:44:00	1	1547.505	2	774.3	3.5
sp P30086 PEBP1_HUMAN	ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1	K	GNDISSGTVLSDYVGSPPK	G	412	7	94:113	1	1949.945	2	975.5	45.9
		K	LYEQLSGK	-	10	11	180:187	1	937.4989	2	469.3	27.8
		K	LYTLVLTPDAPSR	K	159	10	63:76	1	1560.827	2	780.9	48.1
		K	NRPTSISWDGLDSGK	L	467	5	48:62	1	1632.798	3	544.9	36.7
		K	VLTPTQVK	N	319	1	40:47:00	1	885.5404	2	443.3	29.4
		R	YVWLVEQDRPLK	C	47	6	120:132	1	1708.906	3	570.3	59.1
sp P09211 GSTP1_HUMAN	グルタチオンS-トランスフェラーゼP	K	TFIVGDQISFADYNLLDLLIHEVLAPGCLDAFPLLSAYVGR	L	ND	ND	142:183	1	4649.436	3	1550	223.3
		-	MPPYTVVYFPVR	G	ND	ND	01:12	1	1468.766	2	734.9	44.04
		K	DDYVK	A	ND	ND	117:121	1	639.2984	2	320.2	24.38
		K	DQQEAALVDMVNDGVEDLR	C	ND	ND	83:101	1	2116.982	2	1059	70.67
		K	FQDGDLLYQSNILR	H	ND	ND	56:71	1	1883.95	2	942.5	62.89
		K	ASCLYGQLPK	F	ND	ND	46:55:00	1	1136.577	2	568.8	37.34
		K	AFLASPEYVNLPIGNGK	Q	ND	ND	192:209	1	1903.991	2	952.5	65.59
		R	MLLADQGGQSWK	E	ND	ND	20:30	1	1276.635	2	638.8	47.63
		R	LSARPK	L	ND	ND	184:189	1	671.4199	3	224.5	1.119
		R	TLGLYGK	D	ND	ND	76:82	1	751.4349	2	376.2	39.09
		K	EEVVTVETWQEGSLK	A	ND	ND	31:45:00	1	1733.859	2	867.4	58.34
		K	ALPGQLKPFETLLSQNGGK	T	ND	ND	122:141	1	2126.16	3	709.4	60.47
		K	YISLIYTYEAGK	D	ND	ND	104:116	1	1534.779	2	767.9	55.73
sp P30041 PRDX6_HUMAN	ベルオキシレドキシン-6	K	GMPVTAR	V	ND	ND	126:132	1	731.3869	2	366.2	30.53
		-	MPGGLLLGDVAPNFEANTTVGR	I	ND	ND	01:22	1	2229.133	2	1115	63.65
		R	DFTPVCTTELGR	A	ND	ND	42:53:00	1	1395.657	2	698.3	40.89
		R	VVVFVGPDK	K	ND	ND	133:141	1	1007.556	2	504.3	49.98

10

20

		K	LIALSIDSVEDHLAWSK	D	ND	ND	68:84	1	1897.007	3	633	79.81
		R	ELAILLGMLDPAEK	D	ND	ND	109:122	1	1512.834	2	756.9	91.41
		K	LSILYPATTGR	N	ND	ND	145:155	1	1191.673	2	596.3	37.97
		R	VATPVDWK	D	ND	ND	175:182	1	915.4934	2	458.3	34.03
		R	NFDEILR	V	ND	ND	156:162	1	906.4679	2	453.7	49.47
		K	LFPPIIDDR	N	ND	ND	98:106	1	1085.599	2	543.3	47.47
		R	VVISLQLTAEK	R	ND	ND	163:173	1	1200.72	2	600.9	56.15
		K	DINAYNCEEPTK	L	ND	ND	85:97	1	1582.669	2	791.8	26.56
		K	LAPEFAK	R	ND	ND	57:63	1	775.4348	2	388.2	28.4
		K	DGDSVMVLPPIPEEAK	K	ND	ND	183:199	1	1829.884	2	915.4	63.4
		R	FHDFLGDSWGILFSHR	D	ND	ND	25:41:00	1	2030.987	4	508.5	76.44
sp Q06830 PRDX1_HUMAN	ベルオキシレドキシン-1	K	HGEVCPAGWKPGSDTIKPDVQK	S	ND	ND	169:190	1	2406.187	5	482	22
		K	QGGLGPMNIPVSDPK	R	ND	ND	94:109	1	1622.857	2	811.9	58.44
		K	ADEGISFR	G	ND	ND	121:128	1	894.4316	2	447.7	35.7
		K	DISLSDYK	G	ND	ND	28:35:00	1	940.4622	2	470.7	42.1
		R	LVQAFQFTDK	H	ND	ND	159:168	1	1196.631	2	598.8	47.24
		K	IGHAPPNFK	A	ND	ND	08:16	1	980.5312	3	327.5	16.05
		K	LNCQVIGASVDSHFCHLAWVNTPK	K	ND	ND	69:92	1	2753.329	4	689.1	63.37
		K	YVVFYPLDFTFVCPTEIIAFSDR	A	ND	ND	38:62	1	3093.511	2	1547	153.1
		-	MSSGNAK	I	ND	ND	01:07	1	694.3189	2	347.7	4.153
		R	TIAQDYGVLK	A	ND	ND	111:120	1	1107.604	2	554.3	46.78
K	ATAVMPDQFK	D	ND	ND	17:27	1	1164.572	2	582.8	44.71		

30

40

【 0 2 9 6 】

それぞれのペプチドについての最も適切なトランジションの選択を支援するために、タンデム質量スペクトルの公的なりポジトリ (Peptide Atlas [<http://www.peptideatlas.org/>]) 中及び / 又は前の発見のための作業 (上記に記載) の間のペプチドの以前の経験的観察を再検討した。

【 0 2 9 7 】

好ましいが、非限定的な方法として、いわゆる第一及び第二のトランジションの組み合わせからなるインテリジェントSRM (intelligent SRM) (iSRM) 法を設定した。そのようなアプローチにおいて、所与のペプチドに関連のある第一のトランジションがすべて、定められる閾値を超えて検出される場合、次いで、第二のトランジションは、標的

50

分子の同一性を確認するのを支援するために引き起こされる。本明細書で、アプローチは、アッセイにおいて連続的にモニターされ、かつ特定のマトリックスにおいてペプチド検出レベルを評価するためのトランジションの数を低下させることを目標とした。表15において報告されるように、2つの第一のトランジション及び6つの第二のトランジションを選択した。

【0298】

【表19】

表15:急性脳損傷を有する対象の診断及び/又は予後モニタリングのためのSRM法において使用するためのトランジションのリスト

Q1 (m/z)	Q3 (m/z)	衝突エネルギー (V)	S-レンズ (V)	第一(0)/第二(1)	ペプチド配列	タンパク質の説明	前駆荷電状態	生成物荷電状態	イオンタイプ
337.677	272.124	15	68	1	AAEEVR	sp P07108 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質 OS=ホモサビエンス GN=DBI PE=1 SV=2	2	1	b3
337.677	274.187	15	68	1					y2
337.677	302.158	15	68	1					y5
337.677	401.166	15	68	0					b4
337.677	403.229	15	68	0					y3
337.677	500.235	15	68	1					b5
337.677	532.272	15	68	0					y4
337.677	603.309	15	68	0					y5
437.717	345.224	18	98	1	GEEVDVAR	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンス GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y3
437.717	415.182	18	98	1					b4
437.717	460.251	18	98	0					y4
437.717	530.209	18	98	0					b5
437.717	559.319	18	98	0					y5
437.717	629.277	18	98	1					b6
437.717	688.362	18	98	0					y6
437.717	700.314	18	98	1					b7
443.274	411.26	18	100	0	VLTPTQVK	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	b4
443.274	475.287	18	100	1					y4
443.274	512.307	18	100	1					b5
443.274	572.34	18	100	0					y5
443.274	640.366	18	100	1					b6
443.274	673.387	18	100	0					y6
443.274	739.434	18	100	0	b7				
443.274	786.471	18	100	1	y7				
462.708	382.135	19	105	1	HDELTYF	sp P04080 CYTB_HUMAN シスタチン-B OS=ホモサビエンス GN=CSTB PE=1 SV=2	2	1	b3
462.708	430.197	19	105	1					y3
462.708	495.219	19	105	0					b4
462.708	543.281	19	105	1					y4
462.708	596.267	19	105	0					b5
462.708	672.323	19	105	0					y5
462.708	759.33	19	105	0					b6
462.708	787.35	19	105	1					y6
469.253	277.154	19	107	1	LYEQLSGK	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	b2
469.253	291.166	19	107	1					y3
469.253	534.255	19	107	1					b4
469.253	647.339	19	107	1					b5
469.253	661.351	19	107	0					y6
469.253	734.371	19	107	1					b6
469.253	791.393	19	107	1					b7
469.253	824.414	19	107	0					y7
485.221	347.138	20	112	1	MSQAEFEK	sp P07108 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質 OS=ホモサビエンス GN=DBI PE=1 SV=2	2	1	b3
485.221	419.7	20	112	1					y7
485.221	423.223	20	112	0					y3
485.221	547.218	20	112	1					b5
485.221	552.266	20	112	1					y4
485.221	623.303	20	112	0					y5
485.221	751.362	20	112	0					y6
485.221	838.394	20	112	0					y7
517.772	446.26	21	122	1	GLESTTLADK	sp P21291 CSRPI_HUMAN システイングリシンリッチタンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=CSRPI PE	2	1	y4
517.772	488.235	21	122	1					b5

10

20

30

40

517.772	547.308	21	122	1		=1 SV=3	2	1	y5
517.772	648.356	21	122	1			2	1	y6
517.772	702.366	21	122	1			2	1	b7
517.772	735.388	21	122	0			2	1	y7
517.772	773.403	21	122	1			2	1	b8
517.772	864.43	21	122	0			2	1	y8
531.241	476.235	21	126	1			2	1	y4
531.241	515.209	21	126	1			2	1	b6
531.241	547.272	21	126	0			2	1	y5
531.241	586.246	21	126	1	GGEEAAEAEAEK	sp P25713 MT3_HUMAN メタロチオネイン-3 OS=ホモサビエンス GN=MT3 PE=1 SV=1	2	1	b7
531.241	676.314	21	126	0			2	1	y6
531.241	747.351	21	126	0			2	1	y7
531.241	818.389	21	126	0			2	1	y8
531.241	915.369	21	126	1			2	1	b10
531.256	503.282	21	126	1			2	1	y4
531.256	559.229	21	126	1			2	1	b4
531.256	673.272	21	126	1			2	1	b5
531.256	689.361	21	126	0	WDAWNEK	sp P07108 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質 OS=ホモサビエンス GN=DBI PE=1 SV=2	2	1	y5
531.256	760.398	21	126	0			2	1	y6
531.256	802.315	21	126	1			2	1	b6
531.256	875.425	21	126	1			2	1	y7
531.256	915.399	21	126	1			2	1	b7
532.785	555.313	21	126	1			2	1	b6
532.785	581.292	21	126	1			2	1	y5
532.785	670.34	21	126	1			2	1	b7
532.785	694.377	21	126	1	GAEILADTFK	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンス GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y6
532.785	771.388	21	126	0			2	1	b8
532.785	807.461	21	126	0			2	1	y7
532.785	918.456	21	126	1			2	1	b9

10

20

532.785	936.503	21	126	1			2	1	y8
535.255	423.223	22	127	1			2	1	y3
535.255	447.206	22	127	1			2	1	b4
535.255	469.734	22	127	1			2	2	y8
535.255	552.266	22	127	1	MPAFAEFEK	sp P07108-3 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質のアイソフォーム3 OS=ホモサビエンス GN=DBI	2	1	y4
535.255	623.303	22	127	0			2	1	y5
535.255	770.371	22	127	0			2	1	y6
535.255	841.409	22	127	0			2	1	y7
535.255	938.461	22	127	0			2	1	y8
575.767	457.192	23	139	1			2	1	b4
575.767	531.277	23	139	1			2	1	y5
575.767	620.256	23	139	1			2	1	b5
575.767	694.34	23	139	0	TPEEYPESAK	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンス GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y6
575.767	823.383	23	139	0			2	1	y7
575.767	846.351	23	139	1			2	1	b7
575.767	933.383	23	139	1			2	1	b8
575.767	952.425	23	139	1			2	1	y8
646.359	359.24	25	160	1			2	1	y3
646.359	441.251	25	160	1			2	2	y8
646.359	554.299	25	160	0			2	2	y10
646.359	624.357	25	160	1	ALPELGGHALR	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンス GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y5
646.359	681.379	25	160	0			2	1	y6
646.359	881.495	25	160	1			2	1	y8
646.359	933.478	25	160	1			2	1	b9
646.359	1107.59	25	160	1			2	1	y10
663.856	485.271	26	165	1			2	1	b5
663.856	785.419	26	165	1	SQVVAGTNYFIK	sp P04080 CYTB_HUMAN シスタチン-B OS=ホモサビエンス GN=CSTB PE=1 SV=2	2	1	y6
663.856	842.44	26	165	0			2	1	y7
663.856	913.477	26	165	0			2	1	y8

30

40

663.856	1012.546	26	165	1			2	1	y9
663.856	1067.515	26	165	1			2	1	b10
663.856	1111.614	26	165	1			2	1	y10
663.856	1180.599	26	165	1			2	1	b11
664.87	507.267	26	165	1			2	1	b4
664.87	560.34	26	165	1			2	1	y6
664.87	659.408	26	165	1			2	1	y7
664.87	670.33	26	165	1			2	1	b5
664.87	769.399	26	165	1	QHQLYVGVLGSK	sp O94760 DDAHI_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンス GN=DDAHI PE=1 SV=3	2	1	b6
664.87	822.471	26	165	0			2	1	y8
664.87	935.556	26	165	1			2	1	y9
664.87	1063.614	26	165	0			2	1	y10
711.86	752.32	28	179	1			2	1	b7
711.86	786.425	28	179	1			2	1	y6
711.86	915.468	28	179	1			2	1	y7
711.86	998.457	28	179	1	VHVGDEDFVHLR	sp P04080 CYTB_HUMAN シスタチン-B OS=ホモサビエンス GN=CSTB PE=1 SV=2	2	1	b9
711.86	1030.495	28	179	1			2	1	y8
711.86	1087.516	28	179	0			2	1	y9
711.86	1135.516	28	179	1			2	1	b10
711.86	1186.585	28	179	0			2	1	y10
717.344	783.399	28	181	1			2	1	y8
717.344	840.421	28	181	0			2	1	y9
717.344	850.384	28	181	1			2	1	b10
717.344	963.468	28	181	1	GFGFGQGAGALVHSE	sp P21291 CSRPI_HUMAN システイングリシンリッチタンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=CSRPI PE=1 SV=3	2	1	b11
717.344	968.479	28	181	1			2	1	y10
717.344	1025.5	28	181	0			2	1	y11
717.344	1062.536	28	181	1			2	1	b12
717.344	1199.595	28	181	1			2	1	b13
717.356	561.292	35	181	1	QATVGDINTERPGMLDF	sp P07108 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク	3	2	y10
717.356	676.337	35	181	1	TGK	質 OS=ホモサビエンス GN=DBI PE=1 SV=2	3	2	y12
717.356	789.901	35	181	1			3	2	y14
717.356	847.414	35	181	1			3	2	y15
717.356	875.925	35	181	0			3	2	y16
717.356	925.459	35	181	1			3	2	y17
717.356	965.476	35	181	1			3	1	y9
717.356	975.983	35	181	0			3	2	y18
737.844	721.372	28	187	1			2	1	y7
737.844	754.315	28	187	1			2	1	b8
737.844	792.409	28	187	0			2	1	y8
737.844	849.431	28	187	1	GYGYGQGAGTLSTDK	sp P21291 CSRPI_HUMAN システイングリシンリッチタンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=CSRPI PE=1 SV=3	2	1	y9
737.844	977.489	28	187	1			2	1	y10
737.844	1034.511	28	187	0			2	1	y11
737.844	1254.596	28	187	1			2	1	y13
737.844	1328.575	28	187	1			2	1	b14
774.256	436.186	30	198	1			2	1	y3
774.256	650.725	30	198	1	SC[カルボキシアミドメチル]C[カルボキシアミドメチル]SC[カルボキシアミドメチル]C[カルボキシアミドメチル]PAEC	sp P25713 MT3_HUMAN メタロチオネイン-3 OS=ホモサビエンス GN=MT3 PE=1 SV=1	2	2	y10
774.256	733.318	30	198	0			2	1	y6
774.256	893.349	30	198	0			2	1	y7
774.256	1053.379	30	198	1	[カルボキシアミドメチル]EK		2	1	y8
774.256	1112.326	30	198	1			2	1	b9
774.256	1140.411	30	198	1			2	1	y9
774.256	1300.442	30	198	1			2	1	y10
780.917	757.347	30	200	1			2	1	y7
780.917	804.486	30	200	1			2	1	b7
780.917	858.395	30	200	0	LYTLVLTPDPAPSR	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンス GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	y8
780.917	919.513	30	200	1			2	1	b8
780.917	971.479	30	200	0			2	1	y9
780.917	1070.547	30	200	1			2	1	y10

10

20

30

40

780.917	1131.593	30	200	1			2	1	b10
780.917	1202.63	30	200	1			2	1	b11
816.902	942.479	31	211	1			2	1	b8
816.902	964.437	31	211	1			2	1	y9
816.902	1057.506	31	211	0			2	1	b9
816.902	1227.611	31	211	1	NRPTSISWDGLDSGK	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンズ GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	b11
816.902	1342.638	31	211	0			2	1	b12
816.902	1362.653	31	211	1			2	1	y13
816.902	1429.67	31	211	1			2	1	b13
816.902	1486.692	31	211	1			2	1	b14
840.397	921.478	32	217	1			2	1	y9
840.397	1036.505	32	217	0			2	1	y10
840.397	1087.453	32	217	1			2	1	b11
840.397	1149.589	32	217	0	DENATLDGGDVLFTGR	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンズ GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y11
840.397	1200.537	32	217	1			2	1	b12
840.397	1250.637	32	217	1			2	1	y12
840.397	1347.606	32	217	1			2	1	b13
840.397	1448.653	32	217	1			2	1	b14
842.949	932.472	32	218	1			2	1	b9
842.949	949.546	32	218	0			2	1	y9
842.949	1003.509	32	218	1			2	1	b10
842.949	1048.614	32	218	1	DYAVSTVPVADLHLK	sp O94760 DDAH1_HUMAN N(G);N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1 OS=ホモサビエンズ GN=DDAH1 PE=1 SV=3	2	1	y10
842.949	1118.536	32	218	1			2	1	b11
842.949	1149.662	32	218	1			2	1	y11
842.949	1236.694	32	218	0			2	1	y12
842.949	1335.763	32	218	1			2	1	y13
854.956	513.35	32	222	1			2	1	y4
854.956	756.436	32	222	1	YVWLVEQDRPLK	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンズ GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	y6
854.956	885.478	32	222	1			2	1	y7

10

20

854.956	1048.542	32	222	0			2	1	y8
854.956	1147.61	32	222	0			2	1	y9
854.956	1196.562	32	222	1			2	1	b9
854.956	1260.694	32	222	1			2	1	y10
854.956	1352.663	32	222	1			2	1	b10
906.435	423.223	43	237	1			3	1	y3
906.435	490.175	43	237	1			3	1	b4
906.435	623.303	43	237	0			3	1	y5
906.435	789.338	43	237	0	MWGDWLWLPASANPG TGTEAEFEK	sp P07108-2 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質のアイソフォーム2 OS=ホモサビエンズ GN=DBI	3	1	b6
906.435	910.415	43	237	0			3	1	y8
906.435	1058.023	43	237	1			3	2	y20
906.435	1165.537	43	237	1			3	1	y11
906.435	1200.589	43	237	0			3	2	y23
975.476	542.293	36	258	0			2	1	y6
975.476	919.451	36	258	1			2	1	y9
975.476	1006.483	36	258	1			2	1	y10
975.476	1119.568	36	258	0	GNDISSGTVLSDYVVGSG PPK	sp P30086 PEBP1_HUMAN ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1 OS=ホモサビエンズ GN=PEBP1 PE=1 SV=3	2	1	y11
975.476	1218.636	36	258	1			2	1	y12
975.476	1376.705	36	258	1			2	1	y14
975.476	1408.659	36	258	1			2	1	b14
975.476	1463.737	36	258	1			2	1	y15
979.472	864.9	37	259	0			2	2	y14
979.472	927.472	37	259	0			2	1	y7
979.472	1031.471	37	259	1			2	1	b9
979.472	1171.596	37	259	1	TKPSDEEMLFYGHYK	sp P07108 ACBP_HUMAN アシルCoA結合タンパク質 OS=ホモサビエンズ GN=DBI PE=1 SV=2	2	1	y9
979.472	1178.539	37	259	1			2	1	b10
979.472	1291.623	37	259	1			2	1	b11
979.472	1429.682	37	259	1			2	1	y11
979.472	1454.687	37	259	1			2	1	b12

30

40

1188.92	509.202	44	316	1			2	1	y4
1188.92	740.27	44	316	1	MDPETC[カルボキシア		2	1	y6
1188.92	831.301	44	316	0	ミドメチル]PC[カルボキ		2	1	b7
1188.92	841.317	44	316	1	シアミドメチル]PSGGSC	sp P25713 MT3_HUMAN	2	1	y7
1188.92	1001.348	44	316	0	[カルボキシアミドメチ	メタロチオネイン-3 OS=	2	1	y8
1188.92	1202.423	44	316	1	ル]TC[カルボキシアミド	ホモサビエンス GN=MT3 PE=1 SV=1	2	1	y11
1188.92	1289.455	44	316	0	メチル]ADSC[カルボキ		2	1	y12
1188.92	1386.508	44	316	0	シアミドメチル]K		2	1	y13
1229.64	854.4	45	316	1			2	1	y7
1229.64	938.473	45	316	1			2	1	b8
1229.64	942.484	45	316	0			2	2	y16
1229.64	1068.531	45	316	1	VFQSLPHENKPLTLSNY	sp P04080 CYTB_HUMAN	2	1	y9
1229.64	1099.565	45	316	1	QTNK	シスタチン-B OS=ホモ	2	2	b19
1229.64	1156.587	45	316	1		サビエンス GN=CSTB PE=1 SV=2	2	2	b20
1229.64	1180.61	45	316	1			2	1	b10
1229.64	1278.668	45	316	0			2	1	y11

10

20

30

40

50

【 0 2 9 9 】

データが入手可能ではなかった場合、SRM Atlas又はPinpointソフトウェア (Thermo Scientific社)からの予測を、トランジションを選ぶために使用した。その場合、表15において報告されるように、4つの第一のトランジション及び4つの第二のトランジションを選択した。それぞれの前駆イオンについてのS - レンズパラメーターは、m / z 値及び以前の実験データに従って設定した。衝突エネルギーは、あらかじめ定められた計算を使用してPinpointによって決定した。選んだサイクル時間は、80の第一のトランジションをモニターするために1.6秒とした。合計240のトランジションを、30のシグネチャペプチドをモニターするために使用した。引き起こされたトランジションのスキャン時間は、0.2秒とした。TSQ Vantage質量分析計 (Thermo Scientific社)は、0.7のQ1ピーク幅 (FWHM) 及び1.2 mTorrの衝突セルにおけるアルゴン圧力を使用して使用した。陽イオン化を使用した。キャピラリー温度、気化器、シースガス、及び補助ガスは、最大のイオン感度のために最適化した。

【 0 3 0 0 】

逆相液体クロマトグラフィー (RP - LC) 分離は、MSの前に実行した。ペプチド分離は、30% CH₃ CNの13.25分間の勾配により100 µL /分で50 x 1 mmのカラム上で生じた。Finnigan Surveyor MS Pump Plus LC system (Thermo Scientific)を使用した。

【 0 3 0 1 】

方法の試験

より容易に入手可能な試料中の標的タンパク質の存在を実証するために、開発したMRM方法は、トリプシンを用いて消化したヒト血漿試料に対して評価した。手短に言えば、30 µLの容量の血漿 (Dade Behring社)を、1680 µL トリエチルアンモニウム炭酸水素バッファー (TEAB) 100 mM及び90 µL 硫酸ドデシルナトリウム1%に添加した。還元は、トリス (2 - カルボキシエチル) ホスフィンハイドロクロライド20 mM (95.4 µL)を用いて1時間、55 で実行した。次いで、90 µLの容量のヨードアセトアミド150 mMを、室温で、暗中で、1時間の反応のために添加した。180 µLの容量の、TEAB中0.4 µg / µLのトリプシン (Promega社)を添加した。消化は、37 で一晩実行した。試料精製は、Hypersep C18 500 mg (Thermo Scientific社)を用いて最初に行われた。強力な陽イオン交換カートリッジは、さらなる精製のために使用した。試料は、3つのアリコートに分割した。アリコートは、RP - LC SRM分析前に500 µL 3% CH₃ CN、0.2% ギ酸、0.2 mg / ml グルカゴン中で再懸濁した。RP - LC iSRM分析につき、20 µLを使用した。データ分析は、Pinpointを使用して実行した。

【 0 3 0 2 】

図11 ~ 16は、タンパク質DDAH1、CYTB、CSR P1、及びPEBP1を代表するシグネチャペプチドDENATLDGGDVLFTGR、TPEEYPESAK、SQVVAGTNYFIK、GYGYGQGAGTLSTDK、GLESTTLADK、

及び L Y E Q L S G K のトランジションの i S R M シグナルのクロマトグラムを示す。

【 0 3 0 3 】

したがって、本明細書において開発した S R M 法は、6 つの脳卒中バイオマーカー候補を代表する 30 のシグネチャペプチドのモニタリングを可能にすることが実証される。方法応用可能性の原理証明は、トリプシンを用いて消化した血漿試料において実証した。方法は、いくつかの試料マトリックスに応用することができ得る。

【 0 3 0 4 】

本実施例における実証は、パネル A のマーカーを使用して実行した。上記に述べるように、これは、検出のこのモードの例証となる。検出のこのモードは、本文において開示される任意の他のマーカー又はマーカーの群に同様に適用することができる。検出のこのモードに従ってそれらの他のマーカーを使用して、本発明を使用するために、当業者は、上記に示される手引きに単純に従うが、パネル A のマーカーを彼らが選択した他のマーカーと置き換えるであろう。

10

【 0 3 0 5 】

(参考文献)

1. Foerch, C., Montaner, J., Furie, K. L., Ning, M. M., and Lo, E. H. (2009) Invited Article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 73, 393-399
2. Poca, M. A., Sahuquillo, J., Vilalta, A., De los Rios, J., Robles, A., and Exposito, L. (2006) Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: Description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 23, 1510-1517
3. Hutchinson, P. J., O'Connell, M. T., Kirkpatrick, P. J., and Pickard, J. D. (2002) How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? *Physiol. Meas.* 23, R75-R109
4. Reinstrup, P., Stahl, N., Mellergard, P., Uski, T., Ungerstedt, U., and Nordstrom, C. H. (2000) Intracerebral microdialysis in clinical practice: Baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 47, 701-709
5. Tisdall, M. M., and Smith, M. (2006) Cerebral microdialysis: research technique or clinical tool. *Br. J. Anaesth.* 97, 18-25
6. Maurer, M. H. (2008) Proteomics of brain extracellular fluid (ECF) and cerebrospinal fluid (CSF). *Mass Spectrom. Rev.*, DOI:10.1002/mas.20213
7. Maurer, M. H., Haux, D., Unterberg, A. W., and Sakowitz, O. W. (2008) Proteomics of human cerebral microdialysate: From detection of biomarkers to clinical application. *Proteomics Clin. Appl.* 2, 437-443
8. Helmy, A., Carpenter, K. L. H., Skepper, J. N., Kirkpatrick, P. J., Pickard, J. D., and Hutchinson, P. J. (2009) Microdialysis of Cytokines: Methodological Considerations, Scanning Electron Microscopy, and Determination of Relative Recovery. *J. Neurotrauma* 26, 549-561
9. Donato, R. (2001) S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33, 637-668
10. Afinowi, R., Tisdall, M., Keir, G., Smith, M., Kitchen, N., and Petzold, A. (2009) Improving the recovery of S100B protein in cerebral microdialysis: Implications for multimodal monitoring in neurocritical care. *J. Neurosci. Methods* 181, 95-99
11. Maurer, M. H., Berger, C., Wolf, M., Futterer, C. D., Feldmann, R. E., Jr., Schwab, S., and Kuschinsky, W. (2003) The proteome of human brain microdialysate

20

30

40

50

. Proteome Science 1, 7

12. Maurer, M. H., Haux, D., Sakowitz, O. W., Unterberg, A. W., and Kuschinsky, W. (2007) Identification of early markers for symptomatic vasospasm in human cerebral microdialysate after subarachnoid hemorrhage: Preliminary results of a proteome-wide screening. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1675-1683
13. Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., and Sanchez, J. C. (2008) Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.* 80, 2921-2931
14. Thompson, A., Schafer, J., Kuhn, K., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Nueumann, T., and Hamon, C. (2003) Tandem mass tags: A novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.* 75, 1895-1904
15. Lescuyer, P., Allard, L., Zimmermann-Ivol, C. G., Burgess, J. A., Hughes-Fruetiger, S., Burkhard, P. R., Sanchez, J. C., and Hochstrasser, D. F. (2004) Identification of post-mortem cerebrospinal fluid proteins as potential biomarkers of ischemia and neurodegeneration. *Proteomics* 4, 2234-2241
16. Tuck, M. K., Chan, D. W., Chia, D., Godwin, A. K., Grizzle, W. E., Krueger, K. E., Rom, W., Sanda, M., Sorbara, L., Stass, S., Wang, W., and Brenner, D. E. (2009) Standard operating procedures for serum and plasma collection: early detection research network consensus statement standard operating procedure integration working group. *J Proteome Res* 8, 113-117
17. Bradford, M. M. (1976) Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
18. Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99
19. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets - procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350-4354
20. Burgess, J. A., Lescuyer, P., Hainard, A., Burkhard, P. R., Turck, N., Michel, P., Rossier, J. S., Reymond, F., Hochstrasser, D. F., and Sanchez, J. C. (2006) Identification of brain cell death associated proteins in human post-mortem cerebrospinal fluid. *J. Proteome Res.* 5, 1674-1681
21. Hainard, A., Tiberti, N., Robin, X., Lejon, V., Ngoyi, D. M., Matovu, E., Enyaru, J. C., Fouda, C., Ndung'u, J. M., Lisacek, F., Muller, M., Turck, N., and Sanchez, J. C. (2009) A Combined CXCL10, CXCL8 and H-FABP Panel for the Staging of Human African Trypanosomiasis Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3, e459
22. Horth, P., Miller, C. A., Preckel, T., and Wenz, C. (2006) Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis. *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1968-1974
23. Ros, A., Faupel, M., Mees, H., van Oostrum, J., Ferrigno, R., Reymond, F., Michel, P., Rossier, J. S., and Girault, H. H. (2002) Protein purification by Off-Gel electrophoresis. *Proteomics* 2, 151-156
24. Dayon, L., Turck, N., Kienle, S., Schulz-Knappe, P., Hochstrasser, D. F., Scherl, A., and Sanchez, J. C. (2010) Isobaric tagging-based selection and quantitation of cerebrospinal fluid tryptic peptides with reporter calibration curves. *Anal. Chem.*, DOI 10.1021/ac901854k
25. Herrmann, M., Vos, P., Wunderlich, M. T., de Bruijn, C., and Lamers, K. J. B

- . (2000) Release of glial tissue-specific proteins after acute stroke - A comparative analysis of serum concentrations of protein S-100B and glial fibrillary acidic protein. *Stroke* 31, 2670-2677
26. Jauch, E. C., Lindsell, C., Broderick, J., Fagan, S. C., Tilley, B. C., Levine, S. R., and Grp, N. r.-P. S. S. (2006) Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke - The National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke* 37, 2508-2513
27. Lamers, K. J. B., Vos, P., Verbeek, M. M., Rosmalen, F., van Geel, W. J. A., and van Engelen, B. G. M. (2003) Protein S-100B, neuron-specific enolase (NSE), myelin basic protein (MBP) and glial fibrillary acidic protein (GFAP) in cerebrospinal fluid (CSF) and blood of neurological patients. *Brain Res. Bull.* 61, 261-264
28. Buttner, T., Weyers, S., Postert, T., Sprengelmeyer, R., and Kuhn, W. (1997) S-100 protein: Serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 28, 1961-1965
29. Missler, U., Wiesmann, M., Friedrich, C., and Kaps, M. (1997) S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 28, 1956-1960
30. Berger, C., Dohmen, C., Maurer, M. H., Graf, R., and Schwab, S. (2004) Cerebral microdialysis in stroke. *Nervenarzt* 75, 113-123
31. Zougman, A., Pilch, B., Podtelejnikov, A., Kiehnopf, M., Schnabel, C., Kurnar, C., and Mann, M. (2008) Integrated analysis of the cerebrospinal fluid peptidome and proteome. *J. Proteome Res.* 7, 386-399
32. da Silva, S. F., Correa, C. L., Tortelote, G. G., Einicker-Lamas, M., Martinez, A. M. B., and Allodi, S. (2004) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in the visual system of the crab *Ucides cordatus* (Crustacea, Decapoda). *Biol. Cell* 96, 727-734
33. Kaufmann, A. M., Firlik, A. D., Fukui, M. B., Wechsler, L. R., Jungries, C. A., and Yonas, H. (1999) Ischemic core and penumbra in human stroke. *Stroke* 30, 93-99
34. Rothermundt, M., Peters, M., Prehn, J. H. M., and Arolt, V. (2003) S100B in brain damage and neurodegeneration. *Microsc. Res. Tech.* 60, 614-632
35. Wiesmann, M., Missler, U., Hagenstrom, H., and Gottmann, D. (1997) S-100 protein plasma levels after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien)*. 139, 1155-1160
36. Romner, B., Ingebrigtsen, T., Kongstad, F., and Borgesen, S. E. (2000) Traumatic brain damage: Serum S-100 protein measurements related to neuroradiological findings. *J. Neurotrauma* 17, 641-647
37. Sen, J., Belli, A., Petzold, A., Russo, S., Keir, G., Thompson, E. J., Smith, M., and Kitchen, N. (2005) Extracellular fluid S100B in the injured brain: a future surrogate marker of acute brain injury? *Acta Neurochir. (Wien)*. 147, 897-900
38. Salinas, A. E., and Wong, M. G. (1999) Glutathione S-transferases - A review. *Curr. Med. Chem.* 6, 279-309
39. Theodore, C., Singh, S. V., Hong, T. D., and Awasthi, Y. C. (1985) Glutathione S-transferases of human brain. Evidence for two immunologically distinct types of 26500-Mr subunits. *Biochem. J.* 225, 375-382
40. Shi, M., Bradner, J., Bammler, T. K., Eaton, D. L., Zhang, J. P., Ye, Z. C., Wilson, A. M., Montine, T. J., Pan, C., and Zhang, J. (2009) Identification of

Glutathione S-Transferase Pi as a Protein Involved in Parkinson Disease Progression. *Am. J. Pathol.* 175, 54-65

41. Rhee, S. G., Yang, K. S., Kang, S. W., Woo, H. A., and Chang, T. S. (2005) Controlled elimination of intracellular H₂O₂: Regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxidants & Redox Signaling* 7, 619-626

42. Wood, Z. A., Schroder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem. Sci.* 28, 32-40

43. Power, J. H. T., Asad, S., Chataway, T. K., Chegini, F., Manavis, J., Temlett, J. A., Jensen, P. H., Blumbergs, P. C., and Gai, W. P. (2008) Peroxiredoxin 6 in human brain: molecular forms, cellular distribution and association with Alzheimer's disease pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 115, 611-622

44. Sarafian, T. A., Verity, M. A., Vinters, H. V., Shih, C. C. Y., Shi, L. R., Ji, X. D., Dong, L. P., and Shau, H. Y. (1999) Differential expression of peroxiredoxin subtypes in human brain cell types. *J. Neurosci. Res.* 56, 206-212

45. Basso, M., Giraud, S., Corpillo, D., Bergamasco, B., Lopiano, L., and Fasanò, M. (2004) Proteome analysis of human substantia nigra in Parkinson's disease. *Proteomics* 4, 3943-3952

46. Krapfenbauer, K., Engidawork, E., Cairns, N., Fountoulakis, M., and Lubec, G. (2003) Aberrant expression of peroxiredoxin subtypes in neurodegenerative disorders. *Brain Res.* 967, 152-160

47. Schreiber, G., van Horssen, J., Haseloff, R. F., Reijerkerk, A., van der Poel, S. M. A., Nieuwenhuizen, O., Krause, E., Blasig, I. E., Dijkstra, C. D., Ronken, E., and de Vries, H. E. (2008) Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier. *Free Radic. Biol. Med.* 45, 256-264

48. Kim, Y. J., Lee, W. S., Ip, C., Chae, H. Z., Park, E. M., and Park, Y. M. (2006) Prx1 suppresses radiation-induced c-Jun NH₂-terminal kinase signaling in lung cancer cells through interaction with the glutathione S-transferase Pi/c-Jun NH₂-terminal kinase complex. *Cancer Res.* 66, 7136-7142

49. Manevich, Y., Feinstein, S. I., and Fisher, A. B. (2004) Activation of the antioxidant enzyme 1-CYS peroxiredoxin requires glutathionylation mediated by heterodimerization with pi GST. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3780-3785

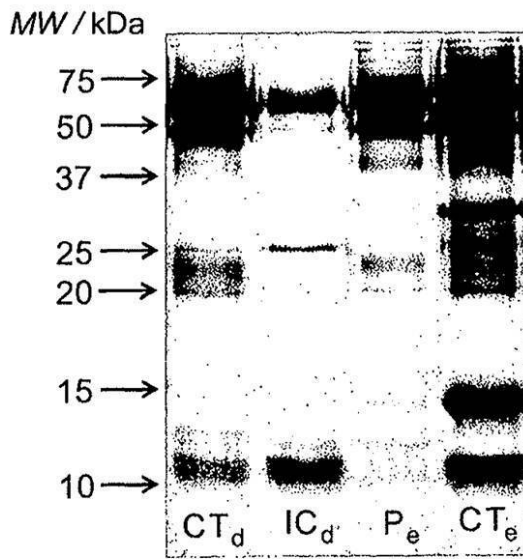
50. Ralat, L. A., Manevich, Y., Fisher, A. B., and Colman, R. F. (2006) Direct evidence for the formation of a complex between 1-cysteine peroxiredoxin and glutathione S-transferase pi with activity changes in both enzymes. *Biochemistry (Moscow)* 45, 360-372

【 0 3 0 6 】

上記の本明細書において言及される刊行物はすべて、参照によって本明細書において組み込まれる。本発明の記載される態様及び実施形態の様々な変更及び差異は、本発明の範囲から逸脱することなく、当業者らに明らかになるであろう。本発明は、特定の好ましい実施形態に関して記載したが、特許請求に係る本発明がそのような特定の実施形態に不当に限定されないことを理解されたい。実際、当業者らに明らかで、本発明を実行するための記載されるモードの様々な変更は、以下の特許請求の範囲内にあることが意図される。

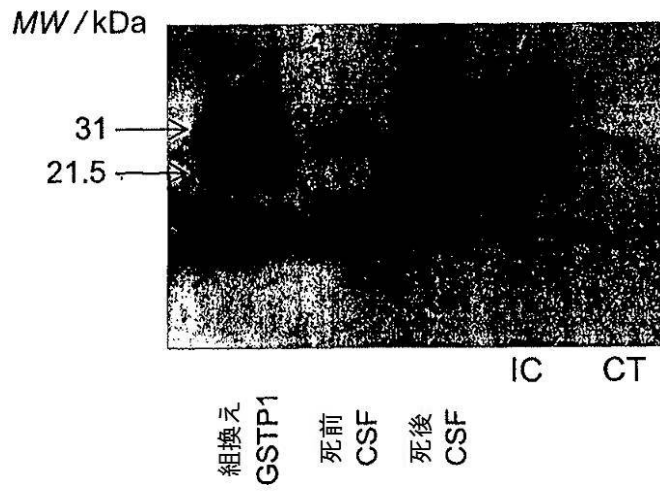
【 図 1 】

Figure 1



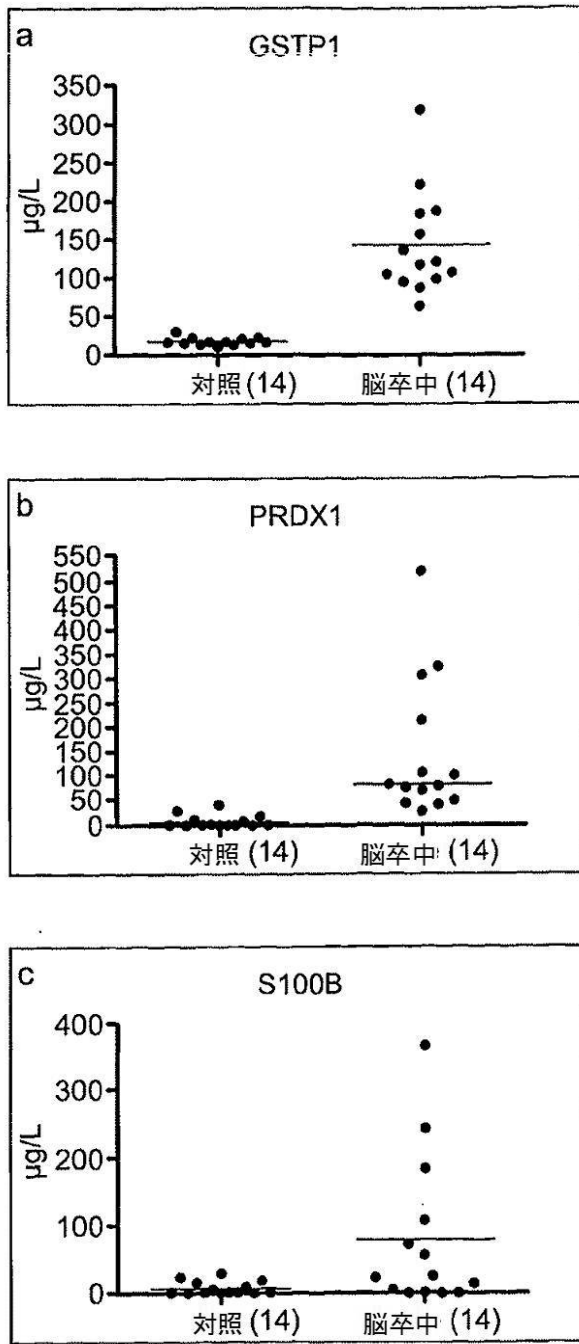
【 図 2 】

Figure 2



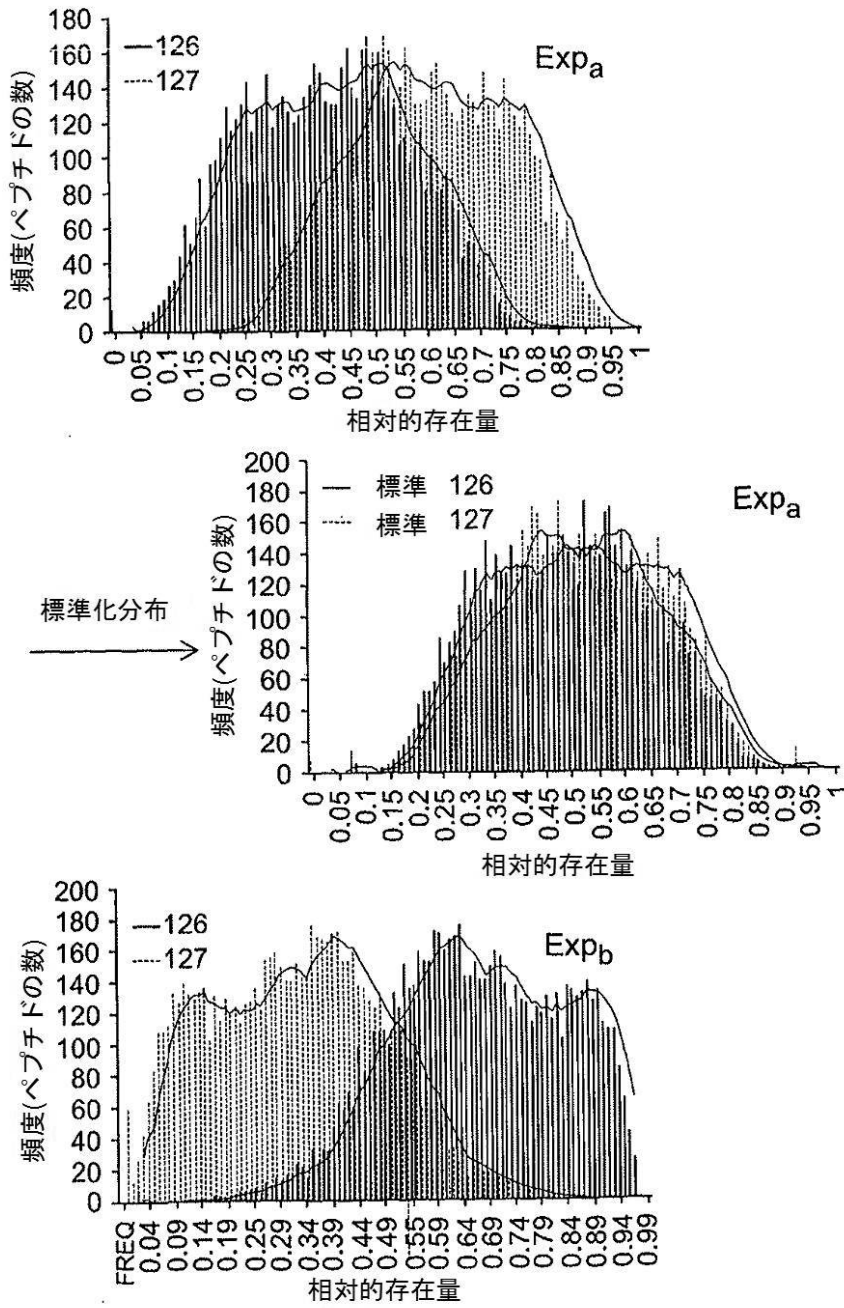
【 図 3 】

Figure 3



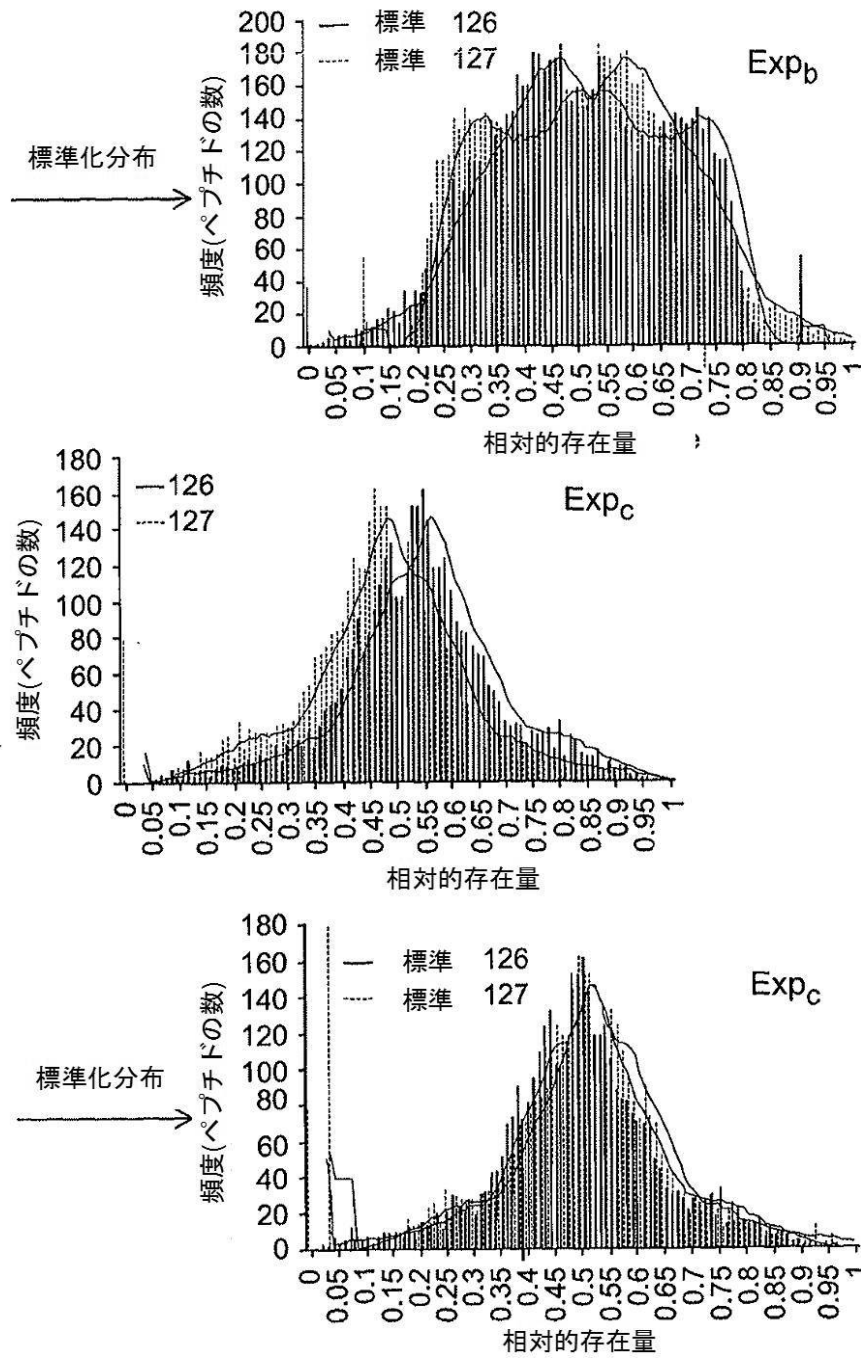
【図 4 - 1】

Figure 4 - SD1



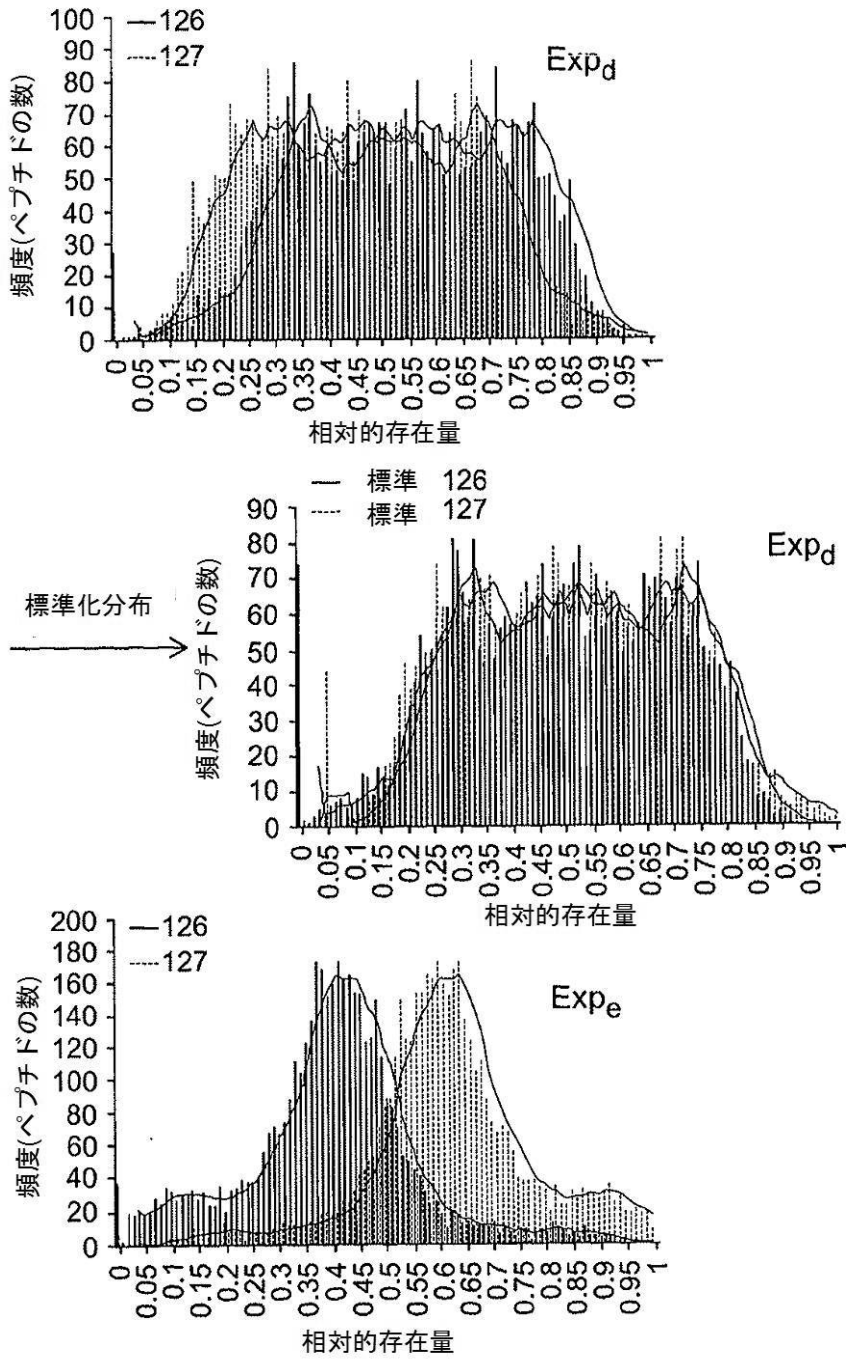
【図 4 - 2】

Figure 4 - SD1



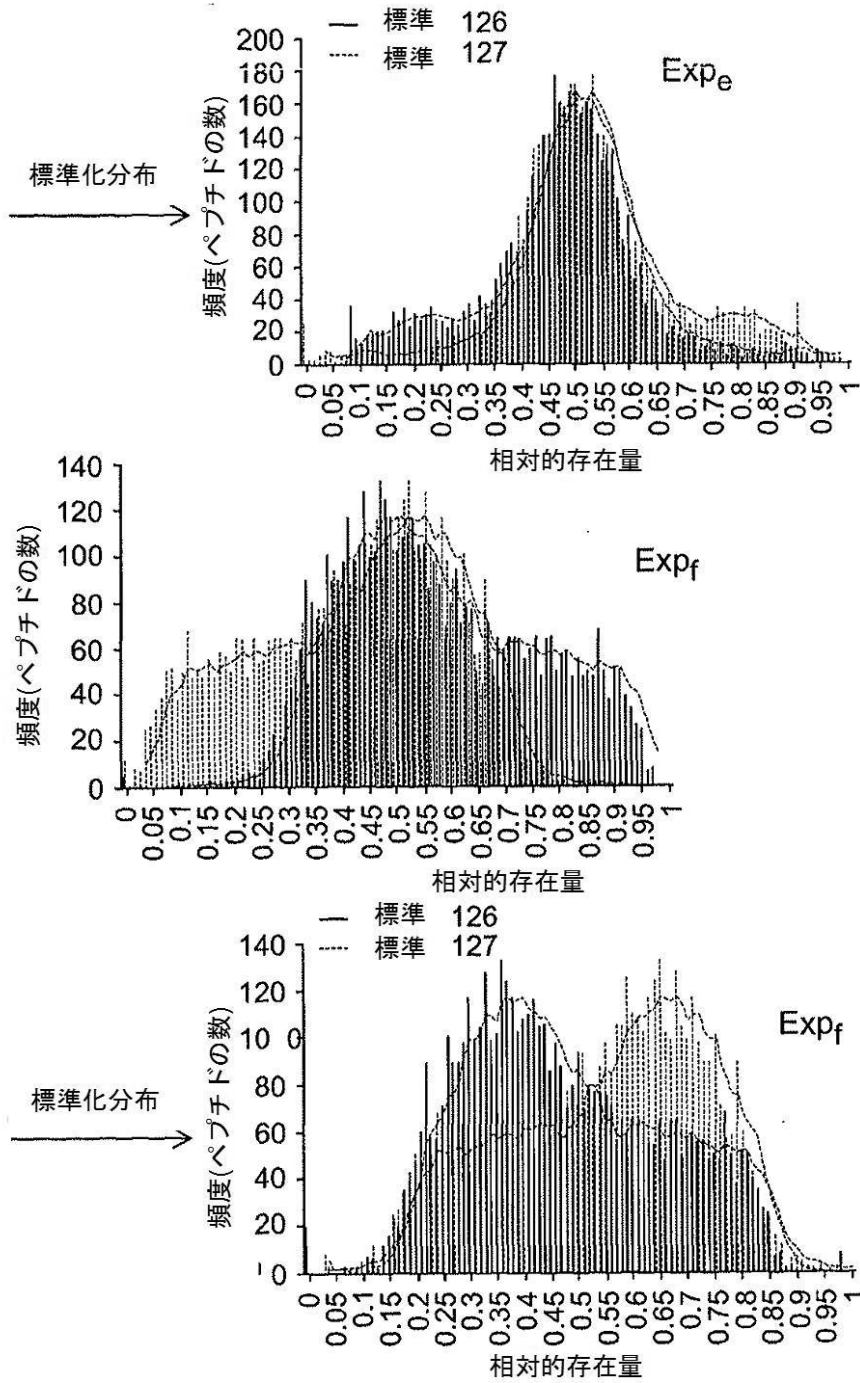
【図4-3】

Figure 4 - SD1



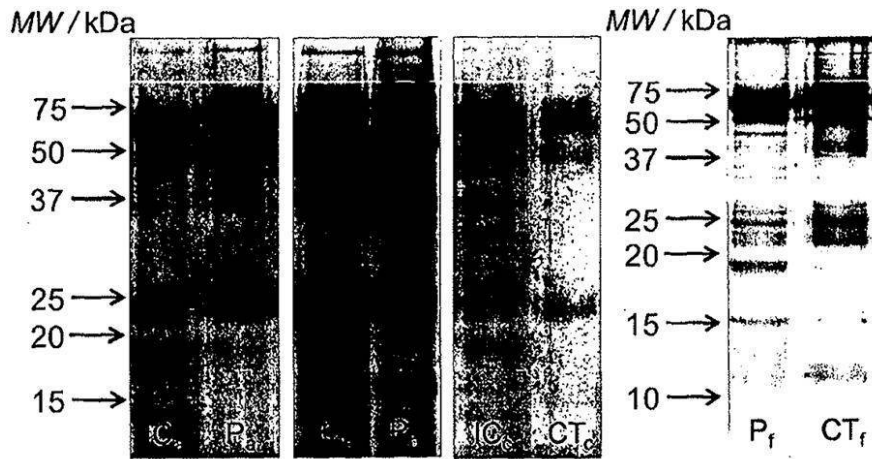
【図 4 - 4】

Figure 4 - SD1



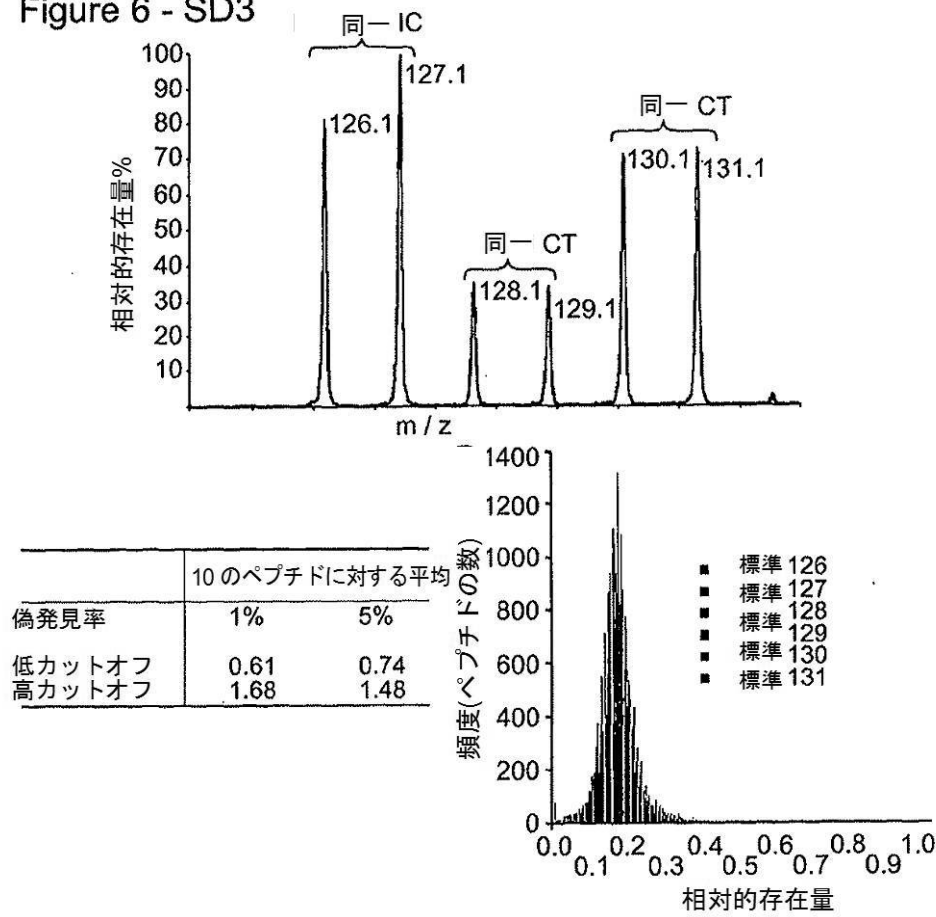
【 図 5 】

Figure 5 - SD2



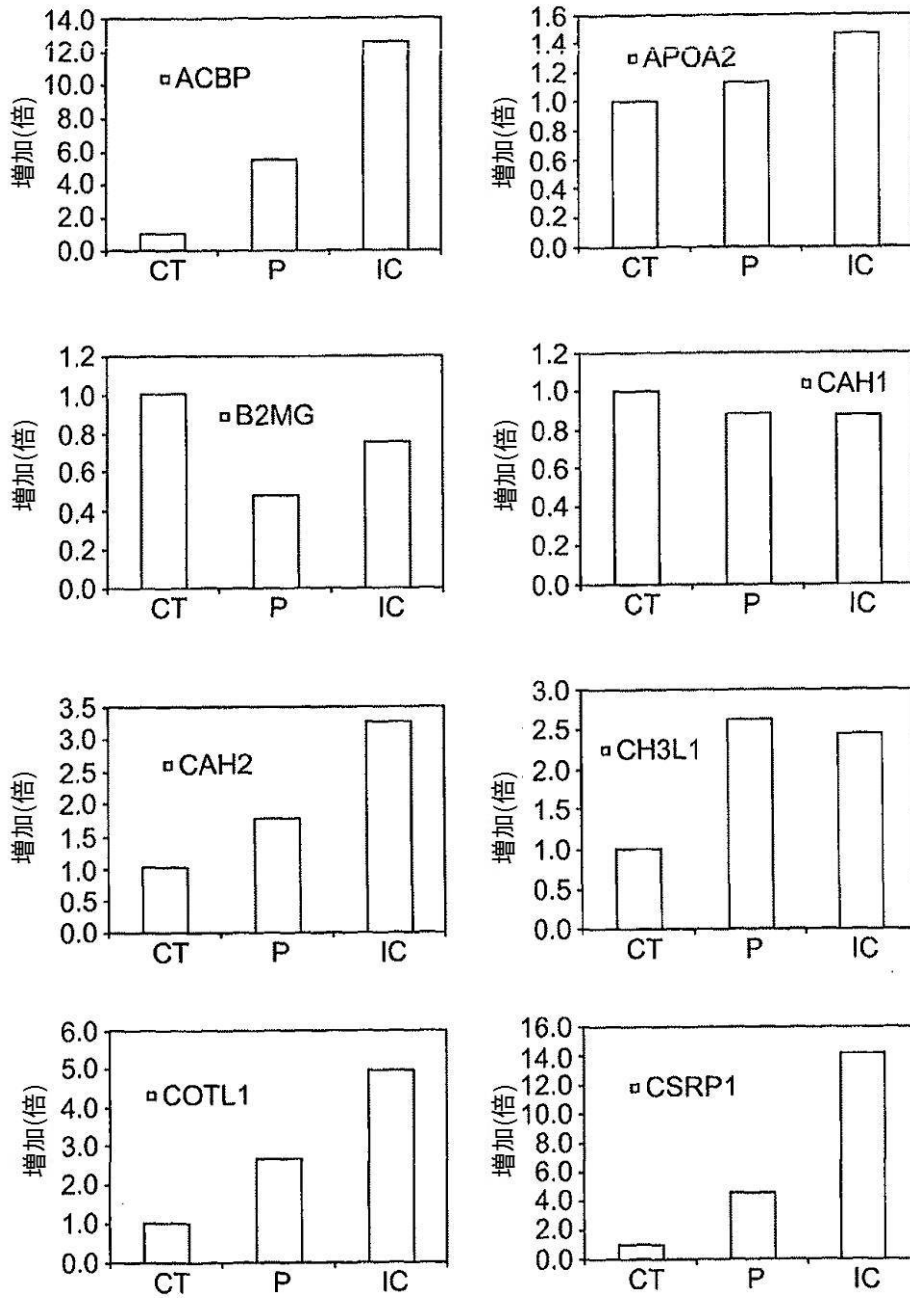
【 図 6 】

Figure 6 - SD3



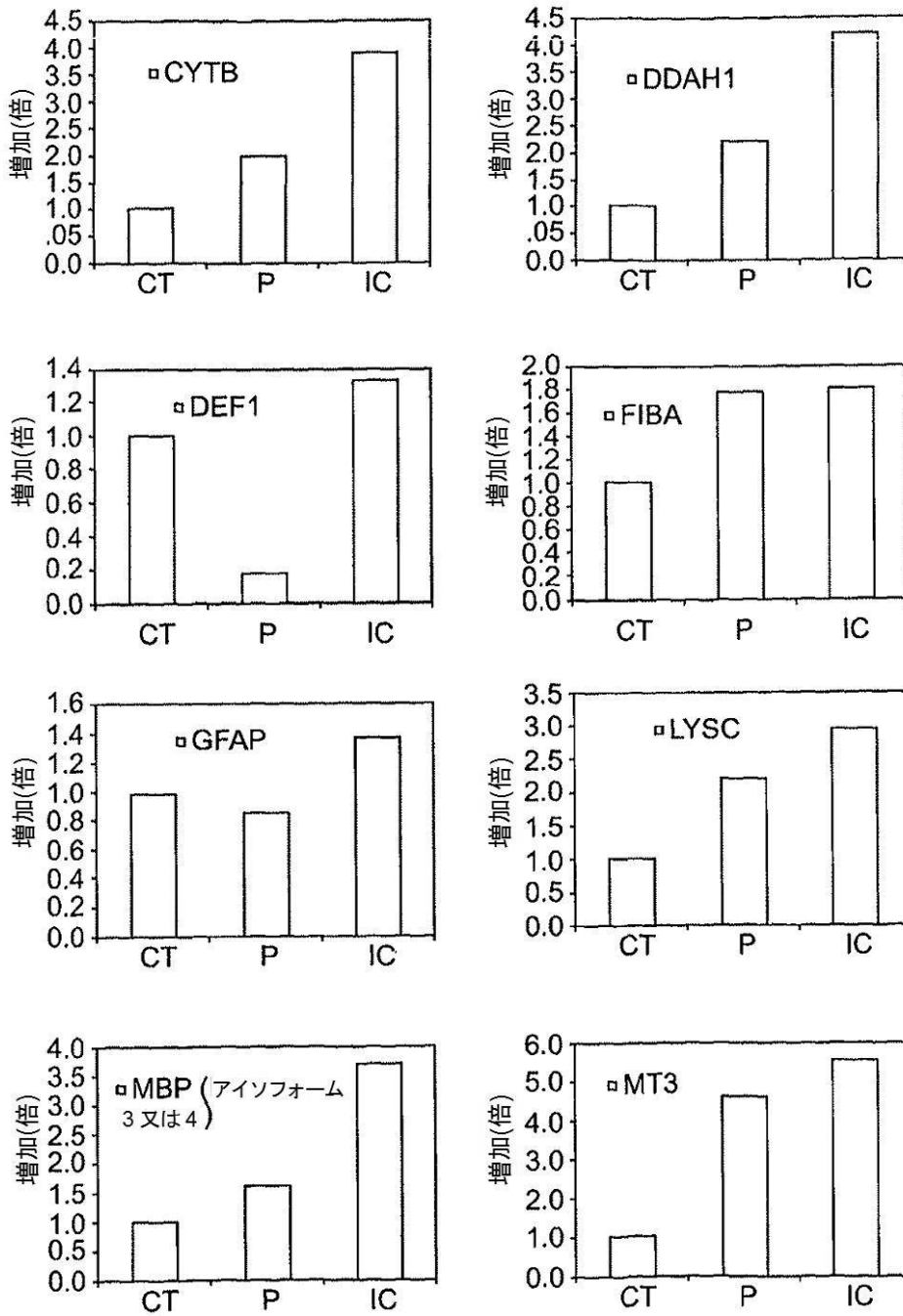
【图 7 - 1】

Figure 7



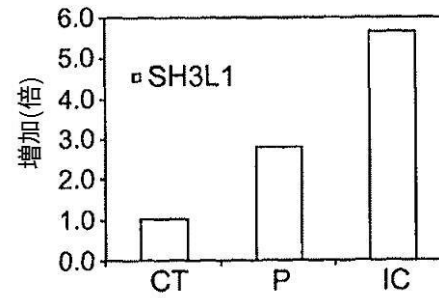
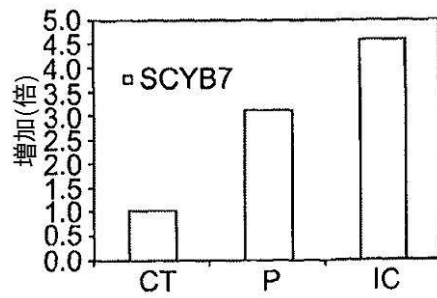
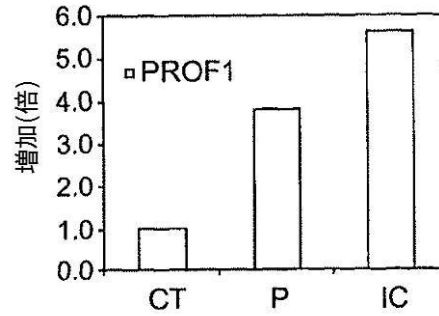
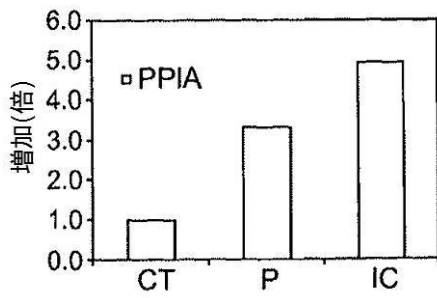
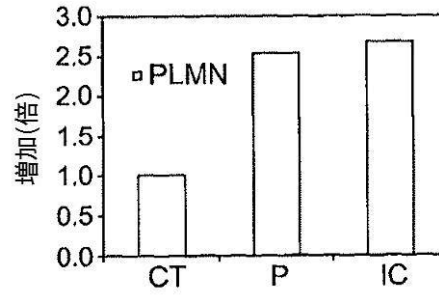
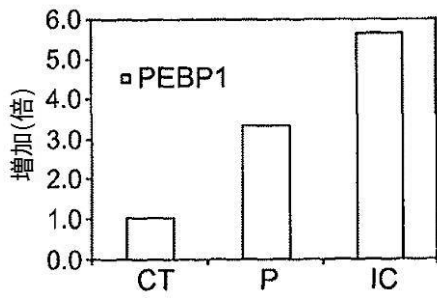
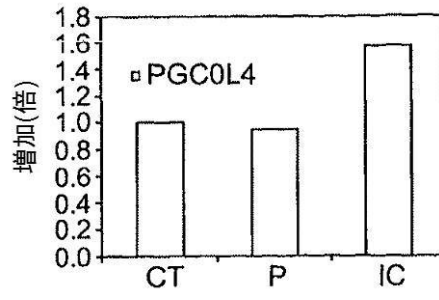
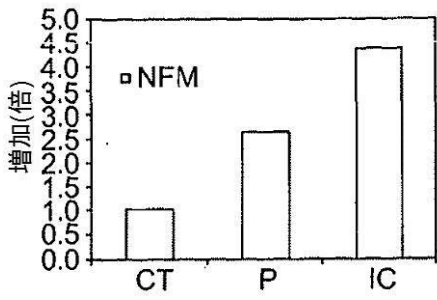
【図7-2】

Figure 7 Continued



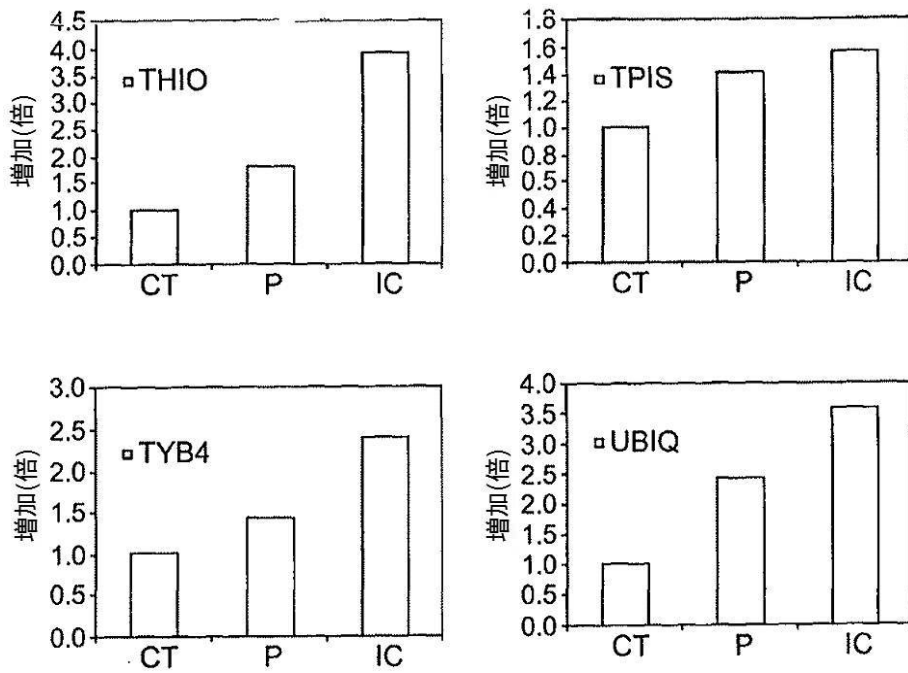
【 図 7 - 3 】

Figure 7 Continued



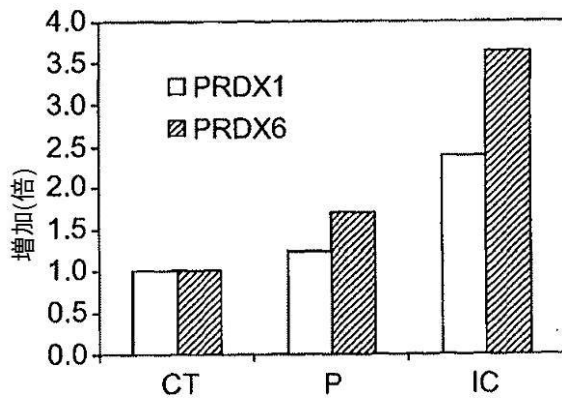
【 图 7 - 4 】

Figure 7 Continued



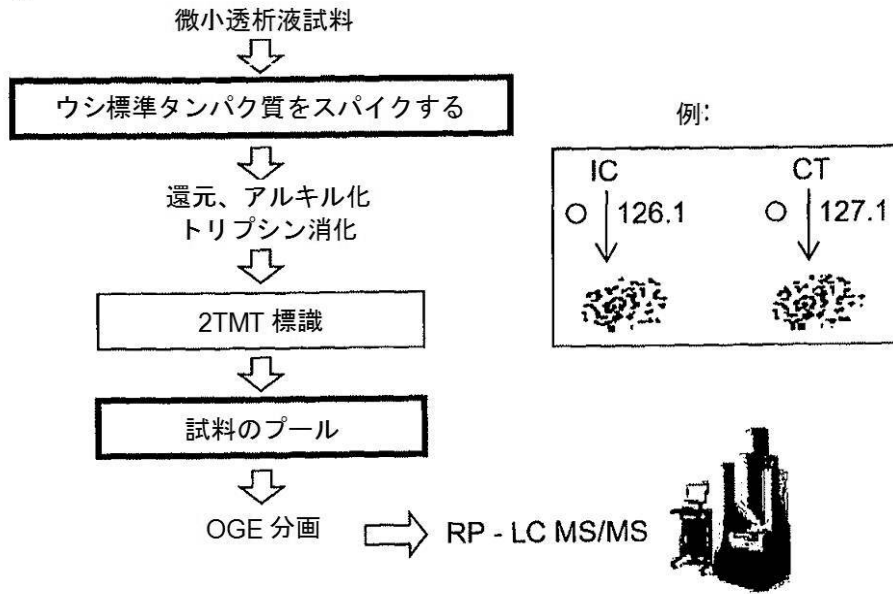
【 图 8 】

Figure 8



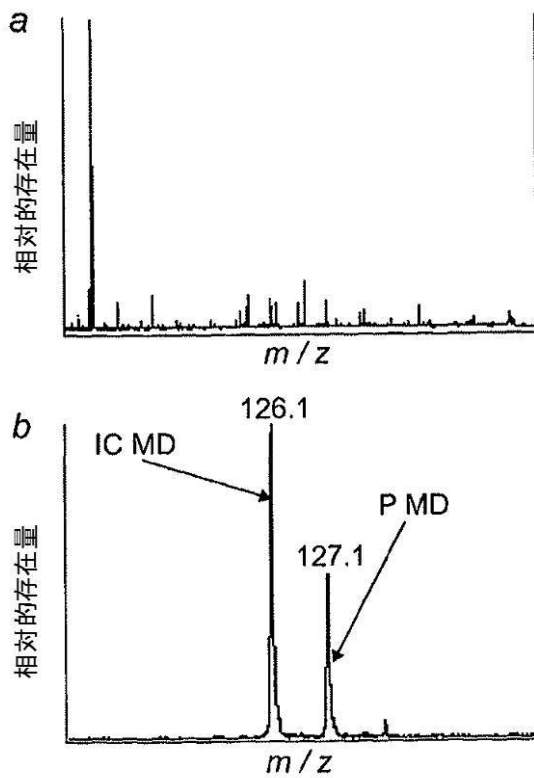
【 図 9 】

Figure 9



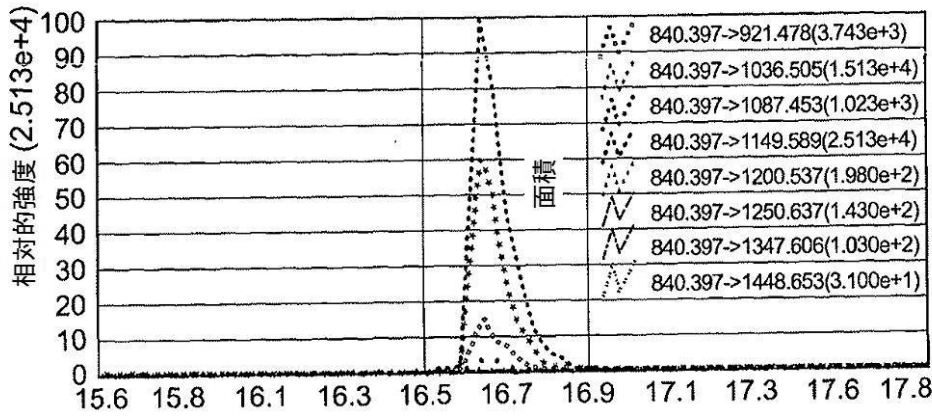
【 図 10 】

Figure 10



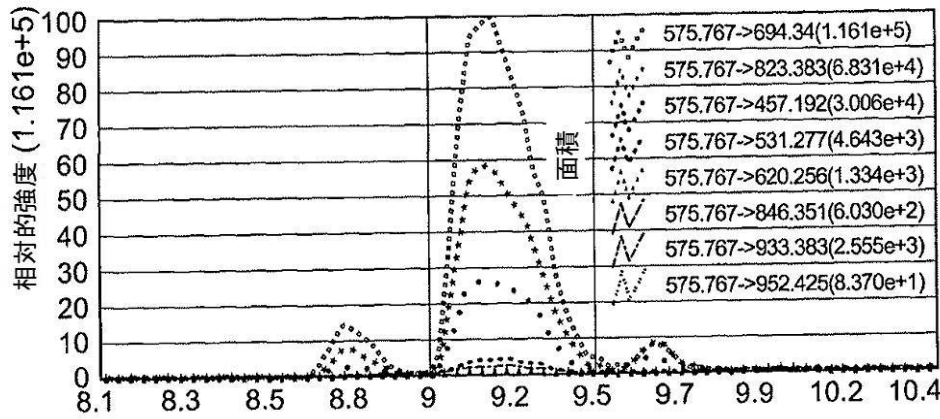
【 図 1 1 】

Figure 11



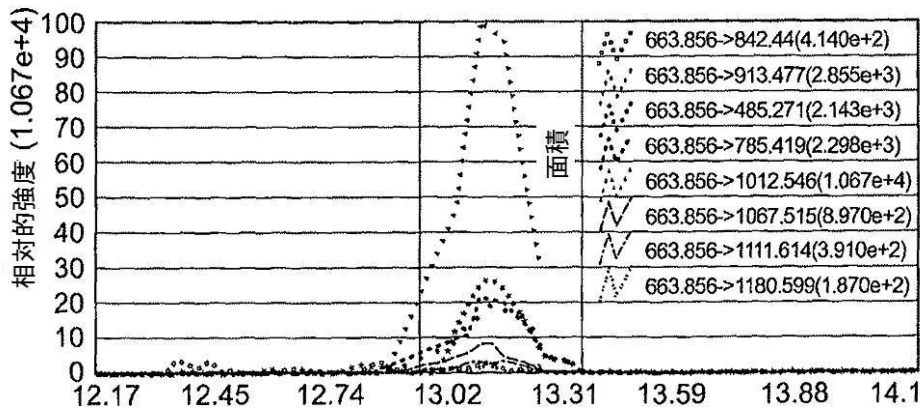
【 図 1 2 】

Figure 12



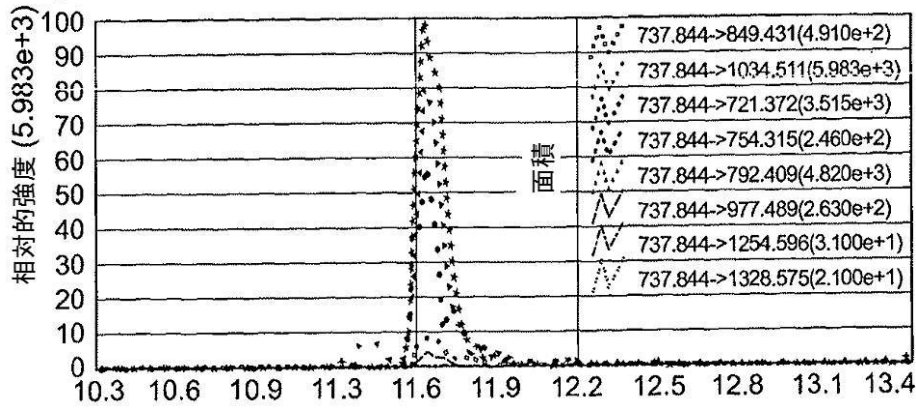
【 図 1 3 】

Figure 13



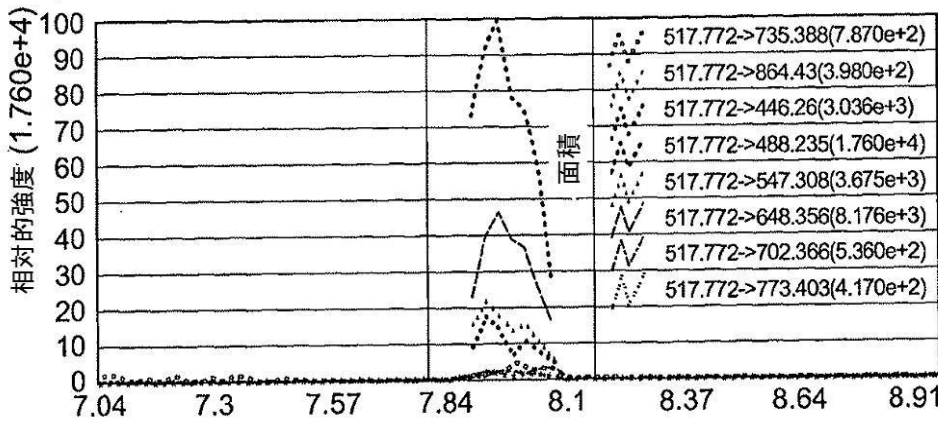
【 図 1 4 】

Figure 14



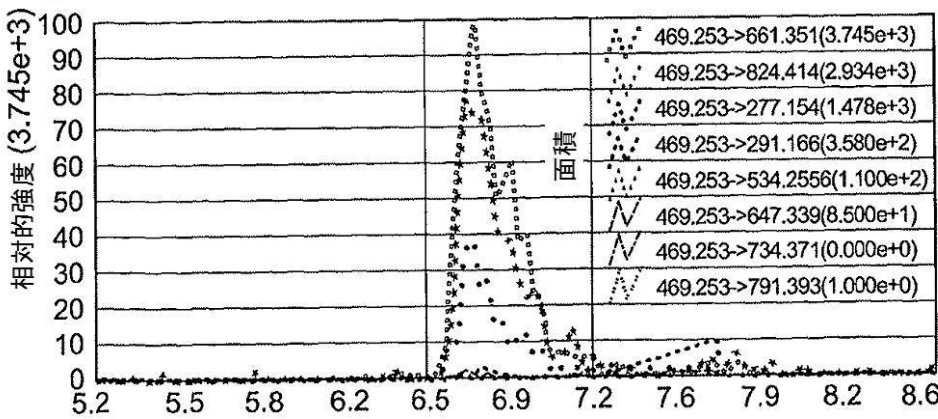
【 図 1 5 】

Figure 15



【 図 1 6 】

Figure 16



【 配 列 表 】

2013531784000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/GB2011/000784
Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of: a. (means) <input checked="" type="checkbox"/> on paper <input checked="" type="checkbox"/> in electronic form b. (time) <input type="checkbox"/> in the international application as filed <input type="checkbox"/> together with the international application in electronic form <input checked="" type="checkbox"/> subsequently to this Authority for the purpose of search	
2.	<input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	
3.	Additional comments:	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, Sequence Search, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/007129 A2 (UNIV GENEVE [CH]; LUCAS BRIAN [GB]; HOCHSTRASSER DENIS FRANCOIS [CH];) 18 January 2007 (2007-01-18) page 9, lines 22-34 pages 2348, 50; examples 1, 4, 5 -----	1-24, 26-29, 33-42
Y	SHI MIN ET AL: "Identification of Glutathione S-Transferase Pi as a Protein Involved in Parkinson Disease Progression", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 175, no. 1, July 2009 (2009-07), pages 54-65, XP009152634, ISSN: 0002-9440 cited in the application abstract ----- -/--	1-24, 26-29, 33-42
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 September 2011		Date of mailing of the international search report 03/02/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Petri, Bernhard

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2006)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000784

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JENNIFER A. BURGESS ET AL: "Identification of Brain Cell Death Associated Proteins in Human Post-mortem Cerebrospinal Fluid", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 5, no. 7, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 1674-1681, XP055008270, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr060160v abstract figure 3	1-24, 26-29, 33-42
Y	----- R. BROUNS ET AL: "Neurobiochemical Markers of Brain Damage in Cerebrospinal Fluid of Acute Ischemic Stroke Patients", CLINICAL CHEMISTRY, vol. 56, no. 3, 3 December 2009 (2009-12-03), pages 451-458, XP055007833, ISSN: 0009-9147, DOI: 10.1373/clinchem.2009.134122 abstract	1-24, 26-29, 33-42
Y	----- DAVID L. NASH ET AL: "S100 as a Marker of Acute Brain Ischemia: A Systematic Review", NEUROCRITICAL CARE, vol. 8, no. 2, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 301-307, XP055008160, ISSN: 1541-6933, DOI: 10.1007/s12028-007-9019-x abstract	1-24, 26-29, 33-42
Y	----- SEN J ET AL: "Extracellular fluid S100B in the injured brain: a future surrogate marker of acute brain injury?", ACTA NEUROCHIRURGICA ; THE EUROPEAN JOURNAL OF NEUROSURGERY, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 147, no. 8, 1 August 2005 (2005-08-01), pages 897-900, XP019377852, ISSN: 0942-0940, DOI: 10.1007/S00701-005-0526-2 abstract	1-24, 26-29, 33-42
Y	----- STROICK MARK ET AL: "Protein S-100B - A prognostic marker for cerebral damage", CURRENT MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 13, no. 25, 2006, pages 3053-3060, XP002660203, ISSN: 0929-8673 the whole document page 3055, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 2; figure 2	1-24, 26-29, 33-42
	----- -/--	

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000784

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BENABDESSELAM Ouardia ET AL: "La protéine S-100B: biomarqueur de diagnostic et de suivi de lésions cérébrales aiguës", SPECTRA BIOLOGIE,, vol. 26, no. 158,, 1 April 2007 (2007-04-01), pages 40-45, XP009152583, ISSN: 0295-1967 page 44, left-hand column, paragraph 2 -----	1-24, 26-29, 33-42
Y	SCHREIBELT G ET AL: "Protective effects of peroxiredoxin-1 at the injured blood-brain barrier", FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE, ELSEVIER SCIENCE, US, vol. 45, no. 3, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 256-264, XP022713693, ISSN: 0891-5849, DOI: 10.1016/J.FREERADBIOMED.2008.03.024 [retrieved on 2008-04-16] abstract -----	1-24, 26-29, 33-42
X	WO 2008/021290 A2 (HOMESTEAD CLINICAL CORP [US]; INST SYSTEMS BIOLOGY [US]; HOOD LEROY [U]) 21 February 2008 (2008-02-21) Sequences: 41491, 41501, 41483, 41485, 41500, 41493, 41499, 41507, 10383, 41506, 41484; page 275, line 1 -----	36-41
A	KWANG-HOE CHUNG ET AL: "Proteomic Identification of Overexpressed PRDX 1 and Its Clinical Implications in Ovarian Carcinoma", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 9, no. 1, 4 January 2010 (2010-01-04), pages 451-457, XP055008317, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr900811x abstract -----	1-24, 26-29, 33-42
A	MAURER MARTIN H: "PROTEOMICS OF BRAIN EXTRACELLULAR FLUID (ECF) AND CEREBROSPINAL FLUID (CSF)", MASS SPECTROMETRY REVIEWS, vol. 29, no. 1, 30 December 2008 (2008-12-30), pages 17-28, XP009152470, ISSN: 0277-7037 cited in the application the whole document page 22, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 3; figure 2 ----- ----- -/--	1-24, 26-29, 33-42

1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2011/000784

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	C. L. ALLEN ET AL: "Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke", INTERNATIONAL JOURNAL OF STROKE, vol. 4, no. 6, 1 December 2009 (2009-12-01), pages 461-470, XP055008323, ISSN: 1747-4930, DOI: 10.1111/j.1747-4949.2009.00387.x page 466, left-hand column - page 467, left-hand column -----	1-24, 26-29, 33-42
X,P	LOÏC DAYON ET AL: "Brain Extracellular Fluid Protein Changes in Acute Stroke Patients", JOURNAL OF PROTEOME RESEARCH, vol. 10, no. 3, 13 December 2010 (2010-12-13), pages 1043-1051, XP055007830, ISSN: 1535-3893, DOI: 10.1021/pr101123t tables 3-5 -----	1-24, 26-29, 33-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2011/000784**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-24, 26-29, 33-42(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/GB2011/000784

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-24, 26-29, 33-42(all partially)

Method of aiding diagnosis of acute brain damage, said method comprising assaying at least one oxidative stress polypeptide, wherein the oxidative stress peptide is PRDX1, assay devices, uses, and preparations.

2. claims: 1-24, 26-29, 33-42(all partially)

Method of aiding diagnosis of acute brain damage, said method comprising assaying at least one oxidative stress polypeptide, wherein the oxidative stress peptide is PRDX6, assay devices, uses, and preparations.

3. claims: 1-24, 26-29, 33-42(all partially)

Method of aiding diagnosis of acute brain damage, said method comprising assaying at least one oxidative stress polypeptide, wherein the oxidative stress peptide is GSTP1, assay devices, uses, and preparations.

4. claims: 25-28, 30-42(all partially)

Use for diagnostic or prognostic application relating to stroke of a material which recognizes a polypeptide wherein the polypeptide is selected from panel 2/Table 14 and is ACBP.

5-48. claims: 25-28, 30-42(all partially)

Use for diagnostic or prognostic application relating to stroke of a material which recognizes a polypeptide wherein the polypeptide is selected from panel 2/Table 14 and is the marker listed as second, third, fourth ... , 44th in panel 2, respectively.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2011/000784

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007007129 A2	18-01-2007	AT 456055 T	15-02-2010
		AU 2006268034 A1	18-01-2007
		CA 2613991 A1	18-01-2007
		EP 1902319 A2	26-03-2008
		ES 2336946 T3	19-04-2010
		GB 2428240 A	24-01-2007
		JP 2009501333 A	15-01-2009
		US 2008220013 A1	11-09-2008
		WO 2007007129 A2	18-01-2007
		WO 2008021290 A2	21-02-2008
CA 2660286 A1	21-02-2008		
EP 2057465 A2	13-05-2009		
JP 2010500568 A	07-01-2010		
WO 2008021290 A2	21-02-2008		

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01) C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 14/47 (2006.01) C 0 7 K 14/47

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

(71)出願人 512300045
 レセルカ インスティトゥット デ レセルカ オスピタウ ウニヴェルシタリ ヴァイ デプロ
 ン
 RECERCA INSTITUT DE RECERCA HOSPITAL UNIVERS
 ITARI VALL D'HEBRON
 スペイン国 イー - 0 8 0 3 5バルセロナ 1 1 9 - 1 2 9 パッセージヴァイデブロン

(71)出願人 511174546
 エレクトロフォレティクス リミテッド
 ELECTROPHORETICS LIMITED
 イギリス国 コバム ケーティー 1 1 3イービー ダウンサイドブリッジロード コバムハウス

(74)代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀

(74)代理人 100102255
 弁理士 小澤 誠次

(74)代理人 100096482
 弁理士 東海 裕作

(74)代理人 100120086
 弁理士 高 津 一也

(74)代理人 100131093
 弁理士 堀内 真

(72)発明者 ダヨン ロイク ジェラルド
 イギリス国 ロンドン エスイー 2 2 9イーアール クリスタルパレスロード 1 4 4

(72)発明者 サンチェス ジャン - チャールズ
 スイス国 シーエイチ - 1 1 2 1ジュネーブ 4 1ルーミッシェルセルヴェ ユニバーシティオブ
 ジェニーヴァ ユニバーシティメディカルセンター(シーエムユー) デパートメントオブストラ
 クチュラルバイオロジーアンドバイオインフォマティクス

(72)発明者 モンタナ ヴィラロンガ ジュアン
 スペイン国 イー - 0 8 0 3 7バルセロナ パッセージサンジュアン 1 4 9 5 ° ラ

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 FA12 GA09 LA07 LA08
 2G045 AA13 CA25 DA36 FB05
 4B029 AA07 BB15 BB17 FA12
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA75 DA86 EA50 FA34
 FA71

专利名称(译)	诊断方法		
公开(公告)号	JP2013531784A	公开(公告)日	2013-08-08
申请号	JP2013510677	申请日	2011-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	海胆科尔多瓦引用和日内瓦 日内瓦大学 莱斯细胞该隐研究所TUTTO阿尔细胞混乱资本家Uuni威赛西塔复兴德布罗恩 研究医院研究院UNIVRI VALLEY dHebron 电泳有限公司		
申请(专利权)人(译)	Univashite德日内瓦 Reseruka研究所TUTTO德Reseruka医院Israelita阿尔伯特Univerushitari威Deburon 电Foret的遗传学有限公司		
[标]发明人	ダヨンロイクジェラルド サンチェスジャンチャールズ モンタナヴィラロンガジュアン		
发明人	ダヨン ロイク ジェラルド サンチェス ジャン-チャールズ モンタナ ヴィラロンガ ジュアン		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N37/00 G01N27/62 C12M1/34 C07K16/18 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/6896 C12N9/0065 C12N9/1088 C12Q1/26 C12Q1/48 G01N2800/2871 G01N2800/50		
FI分类号	G01N33/68.ZNA G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N27/62.V C12M1/34.Z C07K16/18 C07K14/47		
F-TERM分类号	2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/FA12 2G041/GA09 2G041/LA07 2G041/LA08 2G045/AA13 2G045/CA25 2G045/DA36 2G045/FB05 4B029/AA07 4B029/BB15 4B029/BB17 4B029/FA12 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA86 4H045/EA50 4H045/FA34 4H045/FA71		
代理人(译)	▲▼高津哉 堀内申		
优先权	2010008541 2010-05-21 GB		
其他公开文献	JP5775568B2 JP2013531784A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及辅助受试者急性脑损伤诊断的方法，所述方法包括 (i) 测定选自下组的至少一种氧化应激多肽的浓度：PRDX1，PRDX6和GSTP1。说的话题；(ii) 测定选自A组的至少一种其他多肽的浓度；(iii) 将(i)和(ii)的浓度与参考标准中多肽的浓度进行比较，并确定所述多肽的定量比例；(iv) 其中发现样品中每种测定多肽与参照标准中多肽的定量比大于1.3表明在所述受试者中发生急性脑损伤的可能性增加。

アシルCoA結合タンパク質	アポリポタンパク質A-II前駆物質	アポリポタンパク質A-IV前駆物質	アタアポリン-4
ベータ-2-ミクログロブリン前駆物質	カルボニックアンヒドラーゼ2	キチナーゼ-3様タンパク質1前駆物質	コアクトシン様タンパク質
コフィリン-1	補体C4-A前駆物質	シスタチン-B	システイングリシンリッチタンパク質1
ジアゼパム結合阻害剤、スプライス形態1c	フィブリノゲンアルファ鎖前駆物質	フラビンレダクターゼ	ヘモグロビンサブユニットアルファ
ヘテロ核リボスクレオタンパク質G	ヒストンH1.2	ヒストンH1.5	ヒドロキシアシルグルタチオンヒドロラーゼ
キニノーゲン-1前駆物質	リゾチームC前駆物質	メタロチオネイン-2	メタロチオネイン-3
ミエリン塩基性タンパク質[アイソフォーム3]	ミオグロビン	N(G),N(G)-ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ1	ニューロフィラメントミディアムポリペプチド
好中球デフェンシン1前駆物質	バラレミン	ペプチジルプロリルシストランスイソメラーゼA	ペルオキシレドキシシン-2
ホスファチジルエタノールアミン結合タンパク質1	血漿レチノール結合タンパク質前駆物質	プラスミノーゲン前駆物質	血小板塩基性タンパク質前駆物質
プロフィリン-1	プロトロンビン前駆物質	SH3ドメイン結合グルタミン酸リッチ様タンパク質	スタスミン
チモシンベータ-10	チモシンベータ-4	トリオースリン酸イソメラーゼ	ユビキチン
ユビキチンカルボキシル末端ヒドラーゼアイソザイムL1			