

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6127084号
(P6127084)

(45) 発行日 平成29年5月10日(2017.5.10)

(24) 登録日 平成29年4月14日(2017.4.14)

(51) Int.Cl.		F I			
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N	33/53		D
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N	33/543	5 O 1 A	
C 1 2 M 1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34		B
C 1 2 Q 1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		

請求項の数 18 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2015-79120 (P2015-79120)
 (22) 出願日 平成27年4月8日(2015.4.8)
 (62) 分割の表示 特願2012-523974 (P2012-523974)
 の分割
 原出願日 平成22年8月6日(2010.8.6)
 (65) 公開番号 特開2015-132628 (P2015-132628A)
 (43) 公開日 平成27年7月23日(2015.7.23)
 審査請求日 平成27年4月8日(2015.4.8)
 (31) 優先権主張番号 61/232,033
 (32) 優先日 平成21年8月7日(2009.8.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

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

審査官 草川 貴史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 脳脊髄液の免疫的識別のための装置および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

試料中の脳脊髄液の存在または不在を検出するための装置であって、
 試料添加領域と、

第一 C S F 富化タンパク質への第一抗体を有する試料標識領域であって、該第一抗体は移動粒子と共役する領域と、

前記第一 C S F 富化タンパク質への第二抗体を有する試料検出領域であって、該第二抗体は該試料検出領域に固定される領域と、を具備し、

前記試料検出領域の検出可能バンドの存在が、試料中の脳脊髄液の存在を示すものとし

、
 前記第一 C S F 富化タンパク質は、c D N A F L J 5 9 8 9 3₁ ディックコップフ (d i c k k o p f) 同族体 3 前駆体 (S E Q I D N O : 1 3 ; 登録番号 g i | 4 0 5 4 8 3 8 9) であるものとする装置。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の装置であって、

前記装置は、第二 C S F 富化タンパク質への抗体をさらに具備し、

前記第二 C S F 富化タンパク質は、神経細胞付着分子様タンパク質のアイソフォーム 1 (S E Q I D N O : 1 ; 登録番号 g i : 6 2 0 8 8 2 3 8)、鎖 A₁ ウシ膀胱トリプシン阻害剤 (B p t i) と複合したヒトメソトリプシン (S E Q I D N O : 2 ; 登録番号 g i : 1 6 2 3 3 0 0 9 5)、C N T N 2 コンタクチン - 2 前駆体 (S

EQ ID NO: 3; 登録番号 gi | 4827022)、コンタクチン - 1 の CNTN1 アイソフォーム 2 (SEQ ID NO: 4; 登録番号 gi: 28373119)、SPARC 様タンパク質 1 (無名タンパク質産物) に高度に類似した cDNA (SEQ ID NO: 5; 登録番号: gi | 194388050)、NRCAM (神経細胞付着分子) タンパク質 [ホモ・サピエンス] のわずかに長い切片 (~96 kDa) (登録番号: SEQ ID NO: 6; gi | 68534652 および SEQ ID NO: 7; gi | 109731501)、NCAM2 神経細胞付着分子 2, アイソフォーム CRA__a (SEQ ID NO: 8; 登録番号 gi | 119630409)、SERPINA3 セルピンペプチダーゼ阻害剤, クレード A, アルファ - 1 - アンチキモトリプシン / 生育阻害タンパク質 25 [ホモ・サピエンス] のメンバー 3 前駆体 / アイソフォーム 1、あるいはアルファ - 1 - アンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片 (SEQ ID NO: 9; 登録番号 gi | 46981961)、AGT アンジオテンシノーゲン (SEQ ID NO: 10; 登録番号 gi | 553181)、アンジオテンシノーゲン前駆体 (セルピン A8) (SEQ ID NO: 11; 登録番号 gi | 4557287)、免疫グロブリンスーパーファミリー, メンバー 4 B とも呼ばれる、ヒトにおいては細胞付着分子 3 とも呼ばれる無名タンパク質産物 (SEQ ID NO: 12; 登録番号 gi | 187608363)、SERPINF1 セリン (またはシステイン) プロテナーゼ阻害剤, クレード F (アルファ - 2 アンチプラスミン, 色素上皮由来因子, Pedf), メンバー 1 アイソフォーム 4 因子 (SEQ ID NO: 14; 登録番号 gi | 15988024)、GC ビタミン D - 結合タンパク質 PREDICTED 類似のヒトタンパク質: ビタミン D - 結合タンパク質 [チンパンジー] (SEQ ID NO: 15; 登録番号 181482)、CD14 ヒト単核細胞抗原 CD14 (CD14) (SEQ ID NO: 16; 登録番号 gi | 117646212)、CADM3 ホモ・サピエンス細胞付着分子 3 (CADM3), 転写変異体 1 (SEQ ID NO: 17; 登録番号 gi | 90080503)、CLU cDNA FLJ57622 に類似、クラスチリンに高度に類似の無名タンパク質 (SEQ ID NO: 20; 登録番号 gi | 189054091)、クラスチリンに高度に類似の無名タンパク質 (SEQ ID NO: 21; 登録番号 gi | 193787502)、LMAN2 小胞性統合膜タンパク質 VIP36 (SEQ ID NO: 22; 登録番号 gi | 157834800)、クラスチリンアイソフォーム 1 [ホモ・サピエンス] (SEQ ID NO: 23; 登録番号 NM_001831.2)、超酸化ジスムターゼ 3, 細胞外前駆体 (SEQ ID NO: 24; 登録番号 gi | 118582275)、フィブリン アルファ C ターム切片 (SEQ ID NO: 25; 登録番号 gi | 223057)、鎖 A, ヒトカリクレイン 6 (Hk6) 活性形またはカリクレイン - 6 の KLK6 アイソフォーム 1 (SEQ ID NO: 26; 登録番号 gi | 21465970)、APCS 血清アミロイド P 成分 / 鎖 A または五量体ヒト血清アミロイド P 成分 (SEQ ID NO: 27; 登録番号 gi | 576259)、FAM3C タンパク質 FAM3C / 配列類似 3 の族, メンバー C 前駆体 [ホモ・サピエンス] 記 = 予測される骨芽細胞タンパク質, インターロイキン様 EMT 誘導物質 (SEQ ID NO: 28; 登録番号 gi | 55629272), あるいは前記 CSF 抗原のうち 2 つ以上の組み合わせである。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の装置であって、

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

【請求項 4】

請求項 2 に記載の装置であって、

個々の抗体をしきい値のレベルで用いる。

【請求項 5】

請求項 2 に記載の装置であって、

10

20

30

40

50

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

【請求項 6】

請求項 1 に記載の装置であって、

前記装置は、試料中の C S F 富化タンパク質のレベルの定量を行う。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の装置であって、

前記 C S F 富化タンパク質への第一抗体は、C S F 富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合する。

【請求項 8】

試料中の C S F の存在または不在を検出するための方法であって、

試料と、C S F 富化タンパク質に特異的な結合パートナーとを接触させる工程と、結合パートナー 第一 C S F 富化タンパク質複合体が存在する場合にそれを検出する工程と、を具備し、検出可能な複合体の存在が試料中の C S F の存在を示すものとし、

前記第一 C S F 富化タンパク質は、c D N A F L J 5 9 8 9 3、ディックコップフ (d i c k k o p f) 同族体 3 前駆体 (S E Q I D N O : 1 3 ; 登録番号 g i | 4 0 5 4 8 3 8 9) であるものとする方法。

【請求項 9】

試料と、第二 C S F 富化タンパク質に特異的に結合する第二の異なる抗体とを接触させる工程をさらに具備し、

前記第二 C S F 富化タンパク質は、神経細胞付着分子様タンパク質のアイソフォーム 1 (S E Q I D N O : 1 ; 登録番号 g i : 6 2 0 8 8 2 3 8)、鎖 A、ウシ膀胱トリプシン阻害剤 (B p t i) と複合したヒトメソトリプシン (S E Q I D N O : 2 ; 登録番号 g i : 1 6 2 3 3 0 0 9 5)、C N T N 2 コンタクチン - 2 前駆体 (S E Q I D N O : 3 ; 登録番号 g i | 4 8 2 7 0 2 2)、コンタクチン - 1 の C N T N 1 アイソフォーム 2 (S E Q I D N O : 4 ; 登録番号 g i : 2 8 3 7 3 1 1 9)、S P A R C 様タンパク質 1 (無名タンパク質産物) に高度に類似した c D N A (S E Q I D N O : 5 ; 登録番号 : g i | 1 9 4 3 8 8 0 5 0)、N R C A M (神経細胞付着分子) タンパク質 [ホモ・サピエンス] のわずかに長い切片 (~ 9 6 k D a) (登録番号 : S E Q I D N O : 6 ; g i | 6 8 5 3 4 6 5 2 および S E Q I D N O : 7 ; g i | 1 0 9 7 3 1 5 0 1)、N C A M 2 神経細胞付着分子 2、 アイソフォーム C R A _ a (S E Q I D N O : 8 ; 登録番号 g i | 1 1 9 6 3 0 4 0 9)、S E R P I N A 3 セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレード A、アルファ - 1 - アンチキモトリプシン / 生育阻害タンパク質 2 5 [ホモ・サピエンス] のメンバー 3 前駆体 / アイソフォーム 1、あるいはアルファ - 1 - アンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片 (S E Q I D N O : 9 ; 登録番号 g i | 4 6 9 8 1 9 6 1)、A G T アンギオテンシノーゲン (S E Q I D N O : 1 0 ; 登録番号 g i | 5 5 3 1 8 1)、アンギオテンシノーゲン前駆体 (セルピン A 8) (S E Q I D N O : 1 1 ; 登録番号 g i | 4 5 5 7 2 8 7)、免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー 4 B と呼ばれる、ヒトにおいては細胞付着分子 3 と呼ばれる無名タンパク質産物 (S E Q I D N O : 1 2 ; 登録番号 g i | 1 8 7 6 0 8 3 6 3)、S E R P I N F 1 セリン (またはシステイン) プロテイナーゼ阻害剤、クレード F (アルファ - 2 アンチプラスミン、色素上皮由来因子、P e d f)、メンバー 1 アイソフォーム 4 因子 (S E Q I D N O : 1 4 ; 登録番号 g i | 1 5 9 8 8 0 2 4)、G C ビタミン D - 結合タンパク質 P R E D I C T E D 類似のヒトタンパク質 ; ビタミン D - 結合タンパク質 [チンパンジー] (S E Q I D N O : 1 5 ; 登録番号 1 8 1 4 8 2)、C D 1 4 ヒト単核細胞抗原 C D 1 4 (C D 1 4) (S E Q I D N O : 1 6 ; 登録番号 g i | 1 1 7 6 4 6 2 1 2)、C A D M 3 ホモ・サピエンス細胞付着分子 3 (C A D M 3)、転写変異体 1 (S E Q I D N O : 1 7 ; 登録番号 g i | 9 0 0 8 0 5 0 3)、C L U c D N A F L J 5 7 6 2 2 に類似、クラステリンに高度に類似の無名タ

10

20

30

40

50

ンパク質 (SEQ ID NO: 20; 登録番号 gi | 189054091)、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質 (SEQ ID NO: 21; 登録番号 gi | 193787502)、LMAN2 小胞性統合膜タンパク質VIP36 (SEQ ID NO: 22; 登録番号 gi | 157834800)、クラステリンアイソフォーム1 [ホモ・サピエンス] (SEQ ID NO: 23; 登録番号 NM_001831.2)、超酸化ジスムターゼ3、細胞外前駆体 (SEQ ID NO: 24; 登録番号 gi | 118582275)、フィブリン アルファCターム切片 (SEQ ID NO: 25; 登録番号 gi | 223057)、鎖A、ヒトカリクレイン6 (Hk6) 活性形またはカリクレイン-6のK L K 6アイソフォーム1 (SEQ ID NO: 26; 登録番号 gi | 21465970)、APCS 血清アミロイドP成分/鎖Aまたは五量体ヒト血清アミロイドP成分 (SEQ ID NO: 27; 登録番号 gi | 576259)、FAM3Cタンパク質 FAM3C / 配列類似3の族、メンバーC前駆体 [ホモ・サピエンス] 記 = 予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様EMT誘導物質 (SEQ ID NO: 28; 登録番号 gi | 55629272)、前記CSF抗原のCSF富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記CSF抗原のうち2つ以上の組み合わせであるものとする請求項8に記載の方法。

10

【請求項10】

個々の抗体をしきい値のレベルにおいて用いる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】

検定は試料と、それぞれ異なるCSF富化タンパク質と特異的に結合する4~10の異なる抗体との接触を含むとともに、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としない、請求項9に記載の方法。

20

【請求項12】

前記結合パートナーは検出可能標識を有する、請求項8に記載の方法。

【請求項13】

試料中の結合パートナー CSF富化タンパク質複合体を定量する工程をさらに具備する、請求項9に記載の方法。

【請求項14】

前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出は特異的な抗体結合を含む、請求項8に記載の方法。

30

【請求項15】

前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出はイン・シトゥイミュノアッセイを含む、請求項8に記載の方法。

【請求項16】

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

【請求項17】

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

【請求項18】

前記結合パートナーはCSF富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合する、請求項8に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、他の体液中での濃度に比してCSF中で豊富な1つ以上のタンパク質の検出による、試料中の脳脊髄液(CSF)の存在または不在の検出のための装置および方法をここで述べる。

【背景技術】

【0002】

脳脊髄液(CSF)または脳脊髄水剤は、クモ膜下腔、および中枢神経系(CNS)を

50

囲い貫通する脳室に存する。CSFは脳および脊髄を浴するとともに、水和、栄養、代謝廃物除去、および流体静力学的衝撃緩衝剤をニューロンおよびグリアに提供する。CSFは、側脳室および第四脳室の脈絡叢によって、拡散、飲作用および能動輸送を組み合わせた手順により、動脈血から生成される。CSFはまた、ニューロンおよびグリアに生成される成分を含む。脳室系を経てのクモ膜下腔への拡散の後で、CSFの大半はクモ膜の粒状化によって再吸収され、硬膜静脈叢を経て血流に再入する。およそ500mlの水剤が毎日生成され、成人で全体積140～150mlのCSFが6～8時間毎に更新される。CSFは、あまねくCNSで硬膜によって包まれる。さらなる液体が吻CNSによって生成され、最終的に尾側脊髄へ排出され網膜板を尾側の液流へ提供する。CSFは、主に塩、グルコース、タンパク質および水の、等浸透圧性の混合物である。腰部からのCSFは、15～45mg/dlのタンパク質(0.3～1%の血清タンパク質濃度)および50～80mg/dlのグルコース(60%の血糖)を含む。槽および脳室のCSFのタンパク質濃度は低い。

10

【0003】

CSFのタンパク質景観は2つのグループに分けられる。健康な個人のCSF中の主成分を構成する血液誘導タンパク質、および脳誘導タンパク質である。CSF中のタンパク質のおよそ20%が脳柔組織から生じるが、その部分集合のみが実際に脳特異的である。

【0004】

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

20

【0005】

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

【0006】

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

【0007】

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

30

【0008】

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

【0009】

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

40

【0010】

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

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

50

【特許文献1】米国特許出願公開第2004/0002168号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

本発明は以上の如き状況に鑑みてなされたものであり、他の体液中での濃度に比してCSF中で豊富な1つ以上のタンパク質の検出による、試料中の脳脊髄液(CSF)の存在または不在の検出に関する。民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い母集団の混合体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出のための装置および方法の提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

10

【0013】

即ち、本発明においては、試料中の脳脊髄液の存在または不在を検出するための装置であって、試料添加領域と、第一CSF富化タンパク質への第一抗体を有する試料標識領域であって、該第一抗体は移動粒子と共役する領域と、前記第一CSF富化タンパク質への第二抗体を有する試料検出領域であって、該第二抗体は該試料検出領域に固定される領域と、を具備し、前記試料検出領域の検出可能バンドの存在が、試料中の脳脊髄液の存在を示すものとし、前記第一CSF富化タンパク質は、cDNA FLJ59893、ディックコップフ(dickkopf)同族体3前駆体(SEQ ID NO: 13; 登録番号 gi|40548389)である。

【0014】

20

本発明においては、前記装置は、第二CSF富化タンパク質への抗体をさらに具備し、前記第二CSF富化タンパク質は、神経細胞付着分子様タンパク質のアイソフォーム1(SEQ ID NO: 1; 登録番号 gi: 62088238)、鎖A、ウシ膵臓トリプシン阻害剤(Bpti)と複合したヒトメソトリプシン(SEQ ID NO: 2; 登録番号 gi: 162330095)、CNTN2コンタクチン-2前駆体(SEQ ID NO: 3; 登録番号 gi|4827022)、コンタクチン-1のCNTN1アイソフォーム2(SEQ ID NO: 4; 登録番号 gi: 28373119)、SPARC様タンパク質1(無名タンパク質産物)に高度に類似したcDNA(SEQ ID NO: 5; 登録番号: gi|194388050)、NRCAM(神経細胞付着分子)タンパク質[ホモ・サピエンス]のわずかに長い切片(~96kDa) (登録番号: SEQ ID NO: 6; gi|68534652およびSEQ ID NO: 7; gi|109731501)、NCAM2神経細胞付着分子2、アイソフォームCRA_a(SEQ ID NO: 8; 登録番号 gi|119630409)、SERPINA3セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA、アルファ-1-アンチキモトリプシン/生育阻害タンパク質25[ホモ・サピエンス]のメンバー3前駆体/アイソフォーム1、あるいはアルファ-1-アンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片(SEQ ID NO: 9; 登録番号 gi|46981961)、AGTアンギオテンシノーゲン(SEQ ID NO: 10; 登録番号 gi|553181)、アンギオテンシノーゲン前駆体(セルピンA8)(SEQ ID NO: 11; 登録番号 gi|4557287)、免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー4Bとも呼ばれる、ヒトにおいては細胞付着分子3とも呼ばれる無名タンパク質産物(SEQ ID NO: 12; 登録番号 gi|187608363)、SERPINF1セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードF(アルファ-2アンチプラスミン、色素上皮由来因子、Pedf)、メンバー1アイソフォーム4因子(SEQ ID NO: 14; 登録番号 gi|15988024)、GCビタミンD-結合タンパク質PREDICTED類似のヒトタンパク質: ビタミンD-結合タンパク質[チンパンジー](SEQ ID NO: 15; 登録番号 181482)、CD14ヒト単核細胞抗原CD14(CD14)(SEQ ID NO: 16; 登録番号 gi|117646212)、CADM3ホモ・サピエンス細胞付着分子3(CADM3)、転写変異体1(SEQ ID NO: 17; 登録番号 gi|90080503

30

40

50

)、CLU cDNA FLJ57622に類似、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質 (SEQ ID NO: 20; 登録番号 gi | 189054091)、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質 (SEQ ID NO: 21; 登録番号 gi | 193787502)、LMAN2小胞性統合膜タンパク質 VIP36 (SEQ ID NO: 22; 登録番号 gi | 157834800)、クラステリンアイソフォーム1 [ホモ・サピエンス] (SEQ ID NO: 23; 登録番号 NM_001831.2)、超酸化物ジスムターゼ3、細胞外前駆体 (SEQ ID NO: 24; 登録番号 gi | 118582275)、フィブリン アルファCターム切片 (SEQ ID NO: 25; 登録番号 gi | 223057)、鎖A、ヒトカリクレイン6 (HK6) 活性形またはカリクレイン - 6の KLK6 アイソフォーム1 (SEQ ID NO: 26; 登録番号 gi | 21465970)、APCS血清アミロイドP - 成分 / 鎖Aまたは五量体ヒト血清アミロイドP成分 (SEQ ID NO: 27; 登録番号 gi | 576259)、FAM3Cタンパク質 FAM3C / 配列類似3の族、メンバーC前駆体 [ホモ・サピエンス] 記 = 予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様EMT誘導物質 (SEQ ID NO: 28; 登録番号 gi | 55629272)、あるいは前記CSF抗原のうち2つ以上の組み合わせである。

10

【0015】

本発明においては、前記装置は1つに組み合わされた結果を提供するか、または個々の抗体について個別の結果を提供するものである。

【0016】

本発明においては、個々の抗体をしきい値のレベルで用いるものである。

20

【0017】

本発明においては、前記装置は、それぞれ異なるCSF富化タンパク質と特異的に結合する4~10の異なる抗体を含むとともに、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としないものである。

【0018】

本発明においては、前記装置は、試料中のCSF富化タンパク質のレベルの定量を行う。

【0019】

本発明においては、前記CSF富化タンパク質への第一抗体は、CSF富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合するものである。

30

【0020】

本発明においては、試料中のCSFの存在または不在を検出するための方法であって、試料と、CSF富化タンパク質に特異的な結合パートナーとを接触させる工程と、結合パートナー 第一CSF富化タンパク質複合体が存在する場合にそれを検出する工程と、を具備し、検出可能な複合体の存在が試料中のCSFの存在を示すものとし、前記第一CSF富化タンパク質は、cDNA FLJ59893、ディックコップ (dickkopf) 同族体3前駆体 (SEQ ID NO: 13; 登録番号 gi | 40548389) である。

【0021】

本発明においては、試料と、第二CSF富化タンパク質に特異的に結合する第二の異なる抗体とを接触させる工程をさらに具備し、前記第二CSF富化タンパク質は、神経細胞付着分子様タンパク質のアイソフォーム1 (SEQ ID NO: 1; 登録番号 gi : 62088238)、鎖A、ウシ膵臓トリプシン阻害剤 (Bpti) と複合したヒトメソトリプシン (SEQ ID NO: 2; 登録番号 gi : 162330095)、CNTN2 コンタクチン - 2前駆体 (SEQ ID NO: 3; 登録番号 gi | 4827022)、コンタクチン - 1の CNTN1 アイソフォーム2 (SEQ ID NO: 4; 登録番号 gi : 28373119)、SPARC様タンパク質1 (無名タンパク質産物) に高度に類似したcDNA (SEQ ID NO: 5; 登録番号: gi | 194388050)、NRCAM (神経細胞付着分子) タンパク質 [ホモ・サピ

40

50

エンス]のわずかに長い切片(～96kDa)(登録番号: SEQ ID NO: 6; gi|68534652およびSEQ ID NO: 7; gi|109731501)、NCAM2神経細胞付着分子2、アイソフォームCRA_a(SEQ ID NO: 8; 登録番号 gi|119630409)、SERPINA3セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA、アルファ-1-アンチキモトリプシン/生育阻害タンパク質25[ホモ・サピエンス]のメンバー3前駆体/アイソフォーム1、あるいはアルファ-1-アンチキモトリプシン前駆体のわずかに長い切片(SEQ ID NO: 9; 登録番号 gi|46981961)、AGTアンギオテンシノーゲン(SEQ ID NO: 10; 登録番号 gi|553181)、アンギオテンシノーゲン前駆体(セルピンA8)(SEQ ID NO: 11; 登録番号 gi|4557287)、免疫グロブリンスーパーファミリー,メンバー4Bとも呼ばれる、ヒトにおいては細胞付着分子3とも呼ばれる無名タンパク質産物(SEQ ID NO: 12; 登録番号 gi|187608363)、SERPINF1セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードF(アルファ-2アンチプラスミン,色素上皮由来因子, Pedf)、メンバー1アイソフォーム4因子(SEQ ID NO: 14; 登録番号 gi|15988024)、GCビタミンD-結合タンパク質PREDICTED類似のヒトタンパク質: ビタミンD-結合タンパク質[チンパンジー](SEQ ID NO: 15; 登録番号 181482)、CD14ヒト単核細胞抗原CD14(CD14)(SEQ ID NO: 16; 登録番号 gi|117646212)、CADM3ホモ・サピエンス細胞付着分子3(CADM3)、転写変異体1(SEQ ID NO: 17; 登録番号 gi|90080503)、CLU cDNA FLJ57622に類似、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質(SEQ ID NO: 20; 登録番号 gi|189054091)、クラステリンに高度に類似の無名タンパク質(SEQ ID NO: 21; 登録番号 gi|193787502)、LMAN2小胞性統合膜タンパク質VIP36(SEQ ID NO: 22; 登録番号 gi|157834800)、クラステリンアイソフォーム1[ホモ・サピエンス](SEQ ID NO: 23; 登録番号 NM_001831.2)、超酸化ジスムターゼ3、細胞外前駆体(SEQ ID NO: 24; 登録番号 gi|118582275)、フィブリン アルファCターム切片(SEQ ID NO: 25; 登録番号 gi|223057)、鎖A、ヒトカリクレイン6(Hk6)活性形またはカリクレイン-6のKlk6アイソフォーム1(SEQ ID NO: 26; 登録番号 gi|21465970)、APCS血清アミロイドP-成分/鎖Aまたは五量体ヒト血清アミロイドP成分(SEQ ID NO: 27; 登録番号 gi|576259)、FAM3Cタンパク質 FAM3C/配列類似3の族、メンバーC前駆体[ホモ・サピエンス]記=予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様EMT誘導物質(SEQ ID NO: 28; 登録番号 gi|55629272)、前記CSF抗原のCSF富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記CSF抗原のうち2つ以上の組み合わせであるものとする。

【0022】

本発明においては、個々の抗体をしきい値のレベルにおいて用いるものである。

【0023】

本発明においては、検定は試料と、それぞれ異なるCSF富化タンパク質と特異的に結合する4～10の異なる抗体との接触を含むとともに、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としないものである。

【0024】

本発明においては、前記結合パートナーは検出可能標識を有するものである。

【0025】

本発明においては、試料中の結合パートナー CSF富化タンパク質複合体を定量する工程をさらに具備するものである。

【0026】

10

20

30

40

50

本発明においては、前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出は特異的な抗体結合を含むものである。

【0027】

本発明においては、前記結合パートナーは抗体であるとともに、検出はイン・シトウイミュノアッセイを含むものである。

【0028】

本発明においては、前記試料は組織、血液、血清、血漿、尿、鼻および耳排出物、唾液、汗または涙である。

【0029】

本発明においては、前記試料は脳傷害を持つと考えられる個人からのものとする。

10

【0030】

本発明においては、前記結合パートナーはCSF富化タンパク質中の翻訳後修飾と結合するものである。

【発明の効果】

【0031】

本発明の効果として、以下に示すような効果を奏する。

【0032】

即ち、本発明によれば、他の体液中での濃度に比してCSF中で豊富な1つ以上のタンパク質の検出による、試料中の脳脊髄液(CSF)の存在または不在の検出に関する。民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い母集団の混合体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出のための装置および方法の提供することができる。

20

【図面の簡単な説明】

【0033】

【図1】図1は側方流動検定である。分析物をドロPPERまたは直接滴下でストリップの左端から加える。液体(約75 μ l)をストリップをわたって右へ移動させる。共役パッドは、可視粒子(金またはラテックス微小球)に取り付けられた可溶性IgGを含む。分析物溶液が分析物を含む場合、抗体は共役し、複合体がストリップをわたって移動する。混合物はまず、分析物に対する固定化抗体を含むテストストリップに接近する。分析物、可溶性の一次および可視タグは、それからテストラインに結合する。分析物が存在しない場合、可溶性分画はテストラインを通過する。分析物が存在するかどうかによらず、指標に結合した過剰の可溶性IgGは、コントロールストリップに結合した固定化抗グロブリンIgGと結合する。

30

【図2】図2はCSF検出への多抗原アプローチの利点を示す。上側の図は様々な試験条件での単抗原検定の結果を示し、下側の図は多抗原の結果を示す。X軸に沿ったバーは異なる検定条件を示し、Y軸に沿ったバーは検定によってわかる免疫反応の度合いを示す。上側の影つきの一帯は、側方流動検定のテストライン上の陽性比色反応を示す。影つきの一帯に入る免疫反応による検定により、陽性の試験結果が得られるであろう。バー1：上側のグラフのCSFバーは、陽性試験結果を呈示するのに十分な単抗原の免疫反応を示す。あるいは、複合抗原グラフ(下側)において、それぞれ部分的な信号を生じる抗原の組み合わせが累積し、単抗原の免疫反応を示す。バー2：血液に混入されたCSFは、より少ないが付加的な血液免疫反応によって同様の陽性反応を示す(上側のバーの太い線)。バー3：抗原1の免疫反応が不完全な異常なCSF/血液試料。単抗原検定において、検定は不正確な陰性を示すが、複数抗原検定は他の5つの抗原免疫反応が異常ではないことの結果として検定しきい値より上のままである。バー4：抗原1の免疫反応が無いCSF/血液試料。バー3と同様の結果である。バー5：CSFが無く血液のみを用いた交差反応抗原。この場合、単抗原検定は不正確な陽性を示すが、単抗原の免疫反応は陽性を示すには充分でない。複数抗原検定では正確な陰性の結果が示される。バー6：CSFが無く抗原1の血液レベルは異常に高い。単抗原検定は高い血液レベルのために不正確な陽性を示す。複数抗原検定は血液中の抗原1の異常に高いレベルと反応するが、不正確な陽性のしきい値には達しない。この検定は5抗原/抗体1/抗体2の混合を示すが、他の実施形

40

50

態では2から最大10の抗原/抗体1/抗体2の混合を含みうる。

【図3】CSFおよび血液タンパク質の二次元ゲル電気泳動。100 μgのCy標識CSFタンパク質(A)および100 μgのCy3標識CSFタンパク質(B)を二次元で分離する単一実験の例。AおよびBは、異なる励磁および放射設定を用いた同一のゲルのグレースケール画像である。pH範囲は4~8である。Cは有意な重複を示す黄色い斑を有する2つのチャンネルのRGBマージである。DはCSFまたは血液の5倍以上の拡大の斑の自動抽出である。全ての試料を主要な血清/CSFタンパク質の2倍枯渇させた(方法参照)。

【図4】図3のゲルに見られるCSF富化斑のいくつかの液体クロマトグラフィー質量分析解析。

10

【図5】CSF富化タンパク質FLJ55およびディックコップフ同族体3前駆体(DKK3)。A:FLJ55の免疫プロット。FLJ55の組換え体断片に対して生成される親和性精製多クローン性ウサギ抗ヒト抗体によって、血清試料中ではなくCSF試料中で正確な分子量において免疫反応が生じる。B:DKK3の組換え体断片に対して生成される親和性精製多クローン性ウサギ抗ヒト抗体によっても、血清試料中ではなくCSF試料中で正確な分子量において免疫反応が生じる。双方の場合において、過剰な血清タンパク質は血清より高いレベルであった。C:異なる親和性精製抗体でのDKK3に対する反応性を示すCSFの4つの異なる試料(左)。5つの血液試料で免疫反応の生成が失敗する。レーン5の血液は高い非特異的バックグラウンドを有する。

【図6】高度にCSF富化されたアンジオテンシノーゲンのリン酸化形態。Cy3血液(緑)およびCy5CSF(赤)のRGBマージ。血液中に存在しないいくつかの新しく重複していないリン酸化変型(右の4つの赤い斑)を識別した。CSFおよび血液に少なくとも3つの組み合わせ(左の3つの斑)が存在する。

20

【図7】CSF特異的翻訳後修飾。抽出タンパク質の第二修飾全ての除去の前(上側のパネル)および後(中間のパネル)のCSF二次元ゲルタンパク質分布パターンの変化。下側のパネルの赤い斑は、翻訳後修飾の除去に伴う特定のタンパク質シグナルの減少を示す。

【図8】CSF検出テストストリップ作成の実験フローチャート。

【図9】リン酸化されたCSFタンパク質。血清タンパク質枯渇CSFの2つの試料が単DIGEゲル上を移動された。A:アルカリホスファターゼ中で1時間インキュベートされたCSF試料からのCy3標識タンパク質。B:アルカリホスファターゼで処理していない血清タンパク質枯渇CSFの等価試料。C:2つのゲルの斑の嵩(A対B)のコンピュータ生成差異(青い境界)。全ての青い斑はCSFタンパク質を示す。

30

【発明を実施するための形態】

【0034】

他の体液に比してCSF富化されたタンパク質、および該タンパクの検出による質試料中の脳脊髄液(CSF)の存在または不在の検出のための方法をここで述べる。民族、年齢、性別、健康状態および遺伝的変異性にわたる幅広い母集団の混合体液の試料中の脳脊髄液の存在または不在の検出のための装置および方法もここで述べる。抗体、リガンド、レセプター等の特異的タンパク質結合パートナーによってCSF富化タンパク質を検出する。結合パートナーは天然または合成結合パートナーでありうる。

40

結合は直接または間接的に、例えば結合パートナーに結合された蛍光標識等によって検出される。抗体を結合パートナーとして用いるいくつかの実施形態が含まれるが、他の結合パートナーを抗体の代わりに用いることは理解されるべきである。

【0035】

特定の実施形態において、CSF富化タンパク質のレベルが定量される。このような定量は脳の傷害の識別に特に有用である。定量は結合パートナーによって検出可能標識を用いて行うことができる。"検出可能成分"または"標識"は、分光器、光化学作用、生化学、免疫化学または化学的手段によって検出可能な組成を指す。有用な標識には、³²P、³⁵S、蛍光染料、電子密試薬、酵素(例えばELISAで一般に用いられるもの)、バイオ

50

チン ストレプトアビジン、ジゴキシゲニン、ハプテン、および抗血清または単クローン抗体を用いることができるタンパク質が含まれる。検出可能成分はしばしば、試料中の結合した検出可能成分の定量に用いることができる放射性、色素、あるいは蛍光性の信号等の可測信号を生成する。検出可能成分は結合パートナーに、電子対の共有によって、またはイオン、ファンデルワールスあるいは水素結合を介して、組み込むかあるいは結合させることができる。検出可能成分は直接または間接的に検出可能でありうる。間接的検出は、第二の直接または間接的検出可能成分の検出可能成分への結合を含みうる。

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態において、CSF検出は、例えば目的のCSFに特異的な抗体を用いる側方流動検定によって行われる。側方流動検定は単抗原検定または複数抗原検定でありうる。実施形態の1つにおいて、複数抗原試験に、読むのが容易な単一の解答を生じる全ての抗原を用いる。別の実施形態において、複数抗原試験によって、存する抗原のより複雑な分布を複数の抗原のそれぞれに生ずる定性または定量がなされる。このような分布は頭部傷害の苛酷性の識別に有用でありうる。すなわち、特定のCSF特異性タンパク質が存する場合は頭部傷害は比較的苛酷でなく、他のCSF特異性タンパク質が存するかあるいは個々のタンパク質のレベルが傷害の度合いである場合は傷害はより苛酷である。

[単抗原検定]

【 0 0 3 7 】

側方流動技術は多くの臨床検定で成功裡に用いられているが、ここで述べる特異で革新的なアプローチは技術を拡張し、i) 単独または複数のCSF富化タンパク質を結合し試験への反応性および特異性を向上するとともに / あるいは、ii) CSF特異的翻訳後修飾（例えばリン酸化）を検出する。

【 0 0 3 8 】

ここで用いるように、CSF富化タンパク質またはCSF抗原あるいはポリペプチドは、CSFに特異的かあるいは他の体液に比してCSF中で豊富な抗原またはポリペプチドである。表1において、CSF中で濃度が高いことが知られる複数のタンパク質が識別される。これらは本出願中で識別されるタンパク質ではないが、いくつかの実施形態においてここで多抗原検定において識別される1つ以上のタンパク質と組み合わせることができる。

【 0 0 3 9 】

【 表 1 】

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

【 0 0 4 0 】

十分な量で存在するとともに他の体液のレベルに比してCSF中で有意に豊富であり、CSFの標識としてはたらくタンパク質について述べる。CSFの貯蔵された試料中に見られるタンパク質を、血液、鼻液、唾液、汗、涙および耳排出物（以下、「他の体液」と称する）の中のタンパク質と比較した。年齢の範囲（1～70年）および男女両方からのCSFを試験した。比較二次元ゲル電気泳動の前に、全ての液体を処理し主要な体液中に存在する優性血清タンパク質（すなわちアルブミン、IgG等）を除去した。残ったCSFからのタンパク質および別の体液を区別してCy3およびCy5で標識し、二次元PAGE上を移動させた。このアプローチを用いて、他の体液よりもCSF中で高濃度のタンパク質の新しい組み合わせが識別された。CSF富化二次修飾タンパク質（すなわちリン酸化）もまた識別された。CSF抽出物の脱リン酸化によって、CSF特異斑がリン酸化に基づき等電位次元において較差移行することが確認された。

10

【0041】

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

20

【0042】

側方流動免疫クロマトグラフィー検定は、サンドイッチ検定または競合検定として設計される。サンドイッチ検定は同じ分析物に反応する2つの異なる抗体を用い、テストラインにおいて一方が分析物を色づけしもう一方が分析物を濃縮する。テストラインは陽性試料において色づけされた帯を示す。競合検定によって、テストストリップ上の既に色づけされた分析物およびテストライン上の分析物に対する抗体の組が示される。試料は示される色づけされた分析物とともにテストラインへ流れ、抗体結合と競合する。テストラインは陰性試料中の色づけされた帯として示される。

30

[CSF検定設計仕様]

【0043】

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

40

【0044】

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

[多抗原CSF「組織」検定]

【0045】

実施形態の1つにおいて、検定は複数のCSF富化タンパク質の同時検出によってCS

50

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

10

【0046】

ここで述べるように、多数のCSF富化タンパク質斑を抽出しLC-MSによって解析する。このアプローチの原理は図2で説明される。複数のCSF富化抗原を識別し、少なくとも2つの異なる抗体を個々の抗原に供した。IgGの2つの組のそれぞれの混合物をテストストリップの可動および不動部分（図2参照）にそれぞれ加える。多抗原検定は、全ての抗体分子が結合した際のしきい値より下の、特定の抗原に対するある濃度の抗体の添加によってなされる。それぞれしきい値より下のレベルの複数の抗体の混合物を検定に用いる。CSFを加える際に、全ての抗体は結合し陽性信号の生成を集積する。最適な実施形態では、4つの検出しきい値を有する少なくとも5～6の異なる抗原を用い、単一の抗原の損失によって誤った陰性が生じないようにする。実施形態の1つにおいて、装置または試験は、それぞれ特異的に異なるCSF抗原と結合する4～10の異なる抗体からなり、陽性試験は全ての抗体との結合を必要としない。テストストリップ上でのIgG/抗原の集積は線形であるとともに、個々の抗体の検出しきい値より低いレベルが用いられ、他の陽性抗体の添加によってのみ陽性反応が生じる。少なくとも4つのIgG/抗原の集積を要する陽性反応において、検定はいずれか1つの抗原のレベルの変動にも関わらずより強壯である。検定はまた、汚染された体液中での単抗原免疫反応の異常な増加にも関わらずより強壯である。1～3の抗原による人工的免疫反応では陽性試験ができないであろうため、試験はより強壯であるとともに誤った陽性がより少なくなるであろう。

20

30

[CSF富化タンパク質の識別]

【0047】

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

40

【0048】

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

【0049】

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

50

【0050】

体積はリハイドレーションバッファーによって450 μ lに上げられる。イモビライン(商標)(IPG)ドライストリップ(GEヘルスケア)24cmを10~24時間再水和し、等電集束を行った。3~7、4~7、3.5~4.5、4.0~5.0、4.5~5.5、5.0~6.0、5.5~6.7および6~9を含む複数の異なるpH範囲を用いた。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(第二)を、幅10インチ、高さ7.5インチ、厚さ1.0mmのゲルの片側をゲルボンド(商標)で被覆して行った。最適に12~100kDのタンパク質を分離するであろう12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

【0051】

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

【0052】

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

【0053】

GEヘルスケア デサイダー(商標)ソフトウェアをゲル画像の定量、および切除されるとともにMSに基づくタンパク質識別の対象となる示されたタンパク質斑の識別に用いた。デサイダー ソフトウェアは、同一または別のゲル上のいずれか2つのCy染色ゲル画像を解析し、2つの画像の斑を結び付けるとともに、異なって示されたタンパク質斑を識別することができる。デサイダー(商標)ソフトウェアは、Cy 2内部標準を用いたt-試験値を含むタンパク質表出の統計的に有意な相違の一覧を自動的に出力する。異なって示される斑は、面積、体積、3Dピーク勾配、3Dピーク高さ、および/あるいは統計的变化を含む複数の基準を用いて識別された。2つの試料の間で異なる度合いの強度を示すタンパク質斑は、ソフトウェアによって強調されるとともに、手動で確認される。デサイダー ソフトウェアはまた、サイプロ ルビー画像の解析、サイプロ染色で見出された斑のCy染色で識別された斑との結び付け、およびサイプロ染色ゲル画像からの「ピククリスト」の選択に用いられた。

【0054】

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

【0055】

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

【0056】

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

【0057】

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

【0058】

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

[CSFテストストリップの抗原としてのCSF富化タンパク質リン酸化サイト]

【0059】

CSF富化タンパク質の識別のための蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(DIGE)実験中に、高度にCSF富化されたpH次元に分布する斑(すなわち血液試料中に存在しない)を識別したが、LCMSタンパク質識別において、これらのタンパク質の多くが実際に血液中に存在するがゲルのpH次元において異なるパターンを有することが確認された(図6)。一様に間隔を置かれた同じ分子量の斑はしばしば、同じタンパク質の異なるリン酸化変型を示す。pH次元中の異なる、および規則的な移動は、PO₃-集団の負電荷の大きくしかし非連続な性質を示す。これらの斑配列のホスホペプチドマッピング上で、これが実際にあったことが決定された。これらのタンパク質のいくつか(アンギオテンシノゲン(図6)を含む)は、高度にCSF富化されたリン酸化を有していた。いくつかの場合において、これらのリン酸化サイトはセリン/トレオニンのリン酸化であり、別の場合ではチロシンのリン酸化であった。全ての場合において、タンパク質はタンパク質毎の複数のリン酸化サイトで選択された(すなわちアンギオテンシノーゲン)。リン酸化されている場合のみ単エピトープを認識する抗体を生成可能なので、リン酸化サイトはここで述べる検定での抗原として含まれる。これらのリン酸化エピトープは非常に普及しているため候補として有力であり、単一タンパク質上の2つのCSF富化リン酸化サイトの存在によって、ストリップの可動および不動領域において差別的に用いることができ、陽性反応のために二重リン酸化を必要とする異なるサイトへの抗体の組を作ることが促進される。アルカリホスファターゼで脱リン酸化したCSFタンパク質と比してDIGEゲルを移動させた(図9)。これによってここで列挙したタンパク質がCSF中での差別的リン酸化として識別された。

【0060】

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

10

20

30

40

50

よびホスホペプチド測定によって識別する。

【0061】

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

10

【0062】

リン酸化状態特異的抗原の識別のために、2次元ゲルを前記のように生成し、しかし3つの標識されたタンパク質画分を生成し(C y 2、C y 3およびC y 5)、C S F、血液全体およびC S F タンパク質内で標識より前の追加の工程において全てのリン酸化タンパク質がアルカリホスファターゼによって除去する。それから脱リン酸化されたC S F チャンネルと通常のC S F チャンネルとの比較を改変のために行う。脱リン酸化の後で消えるとともに血液タンパク質蛍光チャンネルに存在しない斑を、収集し配列決定する。リン酸化のサイトの絶対的識別は、リン酸化ペプチドおよびリン酸化アミノ酸の解析、組み替えタンパク質およびタンパク質切片の生体外リン酸化、およびリン酸化特異的抗体との免疫反応によって決定される。

20

【0063】

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

【0064】

実施形態の1つにおいて、迅速、臨床、または傷病者の優先順位づけの体液、外科的サイトまたは傷の、脳脊髄液の存在のための試験の装置および方法が含まれる。別の実施形態において、試験は中枢神経系(C N S) 傷害、裂傷または損傷の表示としての血液、血漿または血清の試料中のC S F 富化タンパク質の検出を可能とすることを企図する。小児から老人の広い範囲の個人に、体液の組成を変化させうる疾患、個人的習慣または個人の遺伝的変異性の存在によらずに、C S F の検出に個別または組み合わせで用いることができる新たに識別されたC S F 特異的または富化抗原がここで述べられる。

30

【0065】

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

40

【0066】

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

【0067】

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

50

【 0 0 6 8 】

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

【 0 0 6 9 】

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

【 0 0 7 0 】

実施形態のいくつかにおいて、前記の C S F 抗原はリン酸化、グリコシル化、S U M O 化、ユビキチン化、脂質付加、ニトロシル化、アセチル化、N E D D 8 付加等の翻訳後修飾を有する。これらの翻訳後修飾は抗原の C S F 形態に特異的であり、側方流動検定、ウェスタンブロット、E L I S A または免疫沈降反応に用いる。

【 0 0 7 1 】

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

【 0 0 7 2 】

実施形態の 1 つにおいて、試料が C S F の存在または不在を示す C S F の存在と関連付けられたポリペプチドを含む場合、抗体を検出に用いる。抗体結合は、例えば放射免疫検定、E L I S A（酵素結合免疫吸着検定）、"サンドイッチ"免疫検定、免疫放射定量検定、表面プラズモン共鳴、免疫細胞化学、免疫組織化学、ゲル拡散沈降反応、免疫拡散検定、原位置免疫検定（例えばコロイド状金、酵素または放射性同位元素標識を用いる）、ウェスタンブロット、沈降反応、凝集検定（例えばゲル凝集検定、血球凝集検定等）、補体結合検定、免疫蛍光検定、A タンパク質検定、免疫電気泳動検定等によって検出される。抗体結合の検出は、酵素、比色、蛍光、生物発光、ルミネセンス、着色ラテックスビーズ、コロイド状金および/または銀の方法を用いて達成可能である。

【 0 0 7 3 】

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

【 0 0 7 4 】

実施形態のいくつかにおいて、自動検出検定が用いられる。免疫検定の自動化の方法には米国特許 5 8 8 5 5 3 0 号、4 9 8 1 7 8 5 号、6 1 5 9 7 5 0 号および 5 3 5 8 6 9 1 号に記載の方法が含まれ、これらは参照によって組み込まれる。実施形態のいくつかにおいて、結果の解析および提示もまた自動化される。例えば、実施形態のいくつかにおいて、免疫検定の結果に基づく試料中の特異的ポリペプチドの存在および C S F の確度に相関するスコアを生成するソフトウェアが用いられる。

【 0 0 7 5 】

別の実施形態において、免疫検定は米国特許 5 5 9 9 6 7 7 号および 5 6 7 2 4 8 0 号で述べられるようであり、これらは参照によって組み込まれる。

【 0 0 7 6 】

10

20

30

40

50

単離された抗体または抗体切片（例えばF a b切片、F a b 2切片等）が提供される。抗体を生成しC S Fの存在と関連付けられたポリペプチドを検出することができる。抗体はC S Fおよびその切片の存在と関連付けられた様々なポリペプチド、合成ペプチドおよび/または組み替えペプチドを用いて調製される。実施形態の1つにおいて、免疫原はC S Fおよびその切片の存在と関連付けられたポリペプチド、合成ペプチドおよび/または組み替えペプチドであり、C S Fの存在と関連付けられたポリペプチドを認識する抗体が生成される。実施形態の1つにおいて、抗体は天然または"折り畳まれた"タンパク質と反応する。別の実施形態において、抗体は変性タンパク質（界面活性剤による可溶化を含む）と反応する。このような抗体は、多クローン性、単クローン性、キメラ、単鎖、F a b切片、F a b発現ライブラリ、または組み替え（例えばキメラ、人間化等）抗体を、それがタンパク質を認識可能である限りは含むが、これらに限定されない。抗体は、従来の抗体または抗血清調製工程に基づき、タンパク質またはペプチドを抗原として用いて生成することができる。

10

【0077】

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

20

【0078】

C S Fの存在と関連付けられたポリペプチド、合成ペプチドおよび組み替えペプチドに対する単クローン性抗体の調製のために、培養での連続的細胞系による抗体分子の生成の技法が考えられる。これには当初ケーラーおよびミルスタインによって開発されたハイブリドーマ技法、トリオーマ技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法、およびE B Vハイブリドーマ技法によってヒト単クローン性抗体を生成することが含まれるが、これらに限定されるものではない。

30

【0079】

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

【0080】

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

40

【0081】

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

【0082】

抗体切片の生成に適した技法を、抗体分子のイディオタイプ（抗原結合領域）を含む抗体切片の生成に用いることが考えられる。例えば、このような切片には抗体分子のペプシン消化によって生成されるF（a b'）2切片、F（a b'）2切片のジスルフィド架橋の

50

還元によって生成される F a b' 切片、および抗体分子をパピインおよび還元剤で処理することで生成される F a b 切片が含まれるが、これらに限定されるものではない。

【 0 0 8 3 】

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

【 0 0 8 4 】

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

【 0 0 8 5 】

生物試料をそれから、適当な戦略（例えば E L I S A または放射免疫検定）およびフォーマット（例えばマイクロウェル、ディップスティック（例えば国際特許公報 W O 9 3 / 0 3 3 6 7 で開示されるもの））で、C S F の存在と関連付けられたポリペプチドの存在について直接試験することができる。あるいは、試料中のタンパク質を、ドデシル硫酸ナトリウム（S D S）、トライトン、ノニデット（あるいは他のイオン性または非イオン性界面活性剤）の存在下または非存在下、免疫ブロット（ウエスタンブロット）で検出される C S F 抗原の存在下で、サイズで分離（例えばポリアクリルアミドゲル電気泳動（P A G E））する。タンパク質のエピトープに対応するペプチドに対して生成される抗体を用いる免疫ブロット技法は概してより効果的であり、そのため本開示に特に適している。

【 0 0 8 6 】

前記の関連手順は定性的または定量的に、例えば蛍光体検定や比色検定において実行されうる。

[キットおよび装置]

【 0 0 8 7 】

試料が C S F の存在と関連付けられたポリペプチドを含むか否かの検出のためのキットおよび装置もまた提供される。診断キットおよび装置は様々なやり方で作成される。実施形態のいくつかにおいて、キットおよび装置は少なくとも 1 つの、C S F の存在と関連付けられたポリペプチドを特異的に検出する試薬を含む。特定の実施形態において、キット

10

20

30

40

50

および装置は C S F の存在と関連付けられたポリペプチドを特異的に検出する複数の試薬を含む。他の実施形態において、試薬は C S F の存在と関連付けられたポリペプチドと選択的に結合する抗体である。試験は、複数の抗原についての複数 (2 ~ 1 0) の試験 C S F の存在を示す結果を生成しうる。あるいは、個々の試験は C S F の存在または不在を示すと解釈できる異なる明白な結果を示しうる。

【 0 0 8 8 】

実施形態のいくつかにおいて、キットまたは装置は、試料が C S F の存在と関連付けられたポリペプチドを含むか否かの検出のための説明を含む。特定の実施形態において、該説明は、C S F の存在または不在は対象の試料中に C S F の存在と関連付けられたポリペプチドが存在するか否かの検出によって決定されることを特定する。

10

【 0 0 8 9 】

実施形態のいくつかにおいて、キットおよび装置は、緩衝剤、タンパク質安定剤等の補助的な試薬、およびシグナル生成システム (例えば F R E T システム等の蛍光生成システム) を含む。試験キットまたは装置は、適当な方式、典型的には必要により単一のコンテナまたは複数の様々なコンテナに、試験を行うための説明のシートとともにパッケージされる。実施形態のいくつかにおいて、キットまたは装置は陽性対照試料を含む。さらなる実施形態において、キットまたは装置は、強度、カラスペクトルまたは他の指標の物理的属性により C S F の存在と関連付けられたポリペプチドが存在するか否かを解釈するための比較試験材料を含む。

【 0 0 9 0 】

20

C S F 診断のための健康管理に用いることが可能な、迅速で再生可能かつ反応性が高く単純な診断試験の要求は大いに重要である。このような試験は、既存の実験室試験、すなわち免疫固定電気泳動、酵素免疫吸着検定 (E L I S A) および免疫プロットに対し、実験室に試料を送る場合は数日を要したのに対し即座に患者の傍で行い数分で結果を得られるという明白な利点を有する。側方流動免疫クロマトグラフィー試験を、生物液中の C S F 検出のための診断キットの作成に用いてもよい。

【 0 0 9 1 】

実施形態の 1 つにおいて、装置は、C S F 抗原との結合に適した可動指示体を含む第一相、および C S F 抗原との結合に適した固定指示体を含む第二相からなる固相を含む。

【 0 0 9 2 】

30

実施形態の 1 つにおいて、側方流動装置は、任意に樹脂テストカセットを伴うテストストリップを含む。抗体は、1つの膜の3つの異なる帯域に付着する。それは、C S F の存在と関連付けられたポリペプチドに対する第一の単クローン性抗体を含む試料帯 (S)、膜において固定化された C S F の存在と関連付けられたポリペプチドに対する第二の単クローン性または多クローン性抗体を含む試験帯 (T)、および例えば固定化ウサギ抗マウス抗体等の対照抗体を含む対照帯 (C) である。試料帯 (S) 中の第一の単クローン性抗体は例えば着色ラテックス粒子や金粒子等の可動粒子と共役する。あるいは、第一の単クローン性抗体は、蛍光分子やタグ (緑色蛍光タンパク質 (G F P) または F P オルソログ変異体および他の自然発生 G F P 類似蛍光有色タンパク質、フルオレセイン (およびオルソログ)、ローダミン (およびオルソログ)、C y 3、C y 5、C y 2、C y 7、C y 8、アレクサ (商標) 染料、テキサスレッド等) 等の発色指示体と共役する。

40

【 0 0 9 3 】

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

【 0 0 9 4 】

簡潔に、実施形態の 1 つにおいて、第一の単クローン性抗体は金またはラテックスビーズ等の可動粒子と共役する。これらのビーズは固有の色を有し、赤である (金について)

50

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

【0095】

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

【0096】

本発明は以下の限定しない例によって説明される。

[例]

【0097】

ここで新たに識別されたCSF特異性抗原は以下を含む。それは、神経細胞付着分子様タンパク質のアイソフォーム1(登録番号gi|62088238)、鎖A₁ウシ膵臓トリプシン阻害剤と複合したヒトメソトリプシン(Bpti)(登録番号gi|162330095)、CNTN2 コンタクチン-2(登録番号gi|4827022)、CNTN1 コンタクチン-1のアイソフォーム2(登録番号gi:28373119)、SPARC様タンパク質1に高度に類似のcDNA(登録番号gi|194388050)、NRCAMタンパク質(ニューロン細胞付着分子)[ホモ・サピエンス]あるいはわずかに長い切片(~96kDa)(登録番号gi|68534652およびgi|109731501)、NCAM2 神経細胞付着分子2(登録番号gi|119630409)、SERPINA3 セルピンペプチダーゼ阻害剤、クレードA₁アルファ-1-抗キモトリプシン/生育阻害タンパク質25のメンバー3前駆体/アイソフォーム1[ホモ・サピエンス]またはアルファ-1-抗キモトリプシン前駆体のわずかに長い切片(登録番号gi|46981961)、AGT アンジオテンシノーゲン(登録番号gi|553181)、アンジオテンシノーゲン前駆体(セルピンA8)(登録番号gi|4557287)、免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー4Bとも呼ばれる、ヒトにおいては細胞付着分子3とも呼ばれる無名タンパク質産物(登録番号gi|187608363)、cDNA FLJ59893、ディックコップ同族体3前駆体(登録番号gi|40548389)、SERPINF1 セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレードF(アルファ-1抗プラスミン、色素エピセリウム誘導因子)、メンバー1アイソフォーム4[チンパンジー]因子(登録番号gi|15988024)、GCビタミンD-結合タンパク質PREDICTED:ビタミンD-結合タンパク質[チンパンジー](登録番号181482)、CD14 ヒト単核細胞抗原CD14(CD14)(登録番号gi|117646212)、CADM3 ホモ・サピエンス細胞付着分子3(CADM3)、転写変異体1(登録番号gi|90080503)、クラステリンに高度に類似のCLU cDNA FLJ57622(登録番号gi|189054091)、クラステリンに高度に類似のタンパク質(登録番号gi|193787502)、LMAN2 小胞性統合膜タンパク質VIP36(登録番号gi|157834800)、超酸化物ジスムターゼ3、細胞外前駆体(登録番号gi|118582275)、フィブリン アルファCターム切片(登録番号gi|223057)、KLK6 カリクレイン-6のアイ

10

20

30

40

50

ソフォーム1 (登録番号 g i | 2 1 4 6 5 9 7 0)、A P C S 血清アミロイド P - 成分 / 鎖 A、五量体ヒト血清アミロイド P 成分の構造体 (登録番号 g i | 5 7 6 2 5 9)、F A M 3 C タンパク質 F A M 3 C / 配列類似 3 の族、メンバー C 前駆体 [ホモ・サピエンス]、記 = 予測される骨芽細胞タンパク質、インターロイキン様 E M T 誘導物質登録番号 g i | 5 5 6 2 9 2 7 2)、鎖 A、ヒトカリクレイン 6 (H k 6) 活性形態およびベンズアミジン阻害剤 (登録番号 g i | 2 1 4 6 5 9 7 0)、前記 C S F 抗原の C S F 富化リン酸化または脱リン酸化形態、あるいは前記 C S F 抗原のうち 2 つ以上の組み合わせである。

【 0 0 9 8 】

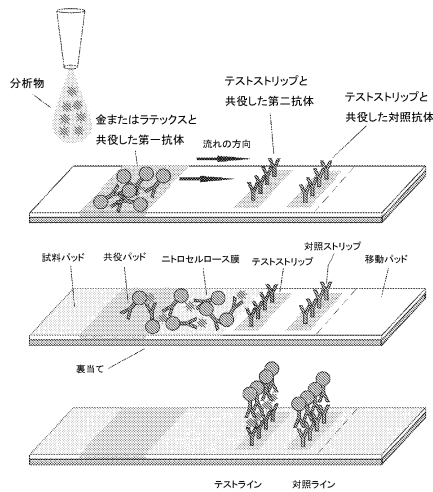
ここで開示される全ての範囲は包括的かつ組み合わせることができる。本発明は好ましい実施形態に関して述べられているが、本発明の範囲内において様々な変更がなされうるとともに要素を同等物と置換しうることは、当業者には理解されるであろう。さらに、特定の状況または材料を本発明の教示に適合するための多くの改良が、本発明の本質的な範囲内においてなされうる。よって、本発明は、本発明を実行するのに考えられる最良の形態として開示される特定の実施形態に限定されず、本発明は添付の請求項の範囲内の全ての実施形態を含むであろうことが意図されるものである。

【 0 0 9 9 】

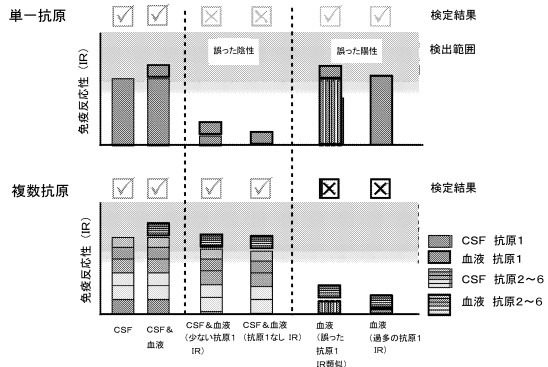
引用した特許、特許出願、他の文献の全ては、その全体を参照によってここに組み込む。

10

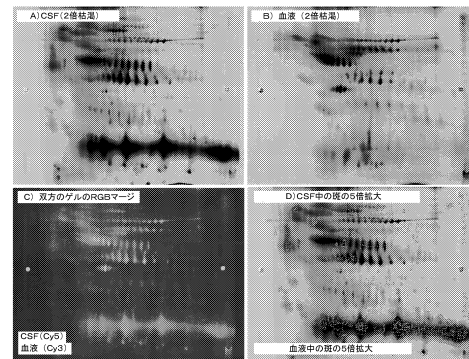
【 図 1 】



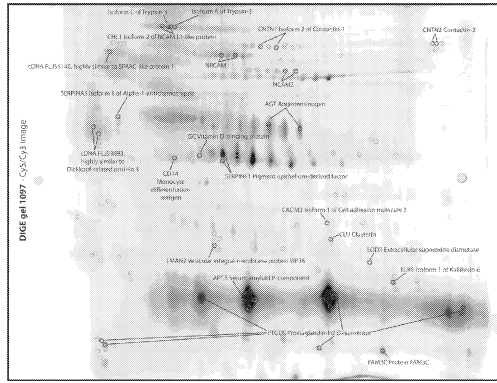
【 図 2 】



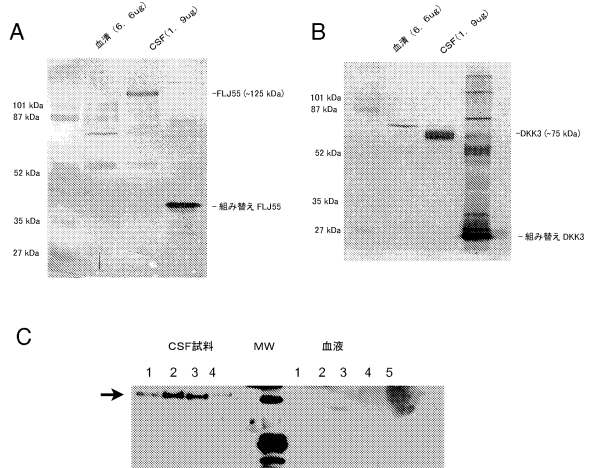
【 図 3 】



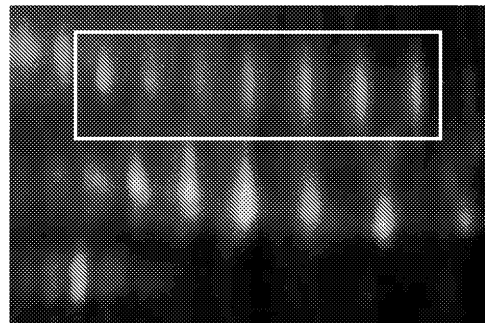
【 図 4 】



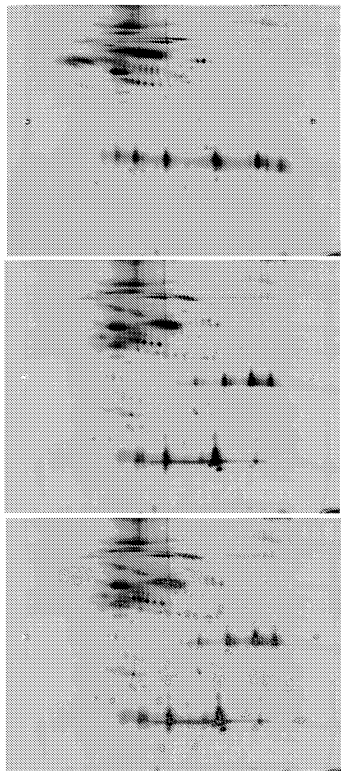
【 図 5 】



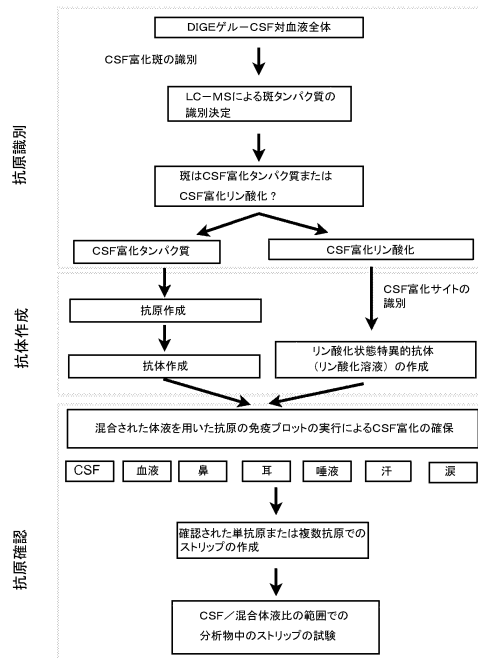
【 図 6 】



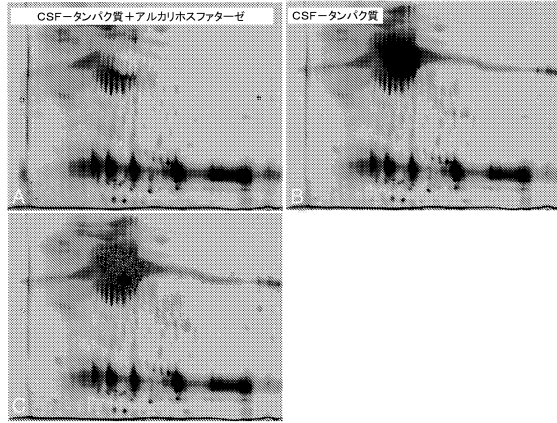
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 米国特許出願公開第2004/0203079(US, A1)
特表2003-528300(JP, A)
特表2005-522669(JP, A)
国際公開第2009/020058(WO, A1)
特表2009-500641(JP, A)
特表2008-537143(JP, A)
特表2010-502984(JP, A)
米国特許出願公開第2004/0002168(US, A1)
国際公開第01/063295(WO, A2)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
C12M 1/34
C12Q 1/02

专利名称(译)	用于免疫学鉴定脑脊髓液的装置和方法		
公开(公告)号	JP6127084B2	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	JP2015079120	申请日	2015-04-08
[标]申请(专利权)人(译)	AFFINIMARK TECH		
申请(专利权)人(译)	Afinimaku Technologies公司		
当前申请(专利权)人(译)	Afinimaku Technologies公司		
[标]发明人	ピエリボン・ヴィンセント		
发明人	ピエリボン・ヴィンセント		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12M1/34 C12Q1/02		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N33/53 G01N33/57488 G01N2410/02 G01N2800/28 G01N2800/2871		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/543.501.A C12M1/34.B C12Q1/02		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB20 4B029/CC01 4B029/FA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QR48 4B063/QS33		
优先权	61/232033 2009-08-07 US		
其他公开文献	JP2015132628A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种装置和方法，用于检测广泛种群，年龄，性别，健康状况和遗传变异性的混合流体样品中脑脊液的存在或不存在。一种用于检测样品中是否存在脑脊液的装置，该装置包括：样品添加区域，样品标记区域，其包含与迁移颗粒缀合的第一CSF富集蛋白质的第一抗体和第一抗CSF富集蛋白质的第二抗体，所述第二抗体由待固定在所述样品检测区域中的区域组成，所述第二抗体包含所述第二区域的可检测条带的区域。存在应指示样品中脑脊液的存在，并且第一个富含CSF的蛋白质是cDNA FLJ 59893，dickkopf同系物3前体 (SEQ ID NO : 13; 登录号gi | 40548389)) 一个旨在是。点域1

(19) 日本国特許庁 (JP)	(12) 特許公報 (B2)	(11) 特許番号 特許第6127084号 (P6127084)
(45) 発行日 平成29年5月10日 (2017.5.10)	(24) 登録日 平成29年4月14日 (2017.4.14)	
(51) Int. Cl.	F I	
G 0 1 N 3 3 / 5 3 (2 0 0 6 . 0 1)	G O 1 N 3 3 / 5 3 D	
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3 (2 0 0 6 . 0 1)	G O 1 N 3 3 / 5 4 3 5 0 1 A	
C 1 2 M 1 / 3 4 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 M 1 / 3 4 B	
C 1 2 Q 1 / 0 2 (2 0 0 6 . 0 1)	C 1 2 Q 1 / 0 2	
請求項の数 18 (全 25 頁)		
(21) 出願番号 特願2015-79120 (P2015-79120)	(73) 特許権者 512030360	
(22) 出願日 平成27年4月8日 (2015.4.8)	アフィニマーク テクノロジーズ、インコーポレイテッド	
(62) 分割の表示 特願2012-523974 (P2012-523974) の分割	アメリカ合衆国、コネチカット州 オゴ29、エリントン、ジャスティン ドライブ 10	
原出願日 平成22年8月6日 (2010.8.6)	(74) 代理人 100080621	
(65) 公開番号 特願2015-132628 (P2015-132628A)	弁理士 矢野 寿一郎	
(43) 公開日 平成27年7月23日 (2015.7.23)	ピエリボン、ヴィンセント	
審査請求日 平成27年4月8日 (2015.4.8)	アメリカ合衆国、コネチカット州 オゴ15-2735、ニューヘブン、オリバーロード 131	
(31) 優先権主張番号 61/232,033	(72) 発明者	
(32) 優先日 平成21年8月7日 (2009.8.7)	審査官 草川 貴史	
(33) 優先権主張国 米国 (US)		
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 脳脊髄液の免疫的識別のための装置および方法		