



(10) 授权公告号 CN 110720041 B

(45) 授权公告日 2024.04.26

(21) 申请号 201880036454.0

(22) 申请日 2018.05.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110720041 A

(43) 申请公布日 2020.01.21

(30) 优先权数据
62/512,688 2017.05.30 US
62/512,710 2017.05.30 US
62/528,214 2017.07.03 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/035231 2018.05.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/222783 EN 2018.12.06

(73) 专利权人 雅培实验室
地址 美国伊利诺伊州

(72) 发明人 B·麦奎斯顿 F·科利
A·贝希里 J·马力诺
S·德特维勒

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410
专利代理师 杨黎峰

(51) Int.Cl.
G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2010/148391 A2,2010.12.23
CN 102016552 A,2011.04.13
CN 102498403 A,2012.06.13
Giuseppe Lippi et al..The
concentration of highly-sensitive
troponin I is increased in patients with
brain injury after mild head trauma.
《International journal of cardiology》
.2013,
Stephen S. Cai et al..The Role of
Cardiac Troponin I in Prognostication of
Patients with Isolated Severe Traumatic
Brain Injury.《J Trauma Acute Care Surg.》
.2016,

审查员 赵晓明

权利要求书9页 说明书124页
序列表6页 附图34页

(54) 发明名称

用心肌肌钙蛋白I和早期生物标记物帮助诊断和评价人受试者中轻度创伤性脑损伤的方法

(57) 摘要

本文公开了通过以下帮助诊断和评价已遭受或可能已遭受头部损伤、诸如轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤 (TBI) 的人类受试者的方法:检测在所述受试者已遭受或可能已遭受所述头部损伤之后约24小时内的时间点取自人类受试者的生物样品中的心肌肌钙蛋白I (cTnI) 和不是cTnI的一种或多种早期生物标记物、诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合的水平。

1. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于评价人类受试者的头部损伤的试剂盒中的用途, 所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中, 对在实际或疑似头部损伤之后24小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂; 并且

进一步地, 其中, (1) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时, 确定所述受试者已遭受中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤 (TBI); 或 (2) 当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时, 确定所述受试者已遭受轻度TBI。

2. 根据权利要求1所述的用途, 其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

3. 根据权利要求2所述的用途, 其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分, 所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度TBI。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与患有中度、重度或中度至重度TBI的受试者相关联。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

6. 根据权利要求2所述的用途, 其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分, 所述受试者疑似患有轻度TBI。

7. 根据权利要求6所述的用途, 其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与患有轻度TBI的受试者相关联。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途, 其中所述cTnI的参考水平为5pg/mL、10pg/mL、15pg/mL、20pg/mL、35pg/mL或50pg/mL。

10. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途, 其中UCH-L1的参考水平为400pg/mL、500pg/mL或550pg/mL。

11. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途, 其中GFAP的参考水平为70pg/mL、100pg/mL或150pg/mL。

12. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途, 其中所述参考水平是: (a) 通过具有至少85%至100%之间的敏感性和至少30%至100%之间的特异性的测定法确定的; 或 (b) 在至少1pg/mL至1000pg/mL之间。

13. 根据权利要求12所述的用途, 其中所述参考水平是: (a) 通过具有至少87.5%的敏感性和至少31%的特异性的测定法确定的; 或 (b) 在至少1pg/mL至500pg/mL之间。

14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述参考水平在至少1pg/mL至100pg/mL之间。

15. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途, 其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤23小时内取得。

16. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤22小时内取得。

17. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤21小时内取得。

18. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤20小时内取得。

19. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤19小时内取得。

20. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤18小时内取得。

21. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤17小时内取得。

22. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤16小时内取得。

23. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤15小时内取得。

24. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤14小时内取得。

25. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤13小时内取得。

26. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤12小时内取得。

27. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤11小时内取得。

28. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤10小时内取得。

29. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤9小时内取得。

30. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤8小时内取得。

31. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤7小时内取得。

32. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤6小时内取得。

33. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤5小时内取得。

34. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤4小时内取得。

35. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头

部损伤3小时内取得。

36. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤2小时内取得。

37. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤1小时内取得。

38. 根据权利要求1至8中任一项所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤30分钟内取得。

39. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于确定是否对人类受试者进行头部计算机断层 (CT) 扫描的试剂盒中的用途,所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中,对在实际或疑似头部损伤之后24小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂;并且

进一步地,其中, (i) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行头部CT扫描;或 (ii) 当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行头部CT扫描。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤23小时内取自所述受试者。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤22小时取自所述受试者。

42. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤21小时取自所述受试者。

43. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤20小时取自所述受试者。

44. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤19小时取自所述受试者。

45. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤18小时取自所述受试者。

46. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤17小时取自所述受试者。

47. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤16小时取自所述受试者。

48. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤15小时取自所述受试者。

49. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤14小时取自所述受试者。

50. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤13小

时取自所述受试者。

51. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤12小时取自所述受试者。

52. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤11小时取自所述受试者。

53. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤10小时取自所述受试者。

54. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤9小时取自所述受试者。

55. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤8小时取自所述受试者。

56. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤7小时取自所述受试者。

57. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤6小时取自所述受试者。

58. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤5小时取自所述受试者。

59. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤4小时取自所述受试者。

60. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤3小时取自所述受试者。

61. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤2小时取自所述受试者。

62. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤1小时取自所述受试者。

63. 根据权利要求39所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤30分钟取自所述受试者。

64. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

65. 根据权利要求64所述的用途,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有TBI。

66. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

67. 根据权利要求66所述的用途,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

68. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中所述cTnI的参考水平为5pg/mL、10pg/mL、15pg/mL、20pg/mL、35pg/mL或50pg/mL。

69. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中UCH-L1的参考水平为400pg/mL、450pg/mL或550pg/mL。

70. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中GFAP的参考水平为50pg/mL、

100pg/mL或150pg/mL。

71. 根据权利要求39至63中任一项所述的用途,其中所述参考水平是:(a)通过具有至少65%至100%之间的敏感性和至少29%至100%之间的特异性的测定法确定的;或(b)在至少1pg/mL至1000pg/mL之间。

72. 根据权利要求71所述的用途,其中所述参考水平是:(a)通过具有至少85%的敏感性和至少33%的特异性的测定法确定的;或(b)在至少1pg/mL至500pg/mL之间。

73. 根据权利要求72所述的用途,其中所述参考水平在至少1pg/mL至100pg/mL之间。

74. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于评价人类受试者的轻度创伤性脑损伤 (TBI) 的试剂盒中的用途,所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中,对在实际或疑似头部损伤之后2小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂;并且

进一步地,其中,(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受中度、重度、或中度至重度TBI;或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受轻度TBI。

75. 根据权利要求74所述的用途,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

76. 根据权利要求75所述的用途,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度TBI。

77. 根据权利要求76所述的用途,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与患有中度、重度或中度至重度TBI的受试者相关联。

78. 根据权利要求77所述的用途,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

79. 根据权利要求75所述的用途,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度TBI。

80. 根据权利要求79所述的用途,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与患有轻度TBI的受试者相关联。

81. 根据权利要求80所述的用途,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

82. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于确定是否对人类受试者进行头部计算机断层 (CT) 扫描的试剂盒中的用途,所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中,对在实际或疑似头部损伤之后2小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂;并且

进一步地,其中,(i)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品

中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行头部CT扫描;或(ii)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行头部CT扫描。

83.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述实际头部损伤或疑似头部损伤23小时内取自所述受试者。

84.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤22小时内取自所述受试者。

85.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤21小时内取自所述受试者。

86.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤20小时内取自所述受试者。

87.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤19小时内取自所述受试者。

88.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤18小时内取自所述受试者。

89.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤17小时内取自所述受试者。

90.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤16小时内取自所述受试者。

91.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤15小时内取自所述受试者。

92.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤14小时内取自所述受试者。

93.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤13小时内取自所述受试者。

94.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤12小时内取自所述受试者。

95.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤11小时内取自所述受试者。

96.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤10小时内取自所述受试者。

97.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤9小时内取自所述受试者。

98.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤8小时内取自所述受试者。

99.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤7小时内取自所述受试者。

100.根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤6小

时内取自所述受试者。

101. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤5小时内取自所述受试者。

102. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤4小时内取自所述受试者。

103. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤3小时内取自所述受试者。

104. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤2小时内取自所述受试者。

105. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤1小时内取自所述受试者。

106. 根据权利要求82所述的用途,其中所述样品在所述头部损伤或疑似头部损伤30分钟内取自所述受试者。

107. 根据权利要求82至106中任一项所述的用途,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

108. 根据权利要求107所述的用途,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有TBI。

109. 根据权利要求82至106中任一项所述的用途,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的所述参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

110. 根据权利要求109所述的用途,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

111. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于评估是否应该用TBI治疗来治疗具有实际或疑似头部损伤的受试者的试剂盒中的用途,所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中,对在实际或疑似头部损伤之后24小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂;

进一步地,其中,(1) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤 (TBI);或(2) 当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受轻度TBI;并且

又进一步其中,用TBI治疗治疗确定为患有轻度、中度、重度、或中度至重度TBI的受试者。

112. 根据权利要求111所述的用途,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度TBI的受试者。

113. 至少一种心肌肌钙蛋白I (cTnI) 测定试剂和至少一种早期生物标记物测定试剂在制备用于评估是否应该用TBI治疗来治疗具有实际或疑似头部损伤的受试者的试剂盒中的用途,所述早期生物标记物测定试剂包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 测定试剂、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 测定试剂或其组合;

其中,对在实际或疑似头部损伤之后2小时内获自所述受试者的全血、血清、血浆或脑脊液样品使用所述cTnI测定试剂和早期生物标记物测定试剂;

进一步地,其中,(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受中度、重度、或中度至重度TBI,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,确定所述受试者已遭受轻度TBI;并且

又进一步其中,用TBI治疗治疗确定为患有轻度、中度、重度、或中度至重度TBI的受试者。

114. 根据权利要求113所述的用途,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度TBI的受试者。

115. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其进一步包括用至少一种心肌保护疗法治疗所述受试者。

116. 根据权利要求115所述的用途,其中所述至少一种心肌保护疗法包含 β 阻断剂、利尿剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、钙通道阻滞剂、脂质降低疗法、斯达汀、硝酸盐、抗血小板药、抗凝血剂、抗凝剂或其组合。

117. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中测量所述cTnI的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

118. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中测量所述cTnI的水平包括:

A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

(1) cTnI捕获抗体,其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物,和

(2) cTnI检测抗体,其包括可检测标记并结合cTnI上不被所述cTnI捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,

使得形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,以及

B. 基于通过所述cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中cTnI的量或浓度。

119. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中在所述受试者遭受由以下引起的头部损伤之后获得所述样品:身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤。

120. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中在所述受试者遭受一次或多次跌倒引起的头部损伤之后获得所述样品。

121. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中在所述受试者已摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

122. 根据权利要求121所述的用途,其中所述化学物质或毒素是霉菌、石棉、杀虫剂、有机溶剂、气体、有机金属和滥用药物中的一种或多种。

123. 根据权利要求121所述的用途,其中所述化学物质或毒素是杀昆虫剂、油漆和胶水中的一种或多种。

124. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中在所述受试者由于暴露于火导致遭受头部损伤之后获得所述样品。

125. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

126. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述用途对任何受试者进行,而不考虑选自以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度TBI的分类、所述受试者的低或高cTnI水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

127. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述样品是全血样品。

128. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述样品是血清样品。

129. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述样品是血浆样品。

130. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述测定是免疫测定法。

131. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述测定是临床化学测定法。

132. 根据权利要求1至8、39至63、74至106和111至114中任一项所述的用途,其中所述测定是单分子检测测定法。

用心肌肌钙蛋白I和早期生物标记物帮助诊断和评价人受试者中轻度创伤性脑损伤的方法

[0001] 相关申请信息

[0002] 本申请要求于2017年5月30日提交的美国申请号62/512,688、于2017年5月30日提交的美国申请号62/512,710和于2017年7月3日提交的美国申请号62/528,214的优先权,其各自内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开涉及通过以下帮助诊断和评价已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤,诸如轻度创伤性脑损伤(TBI)的方法:在实际头部损伤或疑似头部损伤之后的时间点取自人类受试者的生物样品中,检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)和一种或多种不是cTnI的早期生物标记物,诸如泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合的水平。

背景技术

[0004] 仅在美国,每年就有超过500万例轻度创伤性脑损伤(TBI)发生。目前,没有简单、客观、准确的测量法可用于帮助患者评估。事实上,许多的TBI评价和诊断均是基于主观数据。不幸的是,诸如头部CT和格拉斯哥昏迷评分(GCS)的客观测量法在评价轻度TBI时不够全面或敏感。此外,头部CT对于轻度TBI的绝大多数时间来说是未见的,是昂贵的,并且使患者暴露于不必要的辐射。另外,阴性头部CT并不意味着患者已排除脑震荡;相反,它仅意味着某些干预措施,诸如手术是不保险的。临床医生和患者需要客观可靠的信息来准确评价这种情况,以促进适当的分诊和康复。迄今为止,可用于在急性护理环境或超急性护理环境(损伤之后非常早期的急性时间点)中使用心肌肌钙蛋白I帮助患者评价和管理的数据有限。

[0005] 轻度TBI或脑震荡更难以客观地检测并且在全球的紧急护理病房中呈现日常挑战。脑震荡通常不会引起宏观病理,诸如出血,并且在大脑的常规计算机断层扫描中没有异常,而是快速发作的神经元功能障碍,其在几天到几周内以自发的方式消退。对于在现场、在急诊室和诊所中、在体育区中和在军事活动(例如战斗)中的轻度TBI受害者而言存在尚未满足的需求。

[0006] 当前用于评估脑损伤严重程度的算法包括格拉斯哥昏迷量表评分和其它测量。这些测量有时可能足以应付急性严重程度,但对可能造成持续性缺陷的细微病理学不够敏感。GCS和其它测量也无法区分损伤类型,并且可能还不够。因此,进入临床试验的分组成单一GCS水平的患者可能具有广泛不同的损伤的严重程度和类型。因为结果也相应地变化,所以不适当的分类会破坏临床试验的完整性。改善的损伤分类将能够在临床试验中针对TBI患者更准确地描述疾病严重程度和类型。

[0007] 此外,当前的脑损伤试验还依赖于诸如扩展格拉斯哥结局的结果测量,其可捕捉全局现象,但无法评估结果的细微差异。因此,连续30次针对脑损伤治疗剂的试验失败了。

需要敏感的结果测量来确定患者从脑损伤中恢复的状况,以便测试治疗方法和预防措施。

[0008] 创伤性脑损伤(TBI)患者死于心血管病因的可能性比一般人群高至少三倍。由TBI引起的心肌损伤也与神经源性肺水肿相关。神经病状中心肌损伤的现象已经在患有自发性蛛网膜下腔出血的患者中描述并且据信该现象由儿茶酚胺水平的爆发性激增引起。然而,对强调TBI中过量心血管死亡的机制的研究不足,并且因此尚未对其充分理解。因此,不清楚是否:心肌损伤的发作在TBI的急性或慢性期发生;存在特定亚型的TBI,这些亚型优先受心肌损伤的影响;以及TBI中心肌损伤的生物触发因素是什么。多种回顾性研究已经调查了在TBI急性期中的心肌损伤。使用常规的心肌肌钙蛋白测定,这些研究已经在损伤24小时内30%的重度TBI患者中报导了心肌损伤(如通过上升的肌钙蛋白所确定)。TBI中的心肌损伤与损伤严重程度和年龄有关。患有心肌损伤的TBI患者的住院死亡率风险高于未患心肌损伤的那些。然而,这些发现存在疾病谱偏倚,因为这些发现来源于回顾性研究,并且肌钙蛋白测量是由临床医生自行决定的(这些临床医生很少在TBI患者的常规护理中这样做)。此外,尚未研究TBI中的心肌损伤与神经结果之间的相关性。另外,尚未研究轻度和中度TBI中心肌损伤的作用。

发明内容

[0009] 本公开涉及一种帮助诊断和评价人类受试者中的轻度创伤性脑损伤的方法。该方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤;或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0010] 在上述方法的一些实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受轻度创伤性脑损伤。在上述方法的其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受中度创伤性脑损伤。在上述方法的又其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受重度创伤性脑损伤。在又其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受中度至重度创伤性脑损伤。

[0011] 在上述方法中的一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。在一些实施方式中,基于先前进行的格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况,可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行格拉斯哥昏迷量表评分以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度或中度、重度或中度至重度TBI的测定之前提供这种格拉斯哥昏迷量表评分。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的格拉斯哥昏迷量表评分,以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。在其它实施方式中,受试者可以在进行测定之前未接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0012] 在上述方法中的一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0013] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与轻度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与中度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法的其它实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与重度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与中度至重度创伤性脑损伤相关联(对应)。

[0014] 在一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有轻度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有中度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有重度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有中度至重度TBI。在其它方面,GFAP的参考水平或参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15(轻度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-8(重度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为9-13(中度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12(中度至重度TBI)相关联或相对应。

[0015] 在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约5pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约10pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约15pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约20pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约35pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约50pg/mL。

[0016] 在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约400pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约500pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约550pg/mL。

[0017] 在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约70pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约100pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约150pg/mL。

[0018] 在上述方法的一些实施方式中,参考水平是通过具有至少约85%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的。在上述方法的一些实施方式中,参考水平是通过具有至少约87.5%的敏感性和至少约31%的特异性的测定法确定的。在上述测定的一些实施方式中,参考水平在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间。在上述测定的一些实施方式中,参考水平在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间。在上述方法的一些实施方式中,参考水平在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0019] 在上述方法中的一些实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。具体而言,在上述方法的一些实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约1小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约2小时内取得。

在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约3小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约4小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约5小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约6小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约7小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约8小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约9小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约10小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约11小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约12小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约13小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约14小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约15小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约16小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约17小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约18小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约19小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约20小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约21小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约22小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约23小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约24小时内取得。

[0020] 在一些实施方式中,上述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之前监测被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之后监测被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0021] 在一些实施方式中,上述方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之前监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在其它实施方式中,上述方法包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之后监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。

[0022] 在另一实施方式中,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法。该方法包括:
a) 对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测样品中cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且b) 当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者进行CT扫描,并且当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者进行CT扫描。

[0023] 在上述方法中的一些实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约

9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。具体而言,在上述方法的一些实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约1小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约2小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约3小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约4小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约5小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约6小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约7小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约8小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约9小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约10小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约11小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约12小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约13小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约14小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约15小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约16小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约17小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约18小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约19小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约20小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约21小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约22小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约23小时内取得。在上述方法的其它实施方式中,样品在实际或疑似头部损伤约24小时内取得。

[0024] 在上述方法的一些实施方式中,对受试者进行CT扫描。在上述方法的其它实施方式中,不对受试者进行CT扫描。

[0025] 在上文所述方法的一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后已接受CT扫描,并且其中基于CT扫描结果,所述受试者疑似患有TBI。在一些实施方式中,基于已经进行的CT扫描,受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如,如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行CT扫描以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度或中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种CT扫描。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的CT扫描,以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。在其它实施方式中,受试者可以在进行测定之前未接受过CT扫描。

[0026] 在上述方法中的一些实施方式中,基于CT扫描,受试者疑似患有创伤性脑损伤。在一些实施方式中,基于CT扫描,受试者被诊断为患有创伤性脑损伤。在其它实施方式中,基于CT扫描,受试者被诊断为未患创伤性脑损伤。

[0027] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与阳性头

部计算机断层扫描相关联(对应)。

[0028] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与未遭受头部损伤的对照受试者相关联(对应)。

[0029] 在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约5pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约10pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约15pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约20pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约35pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,cTnI的参考水平为约50pg/mL。

[0030] 在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约400pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约500pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约550pgm/mL。

[0031] 在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约50pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约100pg/mL。在上述方法的一些实施方式中,GFAP的参考水平为约150pg/mL。

[0032] 在上述方法的实施方式中,参考水平是通过具有至少约65%至100%之间的敏感性和至少约29%至100%之间的特异性的测定法确定的。在上述方法的实施方式中,参考水平是通过具有至少约85%的敏感性和至少约33%的特异性的测定法确定的。在上述方法的实施方式中,参考水平是在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间测定的。在上述方法的实施方式中,参考水平在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间。在上述方法的实施方式中,参考水平在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0033] 在另一个实施方式中,本公开涉及一种帮助诊断和评价已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者的方法。该方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤;或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0034] 在上述方法的一些实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受轻度创伤性脑损伤。在上述方法的其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受中度创伤性脑损伤。在上述方法的又其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受重度创伤性脑损伤。在又其它实施方式中,受试者被诊断或确定为已遭受中度至重度创伤性脑损伤。

[0035] 在上述方法中的一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。在一些实施方式中,基于先前进行的格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况,可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行格拉斯哥昏迷量表评分以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度或中度、重度或中度至重度TBI的测定之前提供

这种格拉斯哥昏迷量表评分。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的格拉斯哥昏迷量表评分,以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。在其它实施方式中,受试者可以在进行测定之前未接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0036] 在上述方法中的一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0037] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与轻度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与中度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法的其它实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与重度创伤性脑损伤相关联(对应)。在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与中度至重度创伤性脑损伤相关联(对应)。

[0038] 在一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有轻度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有中度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有重度TBI。在其它方面,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有中度至重度TBI。在其它方面,GFAP的参考水平或参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15(轻度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-8(重度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为9-13(中度TBI)相关联或相对应。在其它方面,参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12(中度至重度TBI)相关联或相对应。

[0039] 在一些实施方式中,上述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之前监测被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之后监测被评估为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0040] 在一些实施方式中,上述方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,上述方法包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之前监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。在其它实施方式中,上述方法包括在用创伤性脑损伤治疗治疗之后监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。

[0041] 在又另一实施方式中,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法。该方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测样品中cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且b)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者进行CT扫描,并且当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者进行CT扫描。

[0042] 在上述方法的一些实施方式中,对受试者进行CT扫描。在上述方法的其它实施方式中,不对受试者进行CT扫描。

[0043] 在上文所述方法的一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后已接受CT扫描,并且其中基于CT扫描结果,所述受试者疑似患有TBI。在一些实施方式中,基于已经进行的CT扫描,受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如,如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行CT扫描以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度或中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种CT扫描。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的CT扫描,以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。在其它实施方式中,受试者可以在进行测定之前未接受过CT扫描。

[0044] 在上述方法中的一些实施方式中,基于CT扫描,受试者疑似患有创伤性脑损伤。在一些实施方式中,基于CT扫描,受试者被诊断为患有创伤性脑损伤。在其它实施方式中,基于CT扫描,受试者被诊断为未患创伤性脑损伤。

[0045] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联(对应)。

[0046] 在上述方法中的一些实施方式中,将cTnI和早期生物标记物的参考水平与未遭受头部损伤的对照受试者相关联(对应)。

[0047] 在另一个实施方式中,本公开涉及一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,该方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤;或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且(c)用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0048] 在上述方法的一些实施方式中,用于罹患轻度TBI的受试者的创伤性脑损伤治疗可以涉及使受试者休息一定时间段、避免体力活动一定时间段、施用一种或多种治疗剂(例如,提供头痛或偏头痛缓解的药物等)或其组合。在上述方法的其它实施方式中,用于罹患中度、重度、或中度至重度TBI的受试者的创伤性脑损伤治疗,该治疗涉及施用一种或多种治疗剂(例如,诸如利尿剂、抗癫痫药的药物)、进行一种或多种手术程序(例如,诸如移除血肿、修复颅骨骨折、减压颅骨切除术等)、接受或提供一种或多种疗法(诸如康复、物理疗法、职业疗法、认知行为疗法、愤怒控制等)或其任何组合。任选地,这类方法还可以涉及提供一种或多种心肌保护疗法。根据环境,这类心肌保护疗法可以与用于TBI的治疗组合施用,或者单独施用而无任何TBI治疗。

[0049] 在上述方法的实施方式中,该方法进一步包括监测评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0050] 在另一个实施方式中,本公开涉及一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,该方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获

自所述受试者的样品进行测定以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤;或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且(c)用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0051] 在上述方法的一些实施方式中,用于罹患轻度TBI的受试者的创伤性脑损伤治疗可以涉及使受试者休息一定时间段、避免体力活动一定时间段、施用一种或多种治疗剂(例如,提供头痛或偏头痛缓解的药物等)或其组合。在上述方法的其它实施方式中,用于罹患中度、重度、或中度至重度TBI的受试者的创伤性脑损伤治疗,该治疗涉及施用一种或多种治疗剂(例如,诸如利尿剂、抗癫痫药的药物)、进行一种或多种手术程序(例如,诸如移除血肿、修复头颅骨折、减压颅骨切除术等)、接受或提供一种或多种疗法(诸如康复、物理疗法、职业疗法、认知行为疗法、愤怒控制等)或其任何组合。任选地,这类方法还可以涉及提供一种或多种心肌保护疗法。根据环境,这类心肌保护疗法可以与用于TBI的治疗组合施用,或者单独施用而无任何TBI治疗。

[0052] 在上述方法的实施方式中,该方法进一步包括监测评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0053] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI的水平是通过免疫测定法确定的。

[0054] 在上述方法中的任一种的实施方式中,UCH-L1的水平是通过免疫测定法确定的。

[0055] 在上述方法中的任一种的实施方式中,GFAP的水平是通过免疫测定法确定的。

[0056] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和UCH-L1的水平是各自通过免疫测定法确定的。

[0057] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和GFAP的水平是各自通过免疫测定法确定的。

[0058] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI、GFAP和UCH-L1的水平是各自通过免疫测定法确定的。

[0059] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI的水平是通过临床化学测定法确定的。

[0060] 在上述方法中的任一种的实施方式中,UCH-L1的水平是通过临床化学测定法确定的。

[0061] 在上述方法中的任一种的实施方式中,GFAP的水平是通过临床化学测定法确定的。

[0062] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和UCH-L1的水平是各自通过临床化学测定法确定的。

[0063] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和GFAP的水平是各自通过临床化学测定法确定的。

[0064] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI、GFAP和UCH-L1的水平是各自通过临

床化学测定法确定的。

[0065] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI的水平是通过单分子检测测定法确定的。

[0066] 在上述方法中的任一种的实施方式中,UCH-L1的水平是通过单分子检测测定法确定的。

[0067] 在上述方法中的任一种的实施方式中,GFAP的水平是通过单分子检测测定法确定的。

[0068] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和UCH-L1的水平是各自通过单分子检测测定法确定的。

[0069] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI和GFAP的水平是各自通过单分子检测测定法确定的。

[0070] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI、GFAP和UCH-L1的水平是各自通过单分子检测测定法确定的。

[0071] 在上述方法中的任一种的实施方式中,样品是全血样品。

[0072] 在上述方法中的任一种的实施方式中,样品是血浆样品。

[0073] 在上述方法中的任一种的实施方式中,样品是血清样品。

[0074] 在上述方法中的任一种的实施方式中,cTnI的测量包括:

[0075] A.使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0076] (1)cTnI捕获抗体,其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物,和

[0077] (2)cTnI检测抗体,其包括可检测标记并结合cTnI上不被所述cTnI捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,

[0078] 使得形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,以及

[0079] B.基于通过所述cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中cTnI的量或浓度。

[0080] 在上述方法中的任一种的实施方式中,在受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。

[0081] 在上述方法中的任一种的实施方式中,在受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。例如,化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0082] 在上述方法中的任一种的实施方式中,样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0083] 在上述方法中的任一种的实施方式中,所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高cTnI水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

附图说明

- [0084] 图1示出了生物标记物UCH-L1结果与自损伤的时间的关系。
- [0085] 图2示出了按时间点的UCH-L1测定结果的箱形图。
- [0086] 图3示出了按时间点的hsTnI测定结果的箱形图。
- [0087] 图4示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的在时间点1 (在头部损伤后0至6小时内取得) 和时间点2 (在时间点1样品后3至6小时取得) 的hsTnI测定结果的箱形图。
- [0088] 图5示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的hsTnI结果的绝对量 (“绝对增量”) (即时间点2 (在时间点1样品之后3至6小时取得) 与时间点1 (在头部损伤之后0至6小时内取得) 之间的绝对差值) 的箱形图。
- [0089] 图6示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1 (在头部损伤后0至6小时内取得) 和时间点2 (在时间点1样品后3至6小时取得) 处的hsTnI测定结果的箱形图。
- [0090] 图7示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的绝对量 (“绝对增量”) hsTnI测定结果 (即时间点1 (即头部损伤后0至6小时内取得) 与时间点2 (在时间点1样品后3至6小时取得) 之间的绝对差) 的箱形图。
- [0091] 图8示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1 (在头部损伤之后0至12小时内取得) 处的UCH-L1测定结果的接受者操作特征 (ROC) 分析。
- [0092] 图9示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1 (在头部损伤之后超过12小时取得) 处的UCH-L1测定结果的ROC分析。
- [0093] 图10示出了与GCS评分结果 (轻度与中度/重度) 相关联的hsTnI水平和UCH-L1水平的组合的绝对量 (“绝对增量”) (即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差和时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差) 的ROC分析。在头部损伤0至12小时内取得时间点1处的样品, 而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。
- [0094] 图11示出了与GCS评分结果 (轻度与中度/重度) 相关联的hsTnI水平和UCH-L1水平的组合的绝对量 (“绝对增量”) (即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差和时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差) 的ROC分析。在头部损伤超过12小时取得时间点1处的样品, 而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。
- [0095] 图12示出了人类受试者的CT状态 (阳性或阴性扫描结果CT) 和hsTnI水平与相对于损伤的抽血时间的关系。
- [0096] 图13示出了人类受试者的GCS评分结果和hsTnI水平与相对于损伤的抽血时间的关系。
- [0097] 图14示出了人类受试者的CT状态 (阳性或阴性扫描结果CT) 和泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1) 水平与相对于损伤的抽血时间的关系。
- [0098] 图15示出了人类受试者的GCS评分结果和UCH-L1水平与相对于损伤的抽血时间的关系。
- [0099] 图16示出了人类受试者的CT状态 (阳性或阴性扫描结果CT) 和胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 水平与相对于损伤的抽血时间的关系。
- [0100] 图17示出了人类受试者的GCS评分结果和GFAP水平与相对于损伤的抽血时间的关

系。

[0101] 图18示出了在疑似损伤约2小时内取得的样品中与CT状态(阳性CT扫描与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI水平的接受者操作特征(ROC)分析。在头部损伤2小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。

[0102] 图19示出了在疑似损伤约2小时内取得的样品中与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的hsTnI水平的接受者操作特征(ROC)分析。在头部损伤2小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。

[0103] 图20示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的时间点1处的所有受试者的hsTnI测定结果的ROC曲线。

[0104] 图21示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1处的所有受试者的hsTnI测定结果的ROC曲线。

[0105] 图22示出了与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI结果的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差)的ROC分析。在头部损伤2小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。

[0106] 图23示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的hsTnI结果的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差)的ROC分析。在头部损伤2小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。

[0107] 图24示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的所有受试者的绝对量(“绝对增量”)hsTnI测定结果的ROC曲线。

[0108] 图25示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的所有受试者的绝对量(“绝对增量”)hsTnI测定结果的ROC曲线。

[0109] 图26示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的时间点1处的所有受试者的UCH-L1测定结果的ROC曲线。

[0110] 图27示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1处的所有受试者的UCH-L1测定结果的ROC曲线。

[0111] 图28示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI水平与UCH-L1水平的组合的ROC分析。

[0112] 图29示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平与UCH-L1水平的组合的ROC分析。

[0113] 图30示出了与阳性与阴性CT扫描结果相关联的时间点1处的所有受试者的GFAP测定结果的ROC曲线。

[0114] 图31示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1处的所有受试者的GFAP测定结果的ROC曲线。

[0115] 图32示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI水平与GFAP水平的组合的ROC分析。

[0116] 图33示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平与GFAP水平的组合的ROC分析。

[0117] 图34示出了按时间点的GFAP测定结果的箱形图。

具体实施方式

[0118] 本公开提供使用cTnI的水平和/或水平变化(例如通过进行测定以确定一个或多个生物样品中cTnI的水平并且然后将那些一个或多个水平与一个或多个参考水平比较)作为辅助评价、诊断和/或分层已遭受损伤或据信已遭受头部损伤的受试者是否已遭受轻度TBI、中度TBI、重度TBI、中度至重度TBI或未遭受任何TBI的新的改善方法。本文所述的方法可以快速进行-在头部损伤或疑似头部损伤之后少至2小时且至多约24小时进行。以此方式使用cTnI区分轻度、中度、重度、中度至重度或无TBI是先前未知的。这类方法不仅允许医师针对经鉴定或确定为已遭受TBI的那些患者,将患者快速确定和分类(或重新分类)或分诊为患有TBI或未患TBI,本文所述的方法还允许医师确定TBI的类型(轻度与中度、重度、或中度至重度)。快速确定是否将TBI分类为轻度、中度、重度或中度至重度的能力允许医师针对受试者开发出适当的治疗过程(例如治疗计划)。这种治疗方案可以包括是否(1)要求一种或多种额外测试以获得关于TBI的进一步临床信息(例如MRI等);(2)开始(继续)监测受试者;(3)开始用创伤性脑损伤治疗治疗受试者(并且如果开始治疗,开始何种类型的治疗(例如一种或多种治疗性治疗、保护气道、一种或多种手术治疗、要求休息等));(4)开始任何心肌保护治疗以保护受试者的心脏(诸如任选地通过施用一种或多种 β 阻断剂、利尿剂、血管紧张素转换抑制剂、钙通道阻滞剂、脂质降低疗法、斯达汀、硝酸盐、抗血小板疗法、抗凝血剂、抗凝剂或其组合、或本领域已知的其它心肌保护剂);或(5)进行(1)-(4)的组合。

[0119] 另外,本公开提供使用cTnI和UCH-L1和/或GFAP的水平或水平变化作为辅助确定是否应该对已遭受或据信已遭受TBI的受试者进行头部计算机断层扫描(CT)。本文所述的方法可以快速进行-在头部损伤或疑似头部损伤之后少至2小时且至多约24小时进行。使用cTnI和UCH-L1和/或GFAP作为辅助帮助医师确定是否对已遭受或据信已遭受TBI的受试者进行头部CT是先前未知的。

[0120] 另外,本公开提供治疗创伤性脑损伤的方法。具体而言,这些方法涉及使用如本文所述的cTnI和UCH-L1和/或GFAP的水平和/或水平变化(例如通过进行测定以确定一个或多个生物样品中cTnI和UCH-L1和/或GFAP的水平并且然后将那些一个或多个水平与一个或多个参考水平比较)评价、诊断和/或分层已遭受头部损伤或据信已遭受头部损伤的受试者是否已遭受轻度TBI、中度TBI、重度TBI、中度至重度TBI或未遭受TBI。一旦已经将受试者鉴定、确定、分类或分层为患有轻度TBI或中度、重度或中度至重度TBI,则可以根据TBI的类型(轻度与中度、重度或中度至重度),用适当的创伤性脑损伤治疗治疗受试者。例如,对于轻度TBI,创伤性脑损伤治疗可以涉及以下中的一种或多种:使受试者休息一定时间段、避免体力活动一定时间段、施用一种或多种治疗剂(例如,提供头痛或偏头痛缓解的药物等)或其组合。对于中度、重度、或中度至重度TBI,创伤性脑损伤治疗可以涉及施用一种或多种治疗剂(例如,诸如利尿剂、抗癫痫药的药物)、进行一种或多种手术程序(例如,诸如移除血肿、修复颅骨骨折、减压颅骨切除术等)、接受一种或多种疗法(诸如康复、物理疗法、职业疗法、认知行为疗法、愤怒控制等)或其组合。任选地,这类方法还可以涉及提供一种或多种心肌保护疗法。根据环境,这类心肌保护疗法可以与用于TBI的治疗组合施用,或者单独施用而无任何TBI治疗。

[0121] 为了进行上述方法,本领域技术人员(例如医师)将理解并且知晓如何进行额外测试以便检测或评估其它合并症(例如除TBI以外的其它疾病、病症、或病状)。此外,为了证实本文所述方法中cTnI量或水平的变化可归因于受试者的头部损伤或疑似头部损伤而非急性心脏综合征(诸如心肌梗塞、心力衰竭等)的结果,医师或其它保健提供者可以执行或进行一种或多种额外测试或程序以证实不存在急性心脏综合征。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0122] 如本章节和本文的整个公开中使用的章节标题仅用于组织目的并且不旨在是限制性的。

[0123] 1. 定义

[0124] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。当发生冲突时,以本文件(包括定义)为准。虽然在本公开的实践或测试中可以使用与本文所描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但以下描述了优选的方法和材料。本文提及的所有公开、专利申请、专利以及其它参考文献以引用的方式整体并入本文。本文公开的材料、方法和实施例仅是示例性的并且不旨在是限制性的。

[0125] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”以及其变化形式旨在不排除另外行为或结构的可能性的开放式连接词、术语或字词。除非上下文另外清楚地规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数引用。本公开还涵盖“包括本文所呈现的实施方式或要素”、“由本文所呈现的实施方式或要素组成”以及“主要由本文所呈现的实施方式或要素组成”的其它实施方式,无论是否明确地阐述。

[0126] 对于本文数值范围的叙述来说,明确地涵盖具有相同精确度的介于其间的每个中间数字。例如,对于范围6-9,除6和9之外还涵盖数字7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0127] “亲和力成熟抗体”在本文中用于指在一个或多个CDR中具有一个或多个变化的抗体,所述变化导致所述抗体与不具有所述变化的亲本抗体相比对于靶抗原的亲和力(即 K_D 、 k_d 或 k_a)提高。示例性亲和力成熟抗体将对于靶抗原具有纳摩尔浓度或甚至皮摩尔浓度的亲和力。用于产生亲和力成熟抗体的多种程序在本领域中是已知的,包括对使用生物展示制备的组合抗体文库的筛选。例如,Marks等人,BioTechnology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机诱变由以下描述:Barbas等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,91:3809-3813(1994);Schier等人,Gene,169:147-155(1995);Yelton等人,J.Immunol.,155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.,154(7):3310-3319(1995);和Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992)。在选择性诱变位置和/或在接触或超突变位置由活性增强氨基酸残基进行的选择性突变描述于美国专利号6,914,128B1。

[0128] 如本文所用的“一种抗体”和“多种抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体(完全或部分人源化的)、动物抗体诸如但不限于鸟(例如鸭或鹅)、鲨鱼、鲸鱼和哺乳动物(包括非灵长类动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠等)或非人灵长类动物(例如猴子、黑猩猩等))、重组抗体、嵌合抗体、单链

Fv (“scFv”)、单链抗体、单结构域抗体、Fab片段、F(ab’)片段、F(ab’)₂片段、二硫键连接的Fv (“sdFv”)和抗独特型 (“抗Id”)抗体、双结构域抗体、双可变结构域 (DVD) 或三可变结构域 (TVD) 抗体 (双可变结构域免疫球蛋白及其制备方法描述于Wu, C等人, *Nature Biotechnology*, 25 (11) : 1290-1297 (2007) 和PCT国际申请W0 2001/058956, 每个文献的内容通过引用并入本文)、以及任何上述抗体的功能活性的表位结合片段。具体地, 抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段, 即含有分析物结合位点的分子。免疫球蛋白分子可具有任何类型 (例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别 (例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2) 或亚类。为简单起见, 针对分析物的抗体在本文中通常称为“抗分析物抗体”或仅是“分析物抗体” (如抗心肌钙蛋白I和/或抗UCH-L1和/或抗GFAPUCH-L1抗体, 或心肌钙蛋白I和/或抗UCH-L1和/或抗GFAPUCH-L1抗体)。

[0129] 如本文所用的“抗体片段”是指包含抗原结合位点或可变区的完整抗体的一部分。所述部分不包括完整抗体Fc区的恒定重链结构域 (即CH2、CH3或CH4, 取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab’片段、Fab’-SH片段、F(ab’)₂片段、Fd片段、Fv片段、双抗体、单链Fv (scFv) 分子、仅含有一个轻链可变结构域的单链多肽、含有轻链可变结构域的三个CDR的单链多肽、仅含有一个重链可变区的单链多肽、以及含有重链可变区的三个CDR的单链多肽。

[0130] “曲线下面积”或“AUC”是指ROC曲线下的面积。ROC曲线下的AUC是精确度的度量。AUC为1表示完美测试, 而AUC为0.5表示无意义的测试。优选的AUC可以是至少大约0.700、至少大约0.750、至少大约0.800、至少大约0.850、至少大约0.900、至少大约0.910、至少大约0.920、至少大约0.930、至少大约0.940、至少大约0.950、至少大约0.960、至少大约0.970、至少大约0.980、至少大约0.990或至少大约0.995。

[0131] “珠粒”和“颗粒”在本文中可互换使用, 并且是指基本上球形的固体支持物。珠粒或颗粒的一个实例是微粒。可用于本文的微粒可以是本领域中已知的任何类型。例如, 珠粒或颗粒可以是磁珠或磁性颗粒。磁性珠粒/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁性的、超顺磁性的或铁磁流体的。示例性铁磁材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO以及NiO/Fe。亚铁磁材料的实例包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄ (或FeO’Fe₂O₃)。珠粒可以具有磁性的实心核心部分并且被一个或多个非磁性层包围。可选地, 磁性部分可以是围绕非磁性核心的层。微粒可具有在本文所述方法中起作用的任何尺寸, 例如约0.75至约5nm、或约1至约5nm、或约1至约3nm。

[0132] “结合蛋白”在本文中用于指与结合配偶体结合并与其形成复合物的单体或多聚体蛋白质, 例如像多肽、抗原、化学化合物或其它分子、或任何种类的底物。结合蛋白特异性结合结合配偶体。结合蛋白包括抗体, 以及其抗原结合片段和其本领域中已知的和下文所述的其它各种形式和衍生物, 以及包含一个或多个结合抗原分子或抗原分子上的特定位点 (表位) 的抗原结合结构域或其它分子。因此, 结合蛋白包括但不限于抗体、四聚体免疫球蛋白、IgG分子、IgG1分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、人源化抗体、亲和力成熟抗体、和任何此类抗体的保留结合抗原的能力的片段。

[0133] “双特异性抗体”在本文中用于指通过以下技术产生的全长抗体: 四源杂交瘤技术 (参见Milstein等人, *Nature*, 305 (5934) : 537-540 (1983)); 通过两个不同单克隆抗体的化学缀合 (参见Staerz等人, *Nature*, 314 (6012) : 628-631 (1985)); 或通过在Fc区中引入突变

的钮-入-孔法或类似方法(参见Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90(14):6444-6448(1993)),所述方法产生多种不同免疫球蛋白物质,其中仅一者是功能性双特异性抗体。双特异性抗体在其两个结合臂的一者(一对HC/LC)上结合一种抗原(或表位),且其第二臂(另一对HC/LC)上结合不同的抗原(或表位)。根据这个定义,双特异性抗体具有两个不同抗原结合臂(在特异性和CDR序列两方面),并且对于其结合的各抗原而言是单价的。

[0134] 如本文所用,术语“心肌肌钙蛋白I”,“cTnI”或“肌钙蛋白I”在本文中可互换使用,是指心肌肌钙蛋白的两种独特形式之一(另一种独特形式是心肌肌钙蛋白T(也称为“cTnT”)),其从心肌释放到血液中,在血液中可能存在几种。术语“心肌肌钙蛋白I”或“cTnI”不仅包括该形式的全长形式,还包括:(1)cTnI的各种复合物(即彼此和/或与心肌肌钙蛋白C(cTnC));(2)由蛋白水解降解产生的cTnI片段;(3)cTnI的磷酸化和氧化形式(参见例如美国专利号6,991,907,其内容通过引用并入本文);(4)cTnI的任何同种型。

[0135] 在一些实施方式中,本公开的方法允许检测和/或确定样品中作为单独实体的多种形式的cTnI中的一种或多种的浓度,例如复合的cTnI,游离的cTnI(例如全长,片段,同种型等),混浊的cTnI(例如氧化或磷酸化),并可选地提供生物样品中cTnI的浓度。

[0136] 更具体地,在一些实施方式中,本文所述的公开使用高敏感性测定法,其允许以比通过本领域中已知的传统肌钙蛋白测定法(例如免疫测定法)测定的水平低10-100倍的水平检测和定量cTnI。更具体地,如果这类测定满足至少以下两个条件,则测定被定义为高敏感性(例如肌钙蛋白的高敏感性测定)::1)在参考健康人群的第99个百分位数时,方差系数小于10%和2)在大于50%的健康个体中可以测量出高于检测限的浓度(请参阅Apple FS等人,Clin Chem.,58:54-61(2012),其内容通过引用并入本文)。允许肌钙蛋白的高敏感性检测的本领域已知的测定法的示例包括可从Quanterix(Simoa Human Troponin-I免疫测定法)获得的仅用于研究目的的测定法,以及美国专利号9,182,405中描述的那些测定法,其内容通过引用并入本文。

[0137] 如本文可互换使用的,“心肌肌钙蛋白I状态”或“cTnI状态”可以表示在某个时间点的心肌肌钙蛋白I的水平或量(例如用肌钙蛋白I的单一量度),监测相关的心肌肌钙蛋白I的水平或量(例如对受试者进行重复测试以确认心肌肌钙蛋白I量的增加或减少),与创伤性脑损伤(无论是原发性脑部损伤和/或继发性脑损伤)治疗相关的心肌肌钙蛋白I的水平或量,或其组合。

[0138] “CDR”在本文中用于指抗体可变结构序列内的“互补决定区”。在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDR。对于每个可变区,从重链或轻链的N末端开始,这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文所用的术语“CDR组”是指存在于单一可变区中的结合抗原的一组三个CDR。因此,抗原结合位点可以包括六个CDR,其包含来自重链和轻链可变区中的每一个的CDR组。包含单个CDR(例如CDR1、CDR2或CDR3)的多肽可以称为“分子识别单元”抗原-抗体复合物的晶体学分析已经证明CDR的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3。因此,分子识别单元可能主要负责抗原结合位点的特异性。总体上,CDR残基直接地并且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0139] 这些CDR的精确边界已根据不同系统加以不同界定。由Kabat(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987)和(1991))所述的系统不仅提供可适用于抗体的任何可变区

的明确残基编号系统,而且也提供界定三个CDR的精确残基边界。这些CDR可称为“Kabat CDR”。Chothia和同事(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987) 以及Chothia等人, *Nature* 342:877-883 (1989))发现尽管在氨基酸序列的层面上具有巨大多样性,但Kabat CDR内的某些子部分采用几乎相同的肽骨架构象。这些子部分被指定为“L1”、“L2”和“L3”或“H1”、“H2”和“H3”,其中“L”和“H”分别表示轻链区和重链区。这些区域可称为“Chothia CDR”,其具有与Kabat CDR重叠的边界。界定与Kabat CDR重叠的CDR的其它边界已由Padlan, *FASEB J.*, 9:133-139 (1995) 和MacCallum, *J. Mol. Biol.*, 262 (5):732-745 (1996) 描述。其它CDR边界定义可能不严格遵循本文中系统之一,但仍与Kabat CDR重叠,但鉴于特定残基或残基群组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的预测或实验发现而可将它们缩短或延长。本文所用的方法可利用根据这些系统中的任一个定义的CDR,但某些实施方式使用Kabat或Chothia定义的CDR。

[0140] “组分”,“多个组分”或“至少一种组分”通常指可以包括在用于根据本文所述的方法和本领域中已知的其它方法测定测试样品(诸如患者尿液、全血、血清或血浆样品)的试剂盒中的捕获抗体、检测物或缀合物、校准物、对照、敏感性组、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂/溶液、底物(例如,作为溶液)、终止液等。一些组分可以在溶液中被冻干以进行重构用于在测定中使用。

[0141] 如本文所用的“与…相关”是指与…相比。

[0142] 如本文所用的“CT扫描”是指计算机断层(CT)扫描。CT扫描组合了从不同角度拍摄的一系列X射线图像,并且使用计算机处理来创建您体内骨骼、血管和软组织的横截面图像或切片。CT扫描可以使用X射线CT、正电子发射断层扫描(PET)、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)、计算机轴向断层扫描(CAT扫描)或计算机辅助断层扫描。CT扫描可以是常规CT扫描或螺旋式/螺旋型CT扫描。在常规的CT扫描中,逐个切片地进行扫描,并且在每个切片之后扫描停止并向下移动到下一个切片,例如,从腹部的顶部向下移动到骨盆。常规的CT扫描要求患者屏住呼吸以避免运动伪影。螺旋式/螺旋型CT扫描是连续扫描,其以螺旋方式拍摄,并且是其中扫描图像是连续的更快过程。

[0143] 如本文所用的抗体的“衍生物”可以是指与真正或亲本抗体相比具有对其氨基酸序列的一个或多个修饰的抗体并且表现出修饰的结构域结构。衍生物仍然可以能够采用天然抗体中发现的典型结构域配置,以及能够特异性结合靶标(抗原)的氨基酸序列。抗体衍生物的典型实例是与其它多肽偶联的抗体、重排的抗体结构域、或抗体片段。衍生物还可以包含至少一种其它化合物,例如蛋白质结构域,所述蛋白质结构域通过共价或非共价键连接。根据本领域中已知的方法,连接可以基于遗传融合。存在于包含抗体的融合蛋白中的另外的结构域可优选地通过柔性接头、有利地是肽接头连接,其中所述肽接头包含多个亲水的肽键合的氨基酸,其长度足以跨越另外的蛋白质结构域的C末端与抗体的N末端之间的距离,反之亦然。抗体可以与效应分子连接,所述效应分子具有适于生物活性或选择性结合例如固体支持物、生物活性物质(例如细胞因子或生长激素)、化学试剂、肽、蛋白质或药物的构象。

[0144] “通过测定法确定的”在本文中用于指通过任何适当的测定法确定参考水平。在一些实施方式中,确定参考水平可以通过与待施用于来自受试者的样品的测定法相同类型的测定法来实现(例如通过免疫测定法、临床化学测定法、单分子检测测定法、蛋白质免疫沉

淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析法、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液相色谱-质谱法(LC/MS)。在一些实施方式中,确定参考水平可以通过与待施用于来自受试者的样品的测定法相同类型的测定法和在相同的测定条件下实现。如本文所指出的,本公开提供了示例性参考水平(例如通过比较不同时间点的参考水平计算)。基于本公开提供的描述针对其它测定法修改本文的公开以获得用于那些其它测定法的测定法特异性参考水平是完全在本领域普通技术人员的能力范围内的。例如,一组训练样品、包括从已知已遭受对头部的损伤的人类受试者获得的样品(且更具体地,从已知已遭受(i)轻度TBI;和/或(ii)中度、重度、或中度至重度TBI的人类受试者获得的样品和从已知未遭受对头部的损伤的人类受试者获得的样品可用于获得测定法特异性参考水平。应当理解,“通过测定法确定的”并具有所列举的“敏感性”和/或“特异性”水平的参数水平在本文中用于指这样的参考水平,所述参考水平已经被确定当在本发明的方法中采用时提供所列举的敏感性和/或特异性的方法。例如通过对使用多个不同的可能参考水平的测定数据的重复统计分析确定与本发明方法中给定参考水平相关的敏感性和特异性是完全在本领域普通技术人员的能力范围内的。

[0145] 实际上,当在区分受试者为患有创伤性脑损伤或未患有创伤性脑损伤、或受试者为轻度与中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤时,技术人员将平衡截止值对敏感性和特异性的影响。升高或降低截止值将对敏感性和特异性以及其它标准统计量产生明确且可预测的影响。众所周知,提高截止值将提高特异性,但可能会降低敏感性(测试为阳性的疾病患者的比例)。相比之下,降低截止值将提高敏感性,但会降低特异性(测试为阴性的无疾病患者的比例)。对于本领域技术人员而言,检测创伤性脑损伤或确定轻度与中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的后果将是显而易见的。在区分受试者是否患有外伤性脑损伤或轻度与中度、重度或中度至重度外伤性脑损伤时,截止值越高,特异性越高,真阴性越多(即受试者不具有外伤性脑损伤,没有轻度外伤性脑损伤,没有中度外伤性脑损伤,没有重度外伤性脑损伤,或没有中度、重度或中度至重度外伤性脑损伤,轻度脑外伤,中度脑外伤,重度脑外伤,或中度、重度或中度至重度脑外伤),这区别于患有脑外伤,轻度脑外伤,中度脑外伤,重度脑外伤,或中度、重度或中度至重度脑外伤的人。但是,与此同时,提高截止值会减少总体上鉴定为阳性的病例数,以及真阳性的数量,因此敏感性必然降低。相反,截止值越低,敏感性越高,真阳性越多(例如患有颅脑外伤,患有轻度颅脑外伤,患有中度颅脑外伤,患有重度颅脑外伤,或患有中度、重度、或中度至重度脑外伤),这区别于那些没有脑外伤,轻度脑外伤,中度脑外伤,重度脑外伤,或中度、重度或中度至重度脑外伤的人。但是,与此同时,降低截止值会增加总体上鉴定为阳性的病例数,以及假阳性的数量,因此特异性必然降低。

[0146] 通常,高敏感性值有助于技术人员排除疾病或状况(例如创伤性脑损伤,轻度创伤性脑损伤,中度创伤性脑损伤,重度创伤性脑损伤,或中度至重度创伤性脑损伤),并且高特异性值有助于技术人员纳入疾病或状况。技术人员是希望排除疾病或纳入治病取决于每种错误类型对患者的后果。因此,如果不完全公开有关如何选择该值的基础信息,就无法知道或预测用于得出测试截止值的精确平衡。敏感性与特异性及其它因素之间的平衡将视情况而定。这就是为什么有时最好提供替代的截止值(例如参考值),以便医师或从业者可以选择。

[0147] “滥用药物”在本文中用于指由于非医学原因(例如像娱乐和/或改变心智的效果)而摄取的一种或多种添加剂物质(诸如药物)。过度沉溺、使用或依赖此类滥用药物常常被称为“药物滥用”。滥用药物的实例包括酒精、巴比妥类药物、苯二氮卓类药物、大麻、可卡因、致幻剂(诸如氯胺酮、莫斯卡灵(皮约特(peyote))、PCP、裸盖菇素、DMT和/或LSD)、甲喹酮、阿片类药物、安非他明(包括甲基苯丙胺)、合成代谢类固醇、吸入剂(即含有具有作用于精神的特性的挥发性物质的物质,例如像亚硝酸盐、喷雾涂料、清洁液、标记物、胶水等)及其组合。

[0148] “双重特异性抗体”在本文中用于指可在其两个结合臂(一对HC/LC)的每一个中结合两种不同抗原(或表位)的全长抗体(参见PCT公开WO 02/02773)。因此,双重特异性结合蛋白具有两个具备相同特异性和相同CDR序列的相同抗原结合臂,且对于其结合的每种抗原而言是二价的。

[0149] “双可变结构域”在本文中用于指结合蛋白上的两个或更多个结合位点,所述结合蛋白可以为二价的(两个抗原结合位点)、四价的(四个抗原结合位点)或多价结合蛋白。DVD可以为单特异性的,即能够结合一种抗原(或一个特异性表位)、或多特异性的,即能够结合两种或更多种抗原(即相同抗原分子的两个或更多个表位或不同靶抗原的两个或更多个表位)优选的DVD结合蛋白包含两条重链DVD多肽和两条轻链DVD多肽并且被称为“DVD免疫球蛋白”或“DVD-Ig”。这样的DVD-Ig结合蛋白因此是四聚体的并且类似于IgG分子,但提供比IgG分子更多的抗原结合位点。因此,四聚体DVD-Ig分子的每一半都类似于IgG分子的一半,并且包含重链DVD多肽和轻链DVD多肽,但与IgG分子的提供单抗原结合结构域的一对重链和轻链不同,DVD-Ig的一对重链和轻链提供两个或更多个抗原结合位点。

[0150] DVD-Ig结合蛋白的每个抗原结合位点可以源自供体(“亲本”)单克隆抗体,因此包含具有每个抗原结合位点均参与抗原结合的总共六个CDR的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。因此,结合两个不同表位的DVD-Ig结合蛋白(即两个不同抗原分子的两个不同表位或相同抗原分子的两个不同表位)包含源自第一亲本单克隆抗体的抗原结合位点和第二亲本单克隆抗体的抗原结合位点。

[0151] 在PCT公开号WO 2007/024715、美国专利号7,612,181和Wu等人,Nature Biotech.,25:1290-1297(2007)中提供了对DVD-Ig结合分子的设计、表达和表征的描述。此类DVD-Ig分子的优选实例包含含有结构式VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的重链,其中VD1是第一重链可变结构域,VD2是第二重链可变结构域,C是重链恒定结构域,X1是接头(前提条件是它不是CH1,X2是Fc区),且n是0或1,但优选1;和含有VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的轻链,其中VD1是第一轻链可变结构域,VD2是第二轻链可变结构域,C是轻链恒定结构域,X1是接头(前提条件是它不是CH1,且X2不包含Fc区);且n是0或1,但优选1。这种DVD-Ig可以包含两条这样的重链和两条这样的轻链,其中每条链包含串联连接的可变结构域,而在可变区之间没有干预的恒定区,其中重链和轻链缔合形成串联功能性抗原结合位点,并且一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链缔合形成具有四个功能性抗原结合位点的四聚体结合蛋白。在另一个实例中,DVD-Ig分子可以包含这样的重链和轻链,每个所述重链和轻链包含串联连接的三个可变结构域(VD1、VD2、VD3),而在可变结构域之间没有干预的恒定区,其中一对重链和轻链可以缔合形成三个抗原结合位点,并且其中一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链缔合形成具有六个抗原结合位点的四聚体结合蛋白。

[0152] 在优选的实施方式中,DVD-Ig结合蛋白不仅结合由其亲本单克隆抗体结合的相同靶分子,而且还具有一种或多种其亲本单克隆抗体中的一者或多者的所需特性。优选地,这种另外的特性是亲本单克隆抗体中的一者或多者的抗体参数。可以从其亲本单克隆抗体中的一个或多个促成DVD-Ig结合蛋白的抗体参数包括但不限于抗原特异性、抗原亲和力、效力、生物学功能、表位识别、蛋白质稳定性、蛋白质溶解性、产生效率、免疫原性、药代动力学、生物利用度、组织交叉反应性和直系同源抗原结合。

[0153] DVD-Ig结合蛋白结合心肌肌钙蛋白I和/或UCH-L1和/或GFAP中的至少一个表位。DVD-Ig结合蛋白的非限制性实例包括结合心肌肌钙蛋白I和/或UCH-L1和/或GFAP中的一个或多个表位的DVD-Ig结合蛋白、结合人心肌肌钙蛋白I和/或UCH-L1和/或GFAP的表位和另一物种(例如小鼠)的心肌肌钙蛋白I和/或UCH-L1和/或GFAP的表位的DVD-Ig结合蛋白、和结合人心肌肌钙蛋白I和/或UCH-L1和/或GFAP的表位和另一靶分子的表位的DVD-Ig结合蛋白。

[0154] 如本文所用的“动态范围”是指测定读数与被分析样品中的靶分子或分析物的量成比例的范围。

[0155] “表位”或“多个表位”或“感兴趣表位”是指任何分子上被识别并且可以结合其特异性结合配偶体上的互补位点的位点。分子和特异性结合配偶体是特异性结合对的一部分。例如,表位可以是在多肽、蛋白质、半抗原、糖类抗原(诸如但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖)或多糖。其特异性结合配偶体可以是但不限于抗体。

[0156] 如本文所用的“片段抗原结合片段”或“Fab片段”是指抗体的片段,其结合抗原并且含有一个抗原结合位点、一条完整的轻链、和一条重链的一部分。Fab是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段。Fab由重链和轻链中的每一个的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。可变结构域含有互补位(抗原结合位点),其包含在单体的氨基末端的一组互补决定区。因此Y的每个臂结合抗原上的表位。Fab片段可以如本领域已经描述的那样产生,例如,使用酶木瓜蛋白酶,其可以用于将免疫球蛋白单体裂解成两个Fab片段和Fc片段,或者可以通过重组方法产生。

[0157] 如本文所用的“F(ab')₂片段”是指通过胃蛋白酶消化整个IgG抗体以除去大部分Fc区,同时保留一些铰链区而产生的抗体。F(ab')₂片段具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合F(ab)部分,因此是二价的,分子量为约110kDa。二价抗体片段(F(ab')₂片段)小于整个IgG分子并且能够更好地渗透到组织中,从而促进免疫组织化学中更好的抗原识别。F(ab')₂片段的使用还避免了对活细胞上的Fc受体或蛋白A/G的非特异性结合。F(ab')₂片段可以结合并沉淀抗原。

[0158] 如本文所用的“框架”(FR)或“框架序列”可以意指可变区减去CDR的剩余序列。因为CDR序列的精确界定可通过不同系统(例如参见上文)来确定,所以框架序列的含义易受相应不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3以及重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)也将轻链和重链上的框架区分成各链上的四个子区域(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1位于FR1与FR2之间,CDR2位于FR2与FR3之间,并且CDR3位于FR3与FR4之间。在不将特定子区指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,如其它所提及的框架区表示单一天然存在的免疫球蛋白链的可变区内的组合FR。如本文所用,FR表示四个子区域中的一个,并且FR表示构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。

[0159] 人重链和轻链FR序列在本领域是已知的,其可被用作重链和轻链“接受者”框架序列(或者简单的说是“接受者”序列)以通过使用本领域中已知的技术来人源化非人抗体。在一个实施方式中,人重链和轻链接受者序列选自在公众可获得的数据库诸如V-base (hypertext transfer protocol://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) 或国际ImMunoGeneTics® (IMGT®) 信息系统(hypertext transfer protocol://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/) 中列出的框架序列。

[0160] 如本文所用的“功能性抗原结合位点”可以意指结合蛋白(例如抗体)上能够结合靶抗原的位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力可以不如与抗原结合位点所源自的亲本结合蛋白,例如亲本抗体一样强,但结合抗原的能力必须是可使用已知用于评价蛋白质,例如抗体与抗原结合的多种方法中的任一者测量。此外,本文中的多价蛋白质,例如多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力无需在数量上相同。

[0161] “GFAP”在本文中用于描述神经胶质原纤维酸性蛋白。GFAP是由人中的GFAP基因编码的蛋白质,并且它可被生产(例如通过重组方式,在其它物种中)。

[0162] “GFAP状态”可以表示在某个时间点的GFAP水平或量(例如使用单一的GFAP度量),与监测相关的GFAP水平或量(例如通过对受试者的重复测试确定GFAP量的增加或减少),与创伤性脑损伤(无论是原发性脑损伤和/或继发性脑损伤)的治疗相关的GFAP的水平或量,或其组合。

[0163] 如本文所用的“格拉斯哥昏迷量表”或“GCS”是指用于基于总体社交能力或对其它的依赖来估计和分类脑损伤结果的15分量表。所述测试使用以下值测量运动反应、言语反应和睁眼反应:I、运动反应(6-完全服从命令;5-伤害性刺激时定位;4-从伤害性刺激缩回;3-异常屈曲,即去皮层状态;2-伸展反应,即去脑状态;和1-无反应);II、言语反应(5-警觉且定向;4-说话混乱,但连贯;3-字词不恰当且由字词组成的短语混乱;2-难以理解的声音;和1-没有声音;和III、睁眼(4-自发睁眼;3-说话时睁眼;2-疼痛时睁眼;1-不睁眼)。通过添加I+II+III的值来确定最终评分。最终评分可分为四个可能的生存水平,较低的数字指示更严重的损伤和更差的预后:轻度(13-15);中度失能(9-12)(意识丧失超过30分钟;可能或可能消退的身体或认知障碍;并从康复中获益);重度失能(3-8)(昏迷:无意识状态。没有有意义的反应,没有自愿活动);和植物状态(小于3)(睡醒周期;觉醒,但没有与环境的相互作用;对疼痛没有定位反应)。中度脑损伤定义为导致意识丧失20分钟至6小时且格拉斯哥昏迷量表为9至12分的脑损伤。重度脑损伤定义为导致意识丧失大于6小时且格拉斯哥昏迷量表为3至8的脑损伤。

[0164] 如本文所用,“格拉斯哥结局量表”是指用于功能性结局的全球量表,其将患者状态评定为以下五个类别之一:死亡、植物人状态、重度失能、中度失能或恢复良好。

[0165] 本文中可互换使用的“扩展的格拉斯哥结局量表”或“GOSE”通过将重度失能、中度失能和良好恢复的类别细分为表1中的低级类别和高级类别来提供更详细的八种分类。

[0166] 表1

	1	死亡	D	
	2	植物人状态	VX	无意识状况，只有本能反应，但有自发睁眼时期
	3	低级重度失能	SD -	依赖于对精神或身体失能、通常是两者组合的日常支持的患者。如果患者可以在家独处 8 个小时以上，则它是高水平的 SD，如果不能，则它是低水平的 SD。
	4	高级重度失能	SD +	
[0167]	5	低级中度失能	MD -	患者有一些失能，诸如失语症、偏瘫或癫痫和/或记忆或性格缺陷，但能够照顾自己。他们在家独立但在外面依赖。如果他们即使在特殊安排下就能恢复工作，则它是高水平的 MD，如果不是，则它是低水平的 MD。
	6	高级中度失能	MD +	
	7	低级良好恢复	GR -	即使尚未达到受伤前的状态，也可以恢复正常的工作能力。一些患者有轻微的神或心理缺陷。如果这些缺陷不是残疾，则它是高水平的 GR；如果是残疾，则它是低水平的 GR。
	8	高级良好恢复	GR +	

[0168] 术语“人源化抗体”在本文中用于描述包含来自非人物种（例如小鼠）的重链和轻链可变区序列但其中VH和/或VL序列中的至少一部分已变得更“类人”，即与人生殖系可变序列更相似的抗体。“人源化抗体”为抗体或其变体、衍生物、类似物或片段，其免疫特异性地结合感兴趣抗原且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的框架（FR）区和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区（CDR）。如本文所用，在CDR的背景下的术语“基本上”是指氨基酸序列与非人抗体CDR的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR。人源化抗体包含基本上全部的至少一个且通常两个可变结构域（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv），其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白（即供体抗体）的那些CDR区并且全部或基本上全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。在一个实施方式中，人源化抗体也包含免疫球蛋白恒定区（Fc）（通常人免疫球蛋白的恒定区）的至少一部分。在一些实施方式中，人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方式中，人源化抗体仅含有轻链和/或人源化重链的人源化可变结构域。

[0169] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别，包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE，以及任何同种型，包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列，并且可以使用本领域中熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能。

[0170] 人源化抗体的框架区和CDR无需精确对应于亲本序列，例如可以通过取代、插入或/或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体CDR或共有框架进行诱变以使该位点处的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而，在优选的实施方式中，此类突变将不是广泛的。通常，至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、且最优选至少95%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文所用，术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用，术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸（或核苷酸）形成的序列（参见例如Winnaker, From Genes to Clones

(Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987))。因此,“共有免疫球蛋白序列”可以包含“共有框架区”和/或“共有CDR”。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置由家族中最常出现在那个位置的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现,那么共有序列中可包括任一者。

[0171] 如本文所用的“超急性”是指十分急性或在头部损伤或怀疑损伤的约2小时的过程内。超急性处于早期阶段,例如,可以使用的超急性生物标记物是早期生物标记物,例如cTnI、泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、神经胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合,其可用于在损伤或疑似损伤的约2个小时的早期阶段内评估损伤或疑似损伤。

[0172] 如本文在两种或更多种多肽或多核苷酸序列的背景下所使用的“相同的”或“同一性”可意指序列在指定区域上具有指定百分比的相同残基。可通过以下来计算所述百分比:最佳地比对两个序列、在指定区域比较两个序列、确定在两个序列中相同的残基的位置的数量以产生匹配位置的数量、以匹配位置的数量除以在指定区域内的位置的总数量,并且将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。在两个序列具有不同长度或比对产生一个或多个交错末端并且比较的指定区域仅包含单个序列的情况下,单个序列的残基包括于计算的分母而不是分子中。

[0173] 如本文中可互换使用的“对头部的损伤”或“头部损伤”是指对头皮、颅骨或大脑的任何创伤。此类损伤可能包括颅骨上的仅轻微的撞击或可能是严重的脑损伤。此类损伤包括大脑的原发性损伤和/或大脑的继发性损伤。原发性脑损伤发生在最初的侵害期间,并且由大脑的物理结构的移位引起。更具体地,原发性脑损伤是在创伤事件期间发生的对实质(组织、血管)的物理伤害,导致对周围脑组织的剪切和压迫。继发性脑损伤发生在原发性损伤之后,并且可能涉及一系列细胞过程。更具体地,继发性脑损伤是指在原发性脑损伤后的一段时间(从数小时到数天)内发展出的变化。它包括促成进一步破坏脑组织的大脑中细胞、化学、组织或血管变化的整个级联。

[0174] 对头部的损伤可以是闭合性的或开放性的(穿透性的)。闭合性头部损伤是指其中颅骨没有被撞击物体穿透的头皮、颅骨或大脑的创伤。开放性头部损伤是指其中颅骨被撞击物体穿透的头皮、颅骨或大脑的创伤。头部的受伤可以由人的身体摇动、由导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械或其它力(例如,诸如汽车、飞机、火车等情况下的交通事故;诸如用棒球棒或来自枪械的头部猛击)产生的钝性冲击、脑血管意外(例如中风)、一次或多次跌倒(例如,如运动或其它活动)、爆炸或冲击波(统称为“冲击波伤”)以及由其它类型的钝力创伤引起的。可选地,对头部的损伤可能由摄入和/或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合引起。此类化学物质和/或毒素的实例包括火、霉菌、石棉、杀虫剂和杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体(诸如一氧化碳、硫化氢和氰化物)、有机金属(诸如甲基汞、四乙基铅和有有机锡)和/或一种或多种滥用药物。可选地,对头部的损伤可能是由于受试者罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水、缺氧或其任何组合引起的。在一些情况下,无法确定是否发生过任何此类事件或损伤。例如,患者或受试者可能没有病史,受试者可能无法说话,受试者可能意识到他们所暴露于的事件等。此类情况在本文中描述为受试者“可能已遭受头部的受伤”。在本文的某些实施方式中,闭合性头部损伤不包括并且特别地排除脑血管意外,诸如中风。

[0175] 如本文所用的“分离的多核苷酸”可以意指多核苷酸(例如基因组、cDNA或合成来源或其组合的多核苷酸),根据其来源,所述多核苷酸不与“分离的聚核苷酸”见于自然界中

所处的多核苷酸的全部或一部分缔合；可操作地连接至其在自然界中不连接的多核苷酸；或不作为较大序列的一部分存在于自然界中。

[0176] 如本文所用的“标记”和“可检测标记”是指附接至抗体或分析物，以使抗体与分析物之间的反应可检测的部分，并且如此标记的抗体或分析物被称为“可检测地标记的”。标记可以产生可通过视觉或仪器手段检测到的信号。各种标记包括产生信号的物质，诸如发色团、荧光化合物、化学发光化合物、放射性化合物等。标记的代表性实例包括产生光的部分，例如吡啶鎓化合物，和产生荧光的部分，例如荧光素。本文描述了其它标记。在这方面，所述部分本身可以是不可检测的，但在与另一部分反应时可以变得可检测。术语“可检测地标记的”的使用旨在涵盖这种标记。

[0177] 可使用如在本领域中已知的任何适合可检测标记。例如，可检测标记可为放射性标记（诸如^{3H}、^{14C}、^{32P}、^{33P}、^{35S}、^{90Y}、^{99Tc}、^{111In}、^{125I}、^{131I}、^{177Lu}、^{166Ho}和^{153Sm}）、酶标记（诸如辣根过氧化物酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖6-磷酸脱氢酶等）、化学发光标记（诸如吡啶酯、硫酯或磺酰胺；鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等）、荧光标记（诸如荧光素（例如5-荧光素、6-羧基荧光素、3'6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯-荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等）、若丹明、藻胆蛋白、R-藻红素、量子点（例如硫化锌封盖的硒化镉）、测温标记或免疫聚合酶链反应标记。标记、标记程序和标记检测的绪论见于Polak和Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 第2版, Springer Verlag, N.Y. (1997); 和Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996) (其是由Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon出版的组合手册和目录) 中。荧光标记可用于FPIA中（参见例如美国专利号5,593,896、5,573,904、5,496,925、5,359,093和5,352,803, 其通过引用整体并入本文）。吡啶化合物可在均质化学发光测定法中用作可检测标记（参见例如Adamczyk等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:1324-1328 (2006); Adamczyk等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:2313-2317 (2004); Adamczyk等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14:3917-3921 (2004); 和Adamczyk等人, *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003)）。

[0178] 在一个方面，吡啶化合物是吡啶-9-甲酰胺。用于制备吡啶9-甲酰胺的方法描述于Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6:107-114 (1991); Adamczyk等人, *J. Org. Chem.* 63:5636-5639 (1998); Adamczyk等人, *Tetrahedron* 55:10899-10914 (1999); Adamczyk等人, *Org. Lett.* 1:779-781 (1999); Adamczyk等人, *Bioconjugate Chem.* 11:714-724 (2000); Mattingly等人, *In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K.V. 编辑; CRC Press: Boca Raton, 第77-105页 (2002); Adamczyk等人, *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003); 和美国专利号5,468,646、5,543,524和5,783,699 (其各自通过引用整体并入本文用于其在关于该方面的教导)。

[0179] 吡啶化合物的另一个实例是吡啶-9-羧酸芳基酯。具有式II的吡啶-9-羧酸芳基酯的一实例是10-甲基-9-(苯氧基羰基)吡啶氟磺酸酯(可购自Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)。用于制备吡啶-9-羧酸芳基酯的方法描述于McCapra等人, *Photochem. Photobiol.* 4:1111-21 (1965); Razavi等人, *Luminescence* 15:245-249 (2000); Razavi等人, *Luminescence* 15:239-244 (2000); 和美国专利号5,241,070 (其各自通过引用整体并入本文用于其在关于该方面的教导) 中。此类吡啶-9-羧酸芳基酯是针对在由至少一种氧化酶氧化分析物中产生的过氧化氢在信号强度和/或信号迅速度方面均高效的化学发光指示剂。

吡啶-9-羧酸芳基酯的化学发光发射过程迅速完成,即在1秒内完成,而吡啶-9-甲酰胺化学发光发射延续到2秒。然而,吡啶-9-羧酸芳基酯在蛋白质存在下失去其化学发光特性。因此,其使用需要在信号生成和检测期间不存在蛋白质。用于分离或去除样品中蛋白质的方法是本领域技术人员熟知的,并且包括但不限于超滤、提取、沉淀、透析、色谱法和/或消化(参见例如Wells, *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation. Methods and Automation Strategies*, Elsevier (2003))。从测试样品中去除或分离的蛋白质的量可以是约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%或约95%。关于吡啶-9-羧酸芳基酯及其用途的更多细节阐述于2007年4月9日提交的美国专利号11/697,835中。吡啶-9-羧酸芳基酯可以溶解在任何合适的溶剂中,诸如脱气的无水N,N-二甲基甲酰胺(DMF)或含水胆酸钠。

[0180] “连接序列”或“连接肽序列”是指与一种或多种感兴趣多肽序列(例如全长、片段等)连接的天然或人工多肽序列。术语“连接的”是指连接序列与感兴趣多肽序列的接合。此类多肽序列优选地通过一个或多个肽键接合。连接序列可以具有约4至约50个氨基酸的长度。优选地,连接序列的长度为约6至约30个氨基酸。可以通过氨基酸取代、添加或缺失来修饰天然连接序列以产生人工连接序列。连接序列可用于许多目的,包括用于重组Fab中。示例性连接序列包括但不限于:(i) 组氨酸(His)标签,诸如6X His标签,其具有HHHHHH(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列,可用作连接序列以有利于分离和纯化感兴趣多肽和抗体;(ii) 肠激酶裂解位点,如His标签,用于分离和纯化感兴趣的蛋白质和抗体。常常,将肠激酶裂解位点与His标签一起用于分离和纯化感兴趣的蛋白质和抗体。各种肠激酶裂解位点在本领域中是已知的。肠激酶裂解位点的实例包括但不限于DDDDK(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列及其衍生物(例如ADDDK(SEQ ID NO:6)等);(iii) 杂项序列可用于链接或连接单链可变区片段的轻链和/或重链可变区。其它连接序列的实例可见于Bird等人, *Science* 242:423-426 (1988);Huston等人, *PNAS USA* 85:5879-5883 (1988);和McCafferty等人, *Nature* 348:552-554 (1990)中。还可以修饰连接序列以用于另外的功能,诸如药物的附接或附接于固体支持物。在本公开的上下文中,单克隆抗体例如可以含有连接序列,诸如His标签、肠激酶裂解位点或两者。

[0181] 在本文中可互换使用的“磁共振成像”或“MRI”是指在放射学中使用的医学成像技术,以形成人体在健康和疾病中的解剖结构和生理过程的图片。MRI是医学成像的一种形式,可测量人体组织的原子核在强磁场中时对高频无线电波的响应,并产生内部器官的图像。基于核磁共振(NMR)科学的MRI扫描仪使用强磁场、无线电波和场梯度来生成人体内部图像。

[0182] 如本文所用的“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成所述群体的个别抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。本文的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性。

[0183] 术语“多价结合蛋白”在本文中用于指包含两个或更多个抗原结合位点(在本文中也称为“抗原结合结构域”)的结合蛋白。多价结合蛋白优选地被工程化以具有三个或更多个抗原结合位点,并且通常不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”是指可以结合两个或更多个相关或不相关靶标的结合蛋白,包括能够结合相同靶分子的两个或更多个不同表位的结合蛋白。

[0184] 如本文中可互换使用的“阴性预测值”或“NPV”是指假定它们具有阴性测试结果时受试者具有阴性结局的概率。

[0185] 如本文所用的“参考水平”是指用于评估诊断、预后或治疗功效的测定截止值,在本文中已将其与各种临床参数(例如疾病的存在、疾病阶段、疾病严重性、疾病的进展、未进展或改善等)联系起来或相关联。如本文所用的“绝对量”是指在不同时间点取得或取样的至少两种测定结果之间的变化或差值的绝对值,并且与参考水平类似,已将其与各种临床参数(例如疾病的存在、疾病阶段、疾病严重性、疾病的进展、未进展或改善等)联系起来或相关联。如本文所用的“绝对值”是指实数(例如像两个比较水平(例如在第一时间点取得的水平与在第二时间点取得的水平))之间的差值的大小,而不考虑它的符号,即不管它是正的还是负的。

[0186] 本公开提供了示例性参考水平和绝对量(例如通过比较不同时间点的参考水平计算)。然而,众所周知,参考水平和绝对量可以根据免疫测定法的性质(例如使用的抗体、反应条件、样品纯度等)而变化,并且可以比较和标准化测定法。基于本公开提供的描述针对其它免疫测定法修改本文的公开以获得用于那些其它免疫测定法的免疫测定法特异性参考水平和绝对量进一步地是完全在本领域普通技术人员的能力范围内的。尽管参考水平和绝对量的精确值可以在测定法之间变化,但是本文所述的发现应是普遍适用的并且能够外推至其它测定法。

[0187] “定点照护装置”是指用于在定点照护处或附近(即在实验室外)、在患者护理的时间和地方(诸如在医院、医师办公室、紧急或其它医疗护理机构、患者家、养老院和/或长期护理和/或临终关怀设施中)提供医学诊断测试的装置。定点照护装置的实例包括由Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)生产的装置(例如i-STAT和i-STAT Alinity,普适的生物传感器(Rowville, Australia)(参见US 2006/0134713)、Axis-Shield PoC AS (Oslo, Norway)和临床实验室产品(Los Angeles, USA)。

[0188] 如本文中可互换使用的“阳性预测值”或“PPV”是指假定它们具有阳性测试结果时受试者具有阳性结局的概率。

[0189] 在本文所述的免疫测定法和试剂盒的背景下的“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照物和敏感性组。通常使用“校准物”或“标准物”(例如一种或多种,诸如复数种)来建立校正(标准)曲线以分析分析物(诸如抗体或分析物)的浓度。可选地,可以使用接近参考水平或对照水平(例如“低”、“中等”或“高”水平)的单一校准物。可联合使用多种校准物(即多于一种的校准物或不同量的校准物)以构成“敏感性组”。

[0190] “接受者操作特征”曲线或“ROC”曲线是指说明二元分类系统在其鉴别阈变化时的性能的图形绘图。例如,ROC曲线是对于诊断测试的不同可能截止点的真阳性率相比于假阳性率的绘图。它是通过在各种阈值设置下将阳性中的真阳性分数($TPR = \text{真阳性率}$)相对于阴性中的假阳性分数($FPR = \text{假阳性率}$)进行绘图产生的。 TPR 也称为敏感性,并且 FPR 是一减

去特异性或真阴性率。ROC曲线展示了敏感性与特异性之间的权衡(敏感性的任何增加都伴随着特异性的降低);曲线越紧密地沿着ROC空间的左边界,然后是顶部边界,测试越准确;曲线越靠近ROC空间的45度对角线,测试越不准确;截止点处的切线斜率给出该测试值的似然率(LR);并且曲线下面积是测试准确度的度量。

[0191] “重组抗体”和“多种重组抗体”是指通过一个或多个步骤制备的抗体,包括通过重组技术将编码一种或多种单克隆抗体的全部或部分的核酸序列克隆到适当的表达载体中,并随后在适当的宿主细胞中表达抗体。所述术语包括但不限于重组产生的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体(全部或部分人源化)、由抗体片段形成的多特性或多价结构、双功能抗体、异型缀合Ab、DVD-Ig®和本文(i)中描述的其它抗体。(双可变结构域免疫球蛋白及其制备方法描述于Wu,C等人,Nature Biotechnology,25:1290-1297(2007)中)。本文中使用的术语“双功能抗体”是指包括具有针对一个抗原位点的特异性的第一臂和具有针对不同抗原位点的特异性的第二臂的抗体,即双功能抗体具有双重特异性。

[0192] 如本文所用的对受试者(例如患者)的“风险评估”、“风险分类”、“风险鉴定”或“风险分层”是指评价包括生物标记物的因素,以预测包括疾病发作或疾病进展的未来事件发生的风险,以便可以在更加知情的基础上做出关于受试者的治疗决策。

[0193] “样品”、“测试样品”、“样本”、“生物样品”、“来自受试者的样品”和“患者样品”可以在本文中交换使用并且可以是血液样品(诸如全血)、组织、尿、血清、血浆、羊水、脑脊髓液、胎盘细胞或组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞。样品可以如从患者获得地直接使用,或者可预处理,诸如通过过滤、稀释、提取、浓缩、离心、对干扰组分进行灭活、添加试剂等,从而以本文中讨论的或其它本领域已知的一些方式来修饰样品的特征。

[0194] 可以利用多种细胞类型、组织或体液来获得样品。此类细胞类型、组织和流体可以包括组织切片,诸如活检和尸检样品、取得用于组织学目的的冷冻切片、血液(例如全血)、血浆、血清、红细胞、血小板、间质液、脑脊髓液等。细胞类型和组织还可以包括淋巴液、脑脊髓液、由组织或细胞类型收集的流体可以通过从人类和非人动物中除去细胞样品来提供,但也可以通过使用先前分离的细胞(例如通过其它人分离的、在其它时间、和/或用于其它目的)来完成。也可以使用归档组织,例如具有治疗或结局史的那些。可能不需要蛋白质或核苷酸分离和/或纯化。

[0195] 如本文所用的测定法的“敏感性”是指结局为阳性的受试者中被正确鉴定为阳性(例如正确鉴定那些患有他们正被测试的疾病或医学病状的受试者)的比例。例如,这可能包括从没有TBI的受试者中正确识别出患有TBI的那些,从患有轻度TBI的受试者中正确识别出患有中度、重度、或中度至重度TBI的那些、从患有中度、重度、或中度至重度TBI的受试者中正确识别出患有轻度TBI的那些、从没有TBI的受试者中正确识别出患有中度、重度、或中度至重度TBI的那些,或从没有TBI的受试者中正确识别出患有轻度TBI的那些,从不太可能受益于头部成像或CT扫描或MRI的受试者中正确识别出可能受益于影像或头部CT扫描或MRI的那些)。

[0196] 如本文所用的测定法的“特异性”是指结局为阴性的受试者中被正确鉴定为阴性(例如正确鉴定那些未患有他们正被测试的疾病或医学病状的受试者)的比例。例如,这可能包括从没有TBI的受试者中正确识别出患有TBI的那些,从患有轻度TBI的受试者中正确识别出没有中度、重度、或中度至重度TBI的那些、从患有中度、重度、或中度至重度TBI的受

试者中正确识别出没有轻度TBI的那些、或正确识别出没有任何TBI的受试者,或从没有TBI的受试者中正确识别出患有轻度TBI的那些)。

[0197] “校准组合物系列”是指包含已知浓度的分析物的多种组合物,例如cTnI或早期生物标记物,如UCH-L1、GFAP、或其组合,其中每种组合物与前述系列中的其它组合物的不同之处在于分析物的浓度。

[0198] 如本文中可互换使用的“固相”或“固体支持物”是指可用于附接和/或吸引且固定化(1)一种或多种捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)一种或多种检测剂或检测特异性结合配偶体的任何材料。固相可以就其吸引和固定化捕获剂的固有能力进行选择。可选地,固相可以具有在其上粘附的连接剂,所述连接剂具有吸引和固定化(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体。例如,连接剂可包括带电物质,其相对于捕获剂(例如捕获特异性结合配偶体)或检测剂(例如检测特异性结合配偶体)本身或相对于与(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体缀合的带电物质是带相反电荷的。通常,连接剂可以是任何结合配偶体(优选是异性的),其固定化在(附接至)固相上并且具有通过结合反应来固定化(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体的能力。连接剂使得捕获剂在性能测定之前或性能测定期间间接地与固相材料结合。例如,固相可以是塑料、衍生塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅,包括例如试管、微量滴定孔、薄片、珠粒、微粒、芯片和本领域普通技术人员已知的其它构造。

[0199] 如本文所用的“特异性结合”或“特异性地结合”可以是指抗体、蛋白质或者肽与第二化学物质的相互作用,其中相互作用依赖于化学物质上具体结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是广泛结合蛋白质。如果抗体对表位“A”是特异性的,则在含被标记的“A”和抗体的反应中,含表位A的分子(或者游离的未标记A)的存在将会降低与抗体结合的被标记的A的量。

[0200] “特异性结合配偶体”是特异性结合对的成员。特异性结合对包含两个不同分子,其通过化学或物理方式彼此特异性结合。因此,除常见免疫测定法的抗原与抗体特异性结合对之外,其它特异性结合对可包括生物素与抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白);碳水化合物与凝集素;互补核苷酸序列;效应分子与受体分子;辅因子与酶;酶与酶抑制剂等。此外,特异性结合对可包括是原始特异性结合成员的类似物的成员,例如分析物-类似物。免疫反应性特异性结合成员包括分离的或重组产生的抗原、抗原片段和抗体,包括单克隆和多克隆抗体及其复合物和片段。

[0201] 如本文所用的“统计学上显著的”是指两个或更多个变量之间的关系由除随机机会之外的其它因素引起的可能性。将统计假设检验用于确定数据集的结果是否具有统计学上的显著性。在统计假设检验中,只要观察到的检验统计量的p值小于研究定义的显著性水平,就获得了统计学显著性结果。p值是假定零假设是真时获得至少与观察到的结果一样极端的结果的概率。统计假设分析的实例包括Wilcoxon符号秩次检验、t检验、卡方或费舍尔精确检验。如本文所用的“显著性的”是指尚未确定为具有统计学显著性的变化(例如其可能未经历统计假设检验)。

[0202] 如本文使用的“受试者”和“患者”可互换地用于指任何脊椎动物,包括但不限于哺乳动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠、非人

灵长类动物(例如猴子,诸如食蟹猴或恒河猴、黑猩猩等)和人类)。在一些实施方式中,受试者可以为人类或非人类。在一个实施方式中,受试者为人类。受试者或患者可以经历其它形式的治疗。在一些实施方式中,当受试者是人时,受试者不包括遭受脑血管意外(例如中风)的任何人。

[0203] “治疗(Treat/treating/treatment)”各自在本文中可互换用于描述逆转、减轻或抑制这种术语所适用的疾病和/或损伤的进展,或这种疾病的一种或多种症状。根据受试者的病状,所述术语还是指预防疾病,并且包括预防疾病的发作或预防与疾病相关的症状。治疗可以以急性或慢性方式进行。所述术语还是指在受疾病折磨之前降低与这种疾病相关的疾病或症状的严重性。在折磨之前的这种预防疾病或降低疾病严重性是指不在受疾病折磨的施用时间将药物组合物施用至受试者。“预防”还是指预防疾病或与这种疾病相关的一种或多种症状的复发。“治疗”和“治疗性地”是指治疗的行为,正如“治疗”如上所定义的。

[0204] 如本文可互换使用的“创伤性脑损伤”或“TBI”是指具有广谱症状和失能的复杂损伤。TBI很多时候是类似于其它损伤的急性事件。TBI可分为“轻度”、“中度”或“重度”。TBI的原因是多种多样的,并且包括例如人的身体摇动、车祸、枪械损伤、脑血管意外(例如中风)、跌倒、爆炸或冲击波以及其它类型的钝力创伤。TBI的其它原因包括摄入和/或暴露于一种或多种化学品或毒素(诸如火、霉菌、石棉、杀虫剂和杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体(诸如一氧化碳、硫化氢和氰化物)、有机金属(诸如甲基汞、四乙基铅和有机锡)、一种或多种滥用药物或其组合)。可选地,TBI可能在罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水、缺氧或其任何组合的受试者中发生。青年人和老年人是TBI风险最高的年龄组。在本文的某些实施方式中,创伤性脑损伤或TBI不包括并且特别地排除脑血管意外,诸如中风。

[0205] 如本文所用的“轻度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失是短暂的并且通常是几秒或几分钟并且/或者混乱和定向障碍短于1小时。轻度TBI也被称为脑震荡、轻微头部创伤、轻微TBI、轻微脑损伤和轻微头部损伤。虽然MRI和CT扫描常常是正常的,但患有轻度TBI的个体可能具有认知问题,诸如头痛、思维困难、记忆问题、注意力缺陷、情绪波动和沮丧。

[0206] 轻度TBI是最普遍的TBI,并且在初始损伤时常常被遗漏。通常,受试者具有在13-15之间(诸如13-15或14-15)的格拉斯哥昏迷量表数。百分之十五(15%)的轻度TBI患者的症状持续3个月或更长时间。轻度TBI定义为头部的强力运动或导致不到30分钟的精神状态短暂变化(混乱、定向障碍或记忆丧失)或意识丧失的冲击力的结果。轻度TBI的常见症状包括疲劳、头痛、视力障碍、记忆力丧失、注意力/集中力差、睡眠障碍、头晕/失去平衡、应激性情绪障碍、抑郁情感和癫痫。与轻度TBI相关的其它症状包括恶心、嗅觉丧失、对光和声音的敏感性、情绪变化、迷茫或混乱、和/或思维迟钝。

[0207] 如本文所用,“中度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失和/或混乱和定向障碍在1至24小时之间并且受试者具有9-13(诸如9-12或9-13)之间的格拉斯哥昏迷量表数。患有中度TBI的个体具有异常的脑成像结果。如本文所用的“重度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失超过24小时并且在损伤或穿透性颅骨损伤后记忆丧失长过24小时并且受试者具有3-8之间的格拉斯哥昏迷量表数。缺陷的范围为从较高水平的认知功能损害到昏迷状态。幸存者可能具有有限的手臂或腿部功能、言语或语言异常、思维能力丧失或情绪问题。具有重度损伤的个体可能会长期处于无反应状态。对于许多患有重度TBI的人来说,通常需要长期康复以最

大限度地发挥功能和独立性。

[0208] 本文所用的“中度至重度”TBI是指包括中度至重度的脑损伤谱,因此包括单独的中度TBI、单独的重度TBI和中度至重度TBI的组合。患有中度至重度TBI的受试者的格拉斯哥昏迷量表数为3-13(例如3-12或3-13)。例如,在某些临床情况下,最初可以将受试者诊断为患有中度TBI,但是随着时间的推移(几分钟、几小时或几天),该受试者会发展为患有重度TBI(例如,在有脑出血的情况下)。这样的受试者是可以被分类为“中度至重度”的患者的示例。中度至重度TBI的常见症状包括认知缺陷,包括注意力、集中力、注意力分散性、记忆力、运算速度方面的困难、混乱、持续言语、冲动、语言处理和/或“执行功能”、不理解口语词(感觉性失语症)、说话和被理解困难(表达性失语症)、言语不清、说话速度很快或很慢、阅读问题、写作问题、解释触摸、温度、运动、肢体位置和精细辨别困难、将感觉印象整合或模式化成对心理有意义的的数据、部分或全部视力丧失、眼肌无力和双视(复视)、视力模糊、判断距离的问题、不自主的眼球运动(眼球震颤)、不耐受光(畏光)、听力(诸如听力减弱或丧失、耳中有鸣声(耳鸣)、对声音的敏感度增加)、嗅觉丧失或减弱(嗅觉缺失症)、味觉丧失或减弱、与癫痫相关的惊厥,所述惊厥可能是几种类型并且可能涉及意识、感官知觉或运动肌移动、对肠和膀胱的控制中断、失眠、耐力丧失、食欲改变、体温调节、月经困难、依赖行为、情绪化能力、缺乏动力、易怒、攻击性、抑郁、去抑制或拒绝/缺乏意识。

[0209] 如本文可互换使用的“泛素羧基末端水解酶L1”或“UCH-L1”是指人类中由UCH-L1基因编码的去泛素化酶。UCH-L1也称为泛素羧基末端酯酶L1和泛素硫酯酶,是其产物水解泛素的小C末端加合物以产生泛素单体的基因家族的成员。

[0210] “UCH-L1状态”可以意指在某个时间点的UCH-L1的水平或量(诸如使用UCH-L1的单个测量值)、与监测相关的UCH-L1的水平或量(诸如对受试者进行重复测试以鉴定UCH-L1量的增加或减少)、与创伤性脑损伤(无论是原发性脑损伤和/或继发性脑损伤)的治疗相关的UCH-L1的水平或量或其组合。

[0211] “变体”在本文中用于描述因氨基酸的插入、缺失或保守性取代而在氨基酸序列方面不同,但保留至少一种生物活性的肽或多肽。“生物活性”的代表性实例包括被特异性抗体结合或促进免疫应答的能力。变体还在本文中用于描述具有与参考蛋白质基本上相同的氨基酸序列的蛋白质,所述参考蛋白质具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列。氨基酸的保守性取代,即以相似特性(例如亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸来替换氨基酸,在本领域中被公认为通常涉及微小变化。如本领域中所理解的,这些微小变化可以部分通过考虑氨基酸的亲疏水性指数来鉴定。Kyte等人,J.Mol.Biol.157:105-132(1982)。氨基酸的亲疏水性指数是基于其疏水性和电荷的考虑。本领域中已知的是相似的疏水性指数的氨基酸可被取代并仍然保留蛋白质功能。在一个方面,疏水性指数为 ± 2 的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可用于揭示将产生保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的背景下考虑氨基酸的亲水性允许计算该肽最大的局部平均亲水性,其是一种已经被报道与抗原性和免疫原性良好关联的有用量度。美国专利号4,554,101以引用的方式全部并入本文。如本领域中所了解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可以产生保留生物活性(例如免疫原性)的肽。可用具有彼此在 ± 2 内的亲水性值的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者都受该氨基酸的特定侧链影响。与该观察结果一致的是,与生物功能相容的氨基酸取代被理解为取决于氨基酸、并且特别是那些氨基酸的侧链的相对相似性,如通过疏水性、

亲水性、电荷、大小以及其它特性所揭示的。“变体”也可用于指抗cTnI和/或抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体的抗原反应性片段,其在氨基酸序列方面与抗cTnI和/或抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体的相应片段不同,但仍具有抗原反应性并且可以与用于与cTnI和/或抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体结合的抗cTnI和/或抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体的相应片段竞争。“变体”也可用于描述已经差别地加工(诸如通过蛋白水解、磷酸化或其它翻译后修饰),但仍保留它的抗原反应性的多肽或其片段。

[0212] “载体”在本文中用于描述可以转运其已连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可以将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以被连接到病毒基因组中。某些载体可以在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如包含细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如非附加型哺乳动物载体)可在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们所可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,适用于重组DNA技术中的表达载体常常呈质粒形式。“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,可以使用起等同功能的其它形式的表达载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。就这一点而言,载体的RNA型式(包括RNA病毒载体)也可以用于本公开的上下文中。

[0213] 除非本文另外定义,否则结合本公开使用的科学和技术术语将具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。例如,结合本文中描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质及核酸化学以及杂交使用的任何命名法以及其技术是本领域中熟知并且常用的那些。术语的含义和范围应为清晰的;然而,如果存在任何隐含歧义,则本文中所提供的定义优先于任何字典或外来定义。此外,除非另外通过上下文要求,否则单数的术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0214] 2. 使用心肌肌钙蛋白I(cTnI)和早期生物标记物帮助诊断和评价人类受试者是否可能已遭受或已遭受(患有实际或疑似)头部损伤的方法

[0215] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助诊断和评价人类受试者是否已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的方法。该方法可以帮助确定在患有实际疑似头部损伤的人类受试者中创伤性脑损伤的程度,例如,确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。如本文所用,“确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或中度、重度或中度至重度”是指以下事实:前述方法可以例如与其它信息(例如临床评估数据)一起使用以确定受试者更可能患有轻度创伤性脑损伤或中度至重度创伤性脑损伤。该方法可以包括在实际或疑似头部损伤之后约24小时内、诸如约2小时内对获自人类受试者的样品进行测定以测量或检测样品中心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平并且确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI)。在一些实施方式中,(1)当样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度TBI,或(2)当样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,受试者确定为患有轻度TBI。样品可以是生物样品。早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋

白 (GFAP) 或其组合。

[0216] 在一些实施方式中,该方法可以包括在受试者实际或疑似损伤约24小时内、诸如约2小时内获得样品并且使样品与cTnI的抗体接触以允许形成抗体和cTnI的复合物、以及与早期生物标记物的抗体接触以允许形成抗体与早期生物标记物的复合物。该方法还包括检测所得抗体-cTnI复合物和所得抗体-早期生物标记物复合物。

[0217] 在一些实施方式中,样品可以在实际或疑似头部损伤约0分钟内、约1分钟内、约2分钟内、约3分钟内、约4分钟内、约5分钟内、约6分钟内、约7分钟内、约8分钟内、约9分钟内、约10分钟内、约11分钟内、约12分钟内、约13分钟内、约14分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内获自或取自受试者。

[0218] 在一些实施方式中,样品在头部损伤或疑似损伤约2小时内取自人类受试者。例如,样品可以在头部损伤或疑似头部损伤约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内取自人类受试者。在一些实施方式中,cTnI和/或早期生物标记物的存在是在头部损伤之后约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内开始出现。

[0219] 在一些实施方式中,受试者在一个或多个时间点确定cTnI和/或早期生物标记物的水平之前或之后可能已接受格拉斯哥昏迷量表评分。在某些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有轻度创伤性脑损伤。在某些实施方式中,基于异常头部CT,受试者可能疑似患有轻度创伤性脑损伤。在一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过CT扫描。在一些实施方式中,受试者具有正常的头部CT。

[0220] 在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12(中度至重度TBI)相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-8(重度TBI)相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为9-13(中度TBI)相关联。在一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15(轻度TBI)相关联。

[0221] 通常,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平还可以用作基准,针对该基准评估在分别测定测试样品的cTnI和早期生物标记物之后获得的结果。通常,在进行这种比较时,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平通过以下获得:以足够次数且在适当条件下运行特定测定法以使得可以将分析物存在性、量或浓度与TBI的特定阶段或终点或与特定标志进行相联系或关联。通常,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平通过参考受试者(或受试者群体)的测定获得。所测量的cTnI和/或早期生物标记物可以包括

其片段、其降解产物,和/或其酶促裂解产物。

[0222] 在某些实施方式中,可以将参考水平与尚未遭受头部损伤的对照受试者相关联。

[0223] 在一些实施方式中,cTnI的参考水平和/或早期生物标记物的参考水平是通过具有至少约65%至约100%之间的敏感性和至少约30%至约100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,敏感性在至少约65%至约100%之间、至少约65%至至少约99%之间、至少约65%至至少约95%之间、至少约65%至至少约90%之间、至少约65%至至少约85%之间、至少约65%至至少约80%之间、至少约65%至至少约75%之间、至少约65%至至少约70%之间、至少约75%至约100%之间、至少约75%至至少约99%之间、至少约75%至至少约95%之间、至少约75%至至少约90%之间、至少约75%至至少约85%之间、至少约75%至至少约80%之间、至少约85%至约100%之间、至少约85%至至少约99%之间、至少约85%至至少约95%之间、至少约85%至至少约90%之间、至少约95%至约100%之间、或至少约95%至至少约99%之间。在一些实施方式中,敏感性为至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约87.5%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。

[0224] 在一些实施方式中,特异性在至少约30%至约100%之间、至少约30%至约99%之间、至少约30%至约95%之间、至少约30%至约90%之间、至少约30%至约85%之间、至少约30%至约80%之间、至少约30%至约75%之间、至少约30%至约70%之间、至少约30%至约60%之间、至少约30%至约50%之间、至少约40%至约100%之间、至少约40%至约99%之间、至少约40%至约95%之间、至少约40%至约90%之间、至少约40%至约85%之间、至少约40%至约80%之间、至少约40%至约75%之间、至少约40%至约70%之间、至少约40%至约60%之间、至少约40%至约50%之间、至少约50%至约100%之间、至少约50%至约99%之间、至少约50%至约95%之间、至少约50%至约90%之间、至少约50%至约85%之间、至少约50%至约80%之间、至少约50%至约75%之间、至少约50%至约70%之间、至少约50%至约60%之间、至少约60%至约100%之间、至少约60%至约99%之间、至少约60%至约95%之间、至少约60%至约90%之间、至少约60%至约85%之间、至少约60%至约80%之间、至少约60%至约75%之间、至少约60%至约70%之间、至少约70%至约100%之间、至少约70%至约99%之间、至少约70%至约95%之间、至少约70%至约90%之间、至少约70%至约85%之间、至少约70%至约80%之间、至少约70%至约75%之间、至少约80%至约100%之间、至少约80%至约99%之间、至少约80%至约95%之间、至少约80%至约90%之间、至少约80%至约85%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至约99%之间、至少约90%至约95%之间、至少约95%至约99%之间、或至少约95%至约100%之间。在一些实施方式中,特异性为至少约30.0%、至少约31.0%、至少约32.0%、至少约33.0%、至少约34.0%、至少约35.0%、至少约36.0%、至少约37.0%、至少约38.0%、至少约39.0%、至少约40.0%、至少约45.0%、至少约50.0%、至少约55.0%、至少约60.0%、至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约91.0%、至少约92.0%、至少约93.0%、至少约94.0%、至少约95.0%、至少约96.0%、至少约97.0%、至少约98.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少

约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。例如,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约75%,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约99%,或敏感性为约100%并且特异性为约100%。

[0225] 在一些实施方式中,样品中cTnI的量为约1pg/mL至约100pg/mL、约1pg/mL至约90pg/mL、约1pg/mL至约80pg/mL、约1pg/mL至约70pg/mL、约1pg/mL至约60pg/mL、约1pg/mL至约55pg/mL、约1pg/mL至约50pg/mL、约1pg/mL至约45pg/mL、约1pg/mL至约40pg/mL、约1pg/mL至约35pg/mL、约1pg/mL至约30pg/mL、约1pg/mL至约25pg/mL、约1pg/mL至约20pg/mL、约1pg/mL至约15pg/mL、约1pg/mL至约10pg/mL、约1pg/mL至约9pg/mL、约1pg/mL至约8pg/mL、约1pg/mL至约7pg/mL、约1pg/mL至约6pg/mL、约1pg/mL至约5pg/mL、约1pg/mL至约4pg/mL、约1pg/mL至约3pg/mL、约1pg/mL至约2pg/mL、约1pg/mL至约1.5pg/mL、约1.5pg/mL至约100pg/mL、约1.5pg/mL至约90pg/mL、约1.5pg/mL至约80pg/mL、约1.5pg/mL至约70pg/mL、约1.5pg/mL至约60pg/mL、约1.5pg/mL至约55pg/mL、约1.5pg/mL至约50pg/mL、约1.5pg/mL至约45pg/mL、约1.5pg/mL至约40pg/mL、约1.5pg/mL至约35pg/mL、约1.5pg/mL至约30pg/mL、约1.5pg/mL至约25pg/mL、约1.5pg/mL至约20pg/mL、约1.5pg/mL至约15pg/mL、约1.5pg/mL至约10pg/mL、约1.5pg/mL至约9pg/mL、约1.5pg/mL至约8pg/mL、约1.5pg/mL至约7pg/mL、约1.5pg/mL至约6pg/mL、约1.5pg/mL至约5pg/mL、约1.5pg/mL至约4pg/mL、约1.5pg/mL至约3pg/mL、约1.5pg/mL至约2pg/mL、约2pg/mL至约100pg/mL、约2pg/mL至约90pg/mL、约2pg/mL至约80pg/mL、约2pg/mL至约70pg/mL、约2pg/mL至约60pg/mL、约2pg/mL至约55pg/mL、约2pg/mL至约50pg/mL、约2pg/mL至约45pg/mL、约2pg/mL至约40pg/mL、约2pg/mL至约35pg/mL、约2pg/mL至约30pg/mL、约2pg/mL至约25pg/mL、约2pg/mL至约20pg/mL、约2pg/mL至约15pg/mL、约2pg/mL至约10pg/mL、约2pg/mL至约9pg/mL、约2pg/mL至约8pg/mL、约2pg/mL至约7pg/mL、约2pg/mL至约6pg/mL、约2pg/mL至约5pg/mL、约2pg/mL至约4pg/mL、约2pg/mL至约3pg/mL、约3pg/mL至约100pg/mL、约3pg/mL至约90pg/mL、约3pg/mL至约80pg/mL、约3pg/mL至约70pg/mL、约3pg/mL至约60pg/mL、约3pg/mL至约55pg/mL、约3pg/mL至约50pg/mL、约3pg/mL至约45pg/mL、约3pg/mL至约40pg/mL、约3pg/mL至约35pg/mL、约3pg/mL至约30pg/mL、约3pg/mL至约25pg/mL、约3pg/mL至约20pg/mL、约3pg/mL至约15pg/mL、约3pg/mL至约10pg/mL、约3pg/mL至约9pg/mL、约3pg/mL至约8pg/mL、约3pg/mL至约7pg/mL、约3pg/mL至约6pg/mL、约3pg/mL至约5pg/mL、约3pg/mL至约4pg/mL、约4pg/mL至约100pg/mL、约4pg/mL至约90pg/mL、约4pg/mL至约80pg/mL、约4pg/mL至约70pg/mL、约4pg/mL至约60pg/mL、约4pg/mL至约55pg/mL、约4pg/mL至约50pg/mL、约4pg/mL至约45pg/mL、约4pg/mL至约40pg/mL、约4pg/mL至约35pg/mL、约4pg/mL至约30pg/mL、约4pg/mL至约25pg/mL、约4pg/mL至约20pg/mL、约4pg/mL至约15pg/mL、约4pg/mL至约10pg/mL、约4pg/mL至约9pg/mL、约4pg/mL至约8pg/mL、约4pg/mL至约7pg/mL、约4pg/mL至约6pg/mL、约4pg/mL至约5pg/mL、约5pg/mL至约100pg/mL、约5pg/mL至约90pg/mL、约5pg/mL至约80pg/mL、约5pg/mL至约70pg/mL、约5pg/mL至约60pg/mL、约5pg/mL至约55pg/mL、约5pg/mL至约50pg/mL、约5pg/mL至约45pg/mL、约5pg/mL至约40pg/mL、约5pg/mL至约35pg/mL、约5pg/mL至约30pg/mL、约5pg/mL至约25pg/mL、约5pg/mL至约20pg/mL、约5pg/mL至约15pg/mL、约5pg/mL至约10pg/mL、约5pg/mL至约9pg/mL、约5pg/mL至约8pg/mL、约5pg/mL至约7pg/mL、约5pg/mL至约6pg/mL、约6pg/mL至约100pg/mL、约6pg/mL至约90pg/mL、约6pg/mL至约80pg/mL、约6pg/mL至约70pg/mL、约6pg/mL

至约60pg/mL、约6pg/mL至约55pg/mL、约6pg/mL至约50pg/mL、约6pg/mL至约45pg/mL、约6pg/mL至约40pg/mL、约6pg/mL至约35pg/mL、约6pg/mL至约30pg/mL、约6pg/mL至约25pg/mL、约6pg/mL至约20pg/mL、约6pg/mL至约15pg/mL、约6pg/mL至约10pg/mL、约6pg/mL至约9pg/mL、约6pg/mL至约8pg/mL、约6pg/mL至约7pg/mL、约7pg/mL至约100pg/mL、约7pg/mL至约90pg/mL、约7pg/mL至约80pg/mL、约7pg/mL至约70pg/mL、约7pg/mL至约60pg/mL、约7pg/mL至约55pg/mL、约7pg/mL至约50pg/mL、约7pg/mL至约45pg/mL、约7pg/mL至约40pg/mL、约7pg/mL至约35pg/mL、约7pg/mL至约30pg/mL、约7pg/mL至约25pg/mL、约7pg/mL至约20pg/mL、约7pg/mL至约15pg/mL、约7pg/mL至约10pg/mL、约7pg/mL至约9pg/mL、约7pg/mL至约8pg/mL、约8pg/mL至约100pg/mL、约8pg/mL至约90pg/mL、约8pg/mL至约80pg/mL、约8pg/mL至约70pg/mL、约8pg/mL至约60pg/mL、约8pg/mL至约55pg/mL、约8pg/mL至约50pg/mL、约8pg/mL至约45pg/mL、约8pg/mL至约40pg/mL、约8pg/mL至约35pg/mL、约8pg/mL至约30pg/mL、约8pg/mL至约25pg/mL、约8pg/mL至约20pg/mL、约8pg/mL至约15pg/mL、约8pg/mL至约10pg/mL、约8pg/mL至约9pg/mL、约9pg/mL至约100pg/mL、约9pg/mL至约90pg/mL、约9pg/mL至约80pg/mL、约9pg/mL至约70pg/mL、约9pg/mL至约60pg/mL、约9pg/mL至约55pg/mL、约9pg/mL至约50pg/mL、约9pg/mL至约45pg/mL、约9pg/mL至约40pg/mL、约9pg/mL至约35pg/mL、约9pg/mL至约30pg/mL、约9pg/mL至约25pg/mL、约9pg/mL至约20pg/mL、约9pg/mL至约15pg/mL、约9pg/mL至约10pg/mL、约10pg/mL至约100pg/mL、约10pg/mL至约90pg/mL、约10pg/mL至约80pg/mL、约10pg/mL至约70pg/mL、约10pg/mL至约60pg/mL、约10pg/mL至约55pg/mL、约10pg/mL至约50pg/mL、约10pg/mL至约45pg/mL、约10pg/mL至约40pg/mL、约10pg/mL至约35pg/mL、约10pg/mL至约30pg/mL、约10pg/mL至约25pg/mL、约10pg/mL至约20pg/mL、约10pg/mL至约15pg/mL、约20pg/mL至约100pg/mL、约20pg/mL至约90pg/mL、约20pg/mL至约80pg/mL、约20pg/mL至约70pg/mL、约20pg/mL至约60pg/mL、约20pg/mL至约55pg/mL、约20pg/mL至约50pg/mL、约20pg/mL至约45pg/mL、约20pg/mL至约40pg/mL、约20pg/mL至约35pg/mL、约20pg/mL至约30pg/mL、或约20pg/mL至约25pg/mL。在一些实施方式中，cTnI的量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约60pg/mL、至少约70pg/mL、至少约80pg/mL、至少约90pg/mL或至少约100pg/mL。

[0226] 在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的量可在约1pg/mL至约1000pg/mL之间。在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的参考水平可以在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约800pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约700pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约600pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约550pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约450pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约20pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约15pg/mL之间、在至少约1pg/mL至约

600pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约550pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约450pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约800pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约700pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约600pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约550pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约800pg/mL之间、或在至少约600pg/mL至约700pg/mL之间。在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0、pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约100pg/mL、至少约150pg/mL、至少约200pg/mL、至少约250pg/mL、至少约300pg/mL、至少约350pg/mL、至少约400pg/mL、至少约450pg/mL、至少约500pg/mL、至少约550pg/mL、至少约600pg/mL、至少约650pg/mL、至少约700pg/mL、至少约750pg/mL、至少约800pg/mL、至少约850pg/mL、至少约900pg/mL、至少约950pg/mL或至少约1000pg/mL。

[0227] 为了进行上述方法,本领域技术人员(例如医师)将理解并且知晓如何进行额外测试以便检测或评估其它合并症(例如除TBI以外的其它疾病、病症、或病状)。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0228] 在一个实施方式中,为了证实本文所述方法中cTnI量或水平的变化可归因于受试者的头部损伤或疑似头部损伤而非急性心脏综合征(诸如心肌梗塞、心力衰竭等)的结果,医师或其它保健提供者可以执行或进行一种或多种额外测试或程序以证实不存在急性心脏综合征。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0229] 在一些实施方式中,该方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,该方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,该方法进一步包括要求额外的测试以获得关于创伤性脑损伤的进一步临床信息。在一些实施方式中,该方法包括用保护心脏的心肌保护治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度脑损伤的人类受试者,如下所述。

[0230] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如像免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域普通技术人员已知的。这类测定法在本文的第8-12章节中进一步详细描述。本领域已知,在采用特定样品类型的测定法中使用的值(例如参考水平、截止值、阈值、特异性、敏感性、校准物和/或对照的浓度等)(例

如,诸如利用血清的免疫测定法或采用全血的定点照护装置)可以使用本领域已知的技术外推至其它测定形式,诸如测定标准化。例如,可以进行测定标准化的一种方式是通过将一个因子应用于测定法中采用的校准物,以使样品浓度读数更高或更低,以获得与比较器方法一致的斜率。将针对一种测定法获得的结果标准化至另一种测定法的其它方法是众所周知的并且已在文献中描述(参见例如David Wild, *Immunoassay Handbook*, 第4版, 第3.5章, 第315-322页,其内容通过引用并入本文)。

[0231] 3. 使用心肌肌钙蛋白I(cTnI)和早期生物标记物帮助确定是否对可能患有或已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行CT扫描的方法

[0232] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行计算机断层(CT)扫描的方法。如本文所用,“确定是否对人类受试者进行CT扫描”是指以下事实:前述方法可以例如与其它信息(例如临床评估数据)一起使用来确定受试者更可能具有阳性头部CT扫描。具体地,所述方法可包括以下步骤:a)对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内、诸如约2小时内获自受试者的样品进行测定以测量或检测样品中心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平 and 早期生物标记物的水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平;并且b)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平时,对受试者进行CT扫描,并且当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者进行CT扫描。样品可以是生物样品。早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合。

[0233] 在一些实施方式中,该方法可以包括在受试者实际疑似损伤约24小时内、诸如约2小时内获得样品并且使样品与cTnI的抗体接触以允许形成抗体和cTnI的复合物、以及与早期生物标记物的抗体接触以允许形成抗体与早期生物标记物的复合物。该方法还包括检测所得抗体-cTnI复合物和所得抗体-早期生物标记物复合物。

[0234] 在一些实施方式中,样品可以在疑似头部损伤约0分钟内、约1分钟内、约2分钟内、约3分钟内、约4分钟内、约5分钟内、约6分钟内、约7分钟内、约8分钟内、约9分钟内、约10分钟内、约11分钟内、约12分钟内、约13分钟内、约14分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内获自或取自受试者。

[0235] 在一些实施方式中,样品在头部损伤或疑似损伤约2小时内取自人类受试者。例如,样品可以在头部损伤或疑似头部损伤约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内取自人类受试者。在一些实施方式中,cTnI和/或早期生物标记物的存在存在在头部损伤之后约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内开始出现。

[0236] 在一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过CT扫描。在一些实施方

式中,基于CT扫描,受试者疑似患有创伤性脑损伤。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平与阳性头部CT扫描相关联。

[0237] 通常,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平可以用作基准,针对该基准评估在分别测定测试样品的cTnI和早期生物标记物之后获得的结果。通常,在进行这种比较时,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平通过以下获得:以足够次数且在适当条件下运行特定测定法以使得可以将分析物存在性、量或浓度与TBI的特定阶段或终点或与特定标志进行相联系或关联。通常,cTnI的参考水平和早期生物标记物的参考水平通过参考受试者(或受试者群体)的测定获得。所测量的cTnI和/或早期生物标记物可以包括其片段、其降解产物,和/或其酶促裂解产物。

[0238] 在一些实施方式中,cTnI的参考水平和/或早期生物标记物的参考水平是通过具有至少约65%至约100%之间的敏感性和至少约30%至约100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,敏感性在至少约65%至约100%之间、至少约65%至至少约99%之间、至少约65%至至少约95%之间、至少约65%至至少约90%之间、至少约65%至至少约85%之间、至少约65%至至少约80%之间、至少约65%至至少约75%之间、至少约65%至至少约70%之间、至少约75%至约100%之间、至少约75%至至少约99%之间、至少约75%至至少约95%之间、至少约75%至至少约90%之间、至少约75%至至少约85%之间、至少约75%至至少约80%之间、至少约85%至约100%之间、至少约85%至至少约99%之间、至少约85%至至少约95%之间、至少约85%至至少约90%之间、至少约95%至约100%之间、或至少约95%至至少约99%之间。在一些实施方式中,敏感性为至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约87.5%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。

[0239] 在一些实施方式中,特异性在至少约30%至约100%之间、至少约30%至约99%之间、至少约30%至约95%之间、至少约30%至约90%之间、至少约30%至约85%之间、至少约30%至约80%之间、至少约30%至约75%之间、至少约30%至约70%之间、至少约30%至约60%之间、至少约30%至约50%之间、至少约40%至约100%之间、至少约40%至约99%之间、至少约40%至约95%之间、至少约40%至约90%之间、至少约40%至约85%之间、至少约40%至约80%之间、至少约40%至约75%之间、至少约40%至约70%之间、至少约40%至约60%之间、至少约40%至约50%之间、至少约50%至约100%之间、至少约50%至约99%之间、至少约50%至约95%之间、至少约50%至约90%之间、至少约50%至约85%之间、至少约50%至约80%之间、至少约50%至约75%之间、至少约50%至约70%之间、至少约50%至约60%之间、至少约60%至约100%之间、至少约60%至约99%之间、至少约60%至约95%之间、至少约60%至约90%之间、至少约60%至约85%之间、至少约60%至约80%之间、至少约60%至约75%之间、至少约60%至约70%之间、至少约70%至约100%之间、至少约70%至约99%之间、至少约70%至约95%之间、至少约70%至约90%之间、至少约70%至约85%之间、至少约70%至约80%之间、至少约70%至约75%之间、至少约80%至约100%之间、至少约80%至约99%之间、至少约80%至约95%之间、至少约80%至约90%之间、至少约80%至约85%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至约99%之间、至少

8pg/mL、约4pg/mL至约7pg/mL、约4pg/mL至约6pg/mL、约4pg/mL至约5pg/mL、约5pg/mL至约100pg/mL、约5pg/mL至约90pg/mL、约5pg/mL至约80pg/mL、约5pg/mL至约70pg/mL、约5pg/mL至约60pg/mL、约5pg/mL至约55pg/mL、约5pg/mL至约50pg/mL、约5pg/mL至约45pg/mL、约5pg/mL至约40pg/mL、约5pg/mL至约35pg/mL、约5pg/mL至约30pg/mL、约5pg/mL至约25pg/mL、约5pg/mL至约20pg/mL、约5pg/mL至约15pg/mL、约5pg/mL至约10pg/mL、约5pg/mL至约9pg/mL、约5pg/mL至约8pg/mL、约5pg/mL至约7pg/mL、约5pg/mL至约6pg/mL、约6pg/mL至约100pg/mL、约6pg/mL至约90pg/mL、约6pg/mL至约80pg/mL、约6pg/mL至约70pg/mL、约6pg/mL至约60pg/mL、约6pg/mL至约55pg/mL、约6pg/mL至约50pg/mL、约6pg/mL至约45pg/mL、约6pg/mL至约40pg/mL、约6pg/mL至约35pg/mL、约6pg/mL至约30pg/mL、约6pg/mL至约25pg/mL、约6pg/mL至约20pg/mL、约6pg/mL至约15pg/mL、约6pg/mL至约10pg/mL、约6pg/mL至约9pg/mL、约6pg/mL至约8pg/mL、约6pg/mL至约7pg/mL、约7pg/mL至约100pg/mL、约7pg/mL至约90pg/mL、约7pg/mL至约80pg/mL、约7pg/mL至约70pg/mL、约7pg/mL至约60pg/mL、约7pg/mL至约55pg/mL、约7pg/mL至约50pg/mL、约7pg/mL至约45pg/mL、约7pg/mL至约40pg/mL、约7pg/mL至约35pg/mL、约7pg/mL至约30pg/mL、约7pg/mL至约25pg/mL、约7pg/mL至约20pg/mL、约7pg/mL至约15pg/mL、约7pg/mL至约10pg/mL、约7pg/mL至约9pg/mL、约7pg/mL至约8pg/mL、约8pg/mL至约100pg/mL、约8pg/mL至约90pg/mL、约8pg/mL至约80pg/mL、约8pg/mL至约70pg/mL、约8pg/mL至约60pg/mL、约8pg/mL至约55pg/mL、约8pg/mL至约50pg/mL、约8pg/mL至约45pg/mL、约8pg/mL至约40pg/mL、约8pg/mL至约35pg/mL、约8pg/mL至约30pg/mL、约8pg/mL至约25pg/mL、约8pg/mL至约20pg/mL、约8pg/mL至约15pg/mL、约8pg/mL至约10pg/mL、约8pg/mL至约9pg/mL、约9pg/mL至约100pg/mL、约9pg/mL至约90pg/mL、约9pg/mL至约80pg/mL、约9pg/mL至约70pg/mL、约9pg/mL至约60pg/mL、约9pg/mL至约55pg/mL、约9pg/mL至约50pg/mL、约9pg/mL至约45pg/mL、约9pg/mL至约40pg/mL、约9pg/mL至约35pg/mL、约9pg/mL至约30pg/mL、约9pg/mL至约25pg/mL、约9pg/mL至约20pg/mL、约9pg/mL至约15pg/mL、约9pg/mL至约10pg/mL、约10pg/mL至约100pg/mL、约10pg/mL至约90pg/mL、约10pg/mL至约80pg/mL、约10pg/mL至约70pg/mL、约10pg/mL至约60pg/mL、约10pg/mL至约55pg/mL、约10pg/mL至约50pg/mL、约10pg/mL至约45pg/mL、约10pg/mL至约40pg/mL、约10pg/mL至约35pg/mL、约10pg/mL至约30pg/mL、约10pg/mL至约25pg/mL、约10pg/mL至约20pg/mL、约10pg/mL至约15pg/mL、约20pg/mL至约100pg/mL、约20pg/mL至约90pg/mL、约20pg/mL至约80pg/mL、约20pg/mL至约70pg/mL、约20pg/mL至约60pg/mL、约20pg/mL至约55pg/mL、约20pg/mL至约50pg/mL、约20pg/mL至约45pg/mL、约20pg/mL至约40pg/mL、约20pg/mL至约35pg/mL、约20pg/mL至约30pg/mL、或约20pg/mL至约25pg/mL。在一些实施方式中，cTnI的量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约60pg/mL、至少约70pg/mL、至少约80pg/mL、至少约90pg/mL或至少约100pg/mL。

[0241] 在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的量可在约1pg/mL至约1000pg/mL之间。在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1之间、GFAP或

约400pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约800pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约700pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约600pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约550pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约450pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约800pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约700pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约600pg/mL之间、在至少约500pg/mL至约550pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约900pg/mL之间、在至少约600pg/mL至约800pg/mL之间、或在至少约600pg/mL至约700pg/mL之间。在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0、pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约100pg/mL、至少约150pg/mL、至少约200pg/mL、至少约250pg/mL、至少约300pg/mL、至少约350pg/mL、至少约400pg/mL、至少约450pg/mL、至少约500pg/mL、至少约550pg/mL、至少约600pg/mL、至少约650pg/mL、至少约700pg/mL、至少约750pg/mL、至少约800pg/mL、至少约850pg/mL、至少约900pg/mL、至少约950pg/mL或至少约1000pg/mL。

[0242] 在上述方法的一些实施方式中,cTnI、UCH-L1和/或GFAP的参考水平如下表A、B和C中所示。

[0243] 表A:

[0244]	cTnI	UCH-L1
--------	------	--------

[0245]

约 5pg/mL	约 400pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL
约 5pg/mL	约 550pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL
约 10pg/mL	约 550pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL
约 15pg/mL	约 550pg/mL
约 20pg/mL	约 400pg/mL
约 20pg/mL	约 500pg/mL
约 20pg/mL	约 550pg/mL
约 35pg/mL	约 400pg/mL
约 35pg/mL	约 500pg/mL
约 35pg/mL	约 550pg/mL
约 50pg/mL	约 400pg/mL
约 50pg/mL	约 500pg/mL
约 50pg/mL	约 550pg/mL

[0246] 表B

[0247]	cTnI	GFAP
	约 5pg/mL	约 70pg/mL
	约 5pg/mL	约 100pg/mL
	约 5pg/mL	约 150pg/mL
	约 10pg/mL	约 70pg/mL
	约 10pg/mL	约 100pg/mL
	约 10pg/mL	约 150pg/mL
	约 15pg/mL	约 70pg/mL
	约 15pg/mL	约 100pg/mL
	约 15pg/mL	约 150pg/mL
	约 20pg/mL	约 70pg/mL
	约 20pg/mL	约 100pg/mL

[0248]	约 20pg/mL	约 150pg/mL
	约 35pg/mL	约 70pg/mL
	约 35pg/mL	约 100pg/mL
	约 35pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 70pg/mL
	约 50pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 150pg/mL

[0249] 表C

[0250]

cTnI	UCH-L1	GFAP
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 5pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
约 5pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
约 10pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL

	约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
	约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 15pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
	约 15pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
	约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
	约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
	约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
	约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL
	约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
	约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 20pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
	约 20pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
	约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
[0251]	约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
	约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
	约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL
	约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
	约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 35pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
	约 35pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
	约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 70pg/mL
	约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 70pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 550pg/mL	约 70pg/mL
	约 50pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
[0252]	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL

[0253] 在上述方法的一些实施方式中, cTnI、UCH-L1和/或GFAP的参考水平如下表D、E和F中所示:

[0254] 表D:

[0255]

CTnI	UCH-L1
约5pg/mL	约400pg/mL
约5pg/mL	约500pg/mL
约5pg/mL	约550pg/mL
约10pg/mL	约400pg/mL
约10pg/mL	约500pg/mL
约10pg/mL	约550pg/mL
约15pg/mL	约400pg/mL
约15pg/mL	约500pg/mL
约15pg/mL	约550pg/mL
约20pg/mL	约400pg/mL
约20pg/mL	约500pg/mL
约20pg/mL	约550pg/mL
约35pg/mL	约400pg/mL
约35pg/mL	约500pg/mL
约35pg/mL	约550pg/mL
约50pg/mL	约400pg/mL
约50pg/mL	约500pg/mL
约50pg/mL	约550pg/mL

[0256] 表E

[0257]

cTnI	GFAP
约 5pg/mL	约 50pg/mL
约 5pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 50pg/mL

[0258]

约 10pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 50pg/mL
约 15pg/mL	约 100pg/mL
约 15pg/mL	约 150pg/mL
约 20pg/mL	约 50pg/mL
约 20pg/mL	约 100pg/mL
约 20pg/mL	约 150pg/mL
约 35pg/mL	约 50pg/mL
约 35pg/mL	约 100pg/mL
约 35pg/mL	约 150pg/mL
约 50pg/mL	约 50pg/mL
约 50pg/mL	约 100pg/mL
约 50pg/mL	约 150pg/mL

[0259] 表F

[0260]

cTnI	UCH-L1	GFAP
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 5pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
约 5pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 5pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL

[0261]

约 10pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
约 10pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 10pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 15pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 15pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
约 15pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 15pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL
约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 20pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 20pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
约 20pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 20pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL
约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
约 35pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 35pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
约 35pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
约 35pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 50pg/mL

[0262]	约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 400pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 50pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL
	约 50pg/mL	约 550pg/mL	约 50pg/mL
	约 50pg/mL	约 550pg/mL	约 100pg/mL
	约 50pg/mL	约 500pg/mL	约 150pg/mL

[0263] 为了进行上述方法,本领域技术人员(例如医师)将理解并且知晓如何进行额外测试以便检测或评估其它合并症(例如除TBI以外的其它疾病、病症、或病状)。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0264] 在一个实施方式中,为了证实本文所述方法中cTnI量或水平的变化可归因于受试者的头部损伤或疑似头部损伤而非急性心脏综合征(诸如心肌梗塞、心力衰竭等)的结果,医师或其它保健提供者可以执行或进行一种或多种额外测试或程序以证实不存在急性心脏综合征。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0265] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被确定为患有TBI的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下所述监测被确定为患有TBI的人类受试者。在一些实施方式中,该方法进一步包括要求额外的测试以获得关于创伤性脑损伤的进一步临床信息。在一些实施方式中,该方法包括用保护心脏的心肌保护治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度脑损伤的人类受试者,如下所述。

[0266] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如像免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。这类测定法在本文的第8-12章节中进一步详细描述。

[0267] 4. 基于心肌肌钙蛋白I(cTnI)水平和早期生物标记物水平的变化,诊断和评价人类受试者是否可能患有或已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的方法

[0268] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助诊断和评价人类受试者是否已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的方法。该方法可以帮助确定在患有实际或疑似头部损伤的人类受试者中创伤性脑损伤的程度,例如,确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或中度、重度或中度至重度颅创伤性脑损伤。如本文所用,“确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤”是指以下事实:前述方法可以例如与其它

信息(例如临床评估数据)一起使用以确定受试者更可能患有轻度创伤性脑损伤或中度至重度创伤性脑损伤。该方法可以包括对获自受试者的至少两个样品进行测定,第一样品在实际或疑似头部损伤之后约24小时内,诸如约2小时内取自受试者且第二样品在取得第一样品之后约3至约6小时取自受试者;检测至少两个样品中心肌钙蛋白I(cTnI)和早期生物标记物的水平;并且确定受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI)。(1)当从第一样品至第二样品的cTnI的水平降低或增加至少绝对量并且从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当从第一样品至第二样品的cTnI的水平没有降低或增加至少绝对量和/或从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。样品可为生物样品。早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合。

[0269] 在一个替代性方案中,该方法可以包括对获自受试者的至少两个样品进行测定,第一样品在实际或疑似头部损伤之后约24小时内、诸如约2小时内取自受试者且第二样品在取得第一样品之后约3至约6小时取自受试者;检测至少两个样品中的cTnI和早期生物标记物;并且确定受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当从第一样品至第二样品的cTnI的水平降低或增加至少第一绝对量并且从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少第一绝对量时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当从第一样品至第二样品的cTnI的水平没有降低或增加至少第二绝对量和/或从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平没有降低或增加至少第二绝对量时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。样品可以是生物样品。

[0270] 在一些实施方式中,该方法可以包括使样品与cTnI的抗体接触,以允许形成抗体和cTnI的复合物。该方法还包括检测所得的抗体-cTnI复合物以确定第一样品和第二样品中的每一种的cTnI的水平。cTnI的存在在疑似损伤发作之后约0至约2小时内开始出现。在一些实施方式中,cTnI的存在在头部损伤之后约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内开始出现。

[0271] 在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤的约24小时内的第一时间点处获得并且第二样品在第一时间点之后的第二时间点、或任选地第三时间点或第四时间点处获得。在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤之后约24小时内取得且第二样品在第一样品之后约3小时至约6小时内取得。在一些实施方式中,第一样品可以在疑似头部损伤约0分钟内、约1分钟内、约2分钟内、约3分钟内、约4分钟内、约5分钟内、约6分钟内、约7分钟内、约8分钟内、约9分钟内、约10分钟内、约11分钟内、约12分钟内、约13分钟内、约14分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内获自或取自受试者。

[0272] 在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤的约2小时内的第一时间点处获得并且

第二样品在第一时间点之后的第二时间点、或任选地第三时间点或第四时间点处获得。在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤之后约2小时内取得且第二样品在第一样品之后约3小时至约6小时内取得。在一些实施方式中,第一时间点在头部损伤或疑似损伤之后约0至约2小时取得。例如,第一样品可以在疑似损伤之后约0至约2小时、约0小时至约90分钟、约0小时至约60分钟、约0小时至约45分钟、约0小时至约30分钟、约0小时至约20分钟、约0小时至约15分钟、约0小时至约10分钟、约0小时至约5分钟、约5分钟至约90分钟、约5分钟至约60分钟、约5分钟至约45分钟、约5分钟至约30分钟、约5分钟至约20分钟、约5分钟至约15分钟、约5分钟至约10分钟、约10分钟至约90分钟、约10分钟至约60分钟、约10分钟至约45分钟、约10分钟至约30分钟、约10分钟至约20分钟、约10分钟至约15分钟、约15分钟至约90分钟、约15分钟至约60分钟、约15分钟至约45分钟、约15分钟至约30分钟、约15分钟至约20分钟、约20分钟至约90分钟、约20分钟至约60分钟、约20分钟至约45分钟或约20分钟至约30分钟之间取得。例如,第一样品可以在头部损伤或疑似头部损伤约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内取自人类受试者。

[0273] 在一些实施方式中,第二样品是在第一时间点之后约1小时至约10小时,诸如第一时间点之后约3小时至约6小时取得。在一些实施方式中,第二样品在第一样品之后约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时或约10小时取得。

[0274] 在一些实施方式中,受试者在一个或多个时间点确定cTnI的水平之前或之后可能已经接受格拉斯哥昏迷量表评分。在某些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者可能疑似患有轻度创伤性脑损伤。在某些实施方式中,基于异常头部CT,受试者可能疑似患有轻度创伤性脑损伤。在一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过CT扫描。在一些实施方式中,受试者具有正常的头部CT。

[0275] 在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12(中度至重度TBI)相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-8(重度TBI)相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为9-13(中度TBI)相关联。在一些实施方式中,基于格拉斯哥昏迷量表评分,受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。在一些实施方式中,将cTnI的参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15(轻度TBI)相关联。

[0276] 在一些实施方式中,绝对量可以是通过具有至少约65%至约100%之间的敏感性和至少约65%至约100%之间的特异性的测定法确定的。例如,绝对量可以通过具有至少约80%至100%之间的敏感性和至少约65%至100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,敏感性为至少约65.0%、敏感性为至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。在一些实施方式中,特异性为至少约65.0%、至

少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约91.0%、至少约92.0%、至少约93%、至少约94.0%、至少约95.0%、至少约96.0%、至少约97.0%、至少约98.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。例如,敏感性为至少约100%并且特异性为至少约75%,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约99%,或敏感性为约87%并且特异性为约95%。

[0277] 在一些实施方式中,样品中cTnI的绝对量为约1pg/mL至约50pg/mL、约1pg/mL至约45pg/mL、约1pg/mL至约40pg/mL、约1pg/mL至约35pg/mL、约1pg/mL至约30pg/mL、约1pg/mL至约25pg/mL、约1pg/mL至约20pg/mL、约1pg/mL至约15pg/mL、约1pg/mL至约10pg/mL、约1pg/mL至约9pg/mL、约1pg/mL至约8pg/mL、约1pg/mL至约7pg/mL、约1pg/mL至约6pg/mL、约1pg/mL至约5pg/mL、约1pg/mL至约4pg/mL、约1pg/mL至约3pg/mL、约1pg/mL至约2pg/mL、约1pg/mL至约1.5pg/mL、约1.5pg/mL至约50pg/mL、约1.5pg/mL至约45pg/mL、约1.5pg/mL至约40pg/mL、约1.5pg/mL至约35pg/mL、约1.5pg/mL至约30pg/mL、约1.5pg/mL至约25pg/mL、约1.5pg/mL至约20pg/mL、约1.5pg/mL至约15pg/mL、约1.5pg/mL至约10pg/mL、约1.5pg/mL至约9pg/mL、约1.5pg/mL至约8pg/mL、约1.5pg/mL至约7pg/mL、约1.5pg/mL至约6pg/mL、约1.5pg/mL至约5pg/mL、约1.5pg/mL至约4pg/mL、约1.5pg/mL至约3pg/mL、约1.5pg/mL至约2pg/mL、约2pg/mL至约50pg/mL、约2pg/mL至约45pg/mL、约2pg/mL至约40pg/mL、约2pg/mL至约35pg/mL、约2pg/mL至约30pg/mL、约2pg/mL至约25pg/mL、约2pg/mL至约20pg/mL、约2pg/mL至约15pg/mL、约2pg/mL至约10pg/mL、约2pg/mL至约9pg/mL、约2pg/mL至约8pg/mL、约2pg/mL至约7pg/mL、约2pg/mL至约6pg/mL、约2pg/mL至约5pg/mL、约2pg/mL至约4pg/mL、约2pg/mL至约3pg/mL、约3pg/mL至约50pg/mL、约3pg/mL至约45pg/mL、约3pg/mL至约40pg/mL、约3pg/mL至约35pg/mL、约3pg/mL至约30pg/mL、约3pg/mL至约25pg/mL、约3pg/mL至约20pg/mL、约3pg/mL至约15pg/mL、约3pg/mL至约10pg/mL、约3pg/mL至约9pg/mL、约3pg/mL至约8pg/mL、约3pg/mL至约7pg/mL、约3pg/mL至约6pg/mL、约3pg/mL至约5pg/mL、约3pg/mL至约4pg/mL、约4pg/mL至约50pg/mL、约4pg/mL至约45pg/mL、约4pg/mL至约40pg/mL、约4pg/mL至约35pg/mL、约4pg/mL至约30pg/mL、约4pg/mL至约25pg/mL、约4pg/mL至约20pg/mL、约4pg/mL至约15pg/mL、约4pg/mL至约10pg/mL、约4pg/mL至约9pg/mL、约4pg/mL至约8pg/mL、约4pg/mL至约7pg/mL、约4pg/mL至约6pg/mL、约4pg/mL至约5pg/mL、约5pg/mL至约50pg/mL、约5pg/mL至约45pg/mL、约5pg/mL至约40pg/mL、约5pg/mL至约35pg/mL、约5pg/mL至约30pg/mL、约5pg/mL至约25pg/mL、约5pg/mL至约20pg/mL、约5pg/mL至约15pg/mL、约5pg/mL至约10pg/mL、约5pg/mL至约9pg/mL、约5pg/mL至约8pg/mL、约5pg/mL至约7pg/mL、约5pg/mL至约6pg/mL、约6pg/mL至约50pg/mL、约6pg/mL至约45pg/mL、约6pg/mL至约40pg/mL、约6pg/mL至约35pg/mL、约6pg/mL至约30pg/mL、约6pg/mL至约25pg/mL、约6pg/mL至约20pg/mL、约6pg/mL至约15pg/mL、约6pg/mL至约10pg/mL、约6pg/mL至约9pg/mL、约6pg/mL至约8pg/mL、约6pg/mL至约7pg/mL、约7pg/mL至约50pg/mL、约7pg/mL至约45pg/mL、约7pg/mL至约40pg/mL、约7pg/mL至约35pg/mL、约7pg/mL至约30pg/mL、约7pg/mL至约25pg/mL、约7pg/mL至约20pg/mL、约7pg/mL至约15pg/mL、约7pg/mL至约10pg/mL、约7pg/mL至约9pg/mL、约7pg/mL至约8pg/mL、约8pg/mL至约50pg/mL、约8pg/mL至约45pg/mL、约8pg/mL至约40pg/mL、约8pg/mL至约35pg/mL、约8pg/mL至约30pg/mL、约8pg/mL至约25pg/mL、约8pg/mL至约20pg/mL、约8pg/mL

mL至约15pg/mL、约8pg/mL至约10pg/mL、约8pg/mL至约9pg/mL、约9pg/mL至约50pg/mL、约9pg/mL至约45pg/mL、约9pg/mL至约40pg/mL、约9pg/mL至约35pg/mL、约9pg/mL至约30pg/mL、约9pg/mL至约25pg/mL、约9pg/mL至约20pg/mL、约9pg/mL至约15pg/mL、约9pg/mL至约10pg/mL、约10pg/mL至约50pg/mL、约10pg/mL至约45pg/mL、约10pg/mL至约40pg/mL、约10pg/mL至约35pg/mL、约10pg/mL至约30pg/mL、约10pg/mL至约25pg/mL、约10pg/mL至约20pg/mL、约10pg/mL至约15pg/mL、约20pg/mL至约50pg/mL、约20pg/mL至约45pg/mL、约20pg/mL至约40pg/mL、约20pg/mL至约35pg/mL、约20pg/mL至约30pg/mL、或约20pg/mL至约25pg/mL。在一些实施方式中，cTnI的绝对量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL或至少约50pg/mL。

[0278] 在一些实施方式中，早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的绝对量可以在约5pg/mL至约1000pg/mL之间。在一些实施方式中，绝对量可以在至少约5pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约750pg/mL之间、或在至少约400pg/mL至约500pg/mL之间。在一些实施方式中，绝对量可以为至少约5pg/mL、至少约6pg/mL、至少约7pg/mL、至少约8pg/

mL、至少约9pg/mL、至少约10pg/mL、至少约11pg/mL、至少约12pg/mL、至少约13pg/mL、至少约14pg/mL、至少约15pg/mL、至少约16pg/mL、至少约17pg/mL、至少约18pg/mL、至少约19pg/mL、至少约20pg/mL、至少约21pg/mL、至少约22pg/mL、至少约23pg/mL、至少约24pg/mL、至少约25pg/mL、至少约26pg/mL、至少约27pg/mL、至少约28pg/mL、至少约29pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约55pg/mL、至少约60pg/mL、至少约65pg/mL、至少约70pg/mL、至少约75pg/mL、至少约80pg/mL、至少约85pg/mL、至少约90pg/mL、至少约95pg/mL、至少约100pg/mL、至少约110pg/mL、至少约120pg/mL、至少约129pg/mL、至少约130pg/mL、至少约140pg/mL、至少约150pg/mL、至少约200pg/mL、至少约250pg/mL、至少约300pg/mL、至少约350pg/mL、至少约400pg/mL、至少约450pg/mL、至少约500pg/mL、至少约550pg/mL、至少约600pg/mL、至少约650pg/mL、至少约700pg/mL、至少约750pg/mL、至少约800pg/mL、至少约900pg/mL或至少约1000pg/mL。

[0279] 为了进行上述方法,本领域技术人员(例如医师)将理解并且知晓如何进行额外测试以便检测或评估其它合并症(例如除TBI以外的其它疾病、病症、或病状)。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0280] 在一个实施方式中,为了证实本文所述方法中cTnI量或水平的变化可归因于受试者的头部损伤或疑似头部损伤而非急性心脏综合征(诸如心肌梗塞、心力衰竭等)的结果,医师或其它保健提供者可以执行或进行一种或多种额外测试或程序以证实不存在急性心脏综合征。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0281] 在一些实施方式中,该方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,该方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,该方法进一步包括要求额外的测试以获得关于创伤性脑损伤的进一步临床信息。在一些实施方式中,该方法包括用保护心脏的心肌保护治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度脑损伤的人类受试者,如下所述。

[0282] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如像免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。这类测定法在本文的第8-12章节中进一步详细描述。

[0283] 5. 基于心肌肌钙蛋白I(cTnI)水平和早期生物标记物水平的变化帮助确定是否对可能患有或已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行CT扫描的方法

[0284] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受(或患有实际或疑似)头部损伤的人类受试者进行计算机断层(CT)扫描的方法。如本文所用,“确定是否对人类受试者进行CT扫描”是指以下事实:前述方法可以例如与其它信息(例如临床评估数据)一起使用来确定受试者更可能具有阳性头部CT扫描。具体地,这种方法可以包括以下

步骤:对获自受试者的至少两个样品进行测定,第一样品在疑似损伤约24小时内、诸如约2小时内取自受试者且第二样品在取得第一样品之后约3至约6小时取自受试者;检测至少两个样品中的心肌肌钙蛋白I (cTnI) 和早期生物标记物的水平;并且当从第一样品至第二样品的cTnI的水平降低或增加至少绝对量并且从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时,对受试者进行CT扫描,并且当从第一样品至第二样品的cTnI的水平没有降低或增加至少绝对量和/或从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对受试者进行CT扫描。样品可以是生物样品。早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合。

[0285] 在一些实施方式中,该方法可以包括使样品与cTnI的抗体接触以允许形成抗体和cTnI的复合物、以及与早期生物标记物的抗体接触以允许形成抗体与早期生物标记物的复合物。该方法还包括检测所得的抗体-cTnI复合物以确定第一样品和第二样品中的每一种的cTnI的水平并且检测所得的抗体-早期生物标记物复合物以确定第一样品和第二样品中的每一种的早期生物标记物的水平。cTnI和/或早期生物标记物的存在发作在疑似损伤发作之后约0至约24小时内、诸如约2小时内出现。在一些实施方式中,cTnI和/或早期生物标记物的存在发作在头部损伤之后约0分钟、约1分钟、约2分钟、约3分钟、约4分钟、约5分钟、约6分钟、约7分钟、约8分钟、约9分钟、约10分钟、约11分钟、约12分钟、约13分钟、约14分钟、约15分钟、约20分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟或约2小时内出现。

[0286] 在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤的约24小时内的第一时间点处获得并且第二样品在第一时间点之后的第二时间点、或任选地第三时间点或第四时间点处获得。在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤之后约24小时内取得且第二样品在第一样品之后约3小时至约6小时内取得。在一些实施方式中,第一样品可以在疑似头部损伤约0分钟内、约1分钟内、约2分钟内、约3分钟内、约4分钟内、约5分钟内、约6分钟内、约7分钟内、约8分钟内、约9分钟内、约10分钟内、约11分钟内、约12分钟内、约13分钟内、约14分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内获自或取自受试者。

[0287] 在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤的约2小时内的第一时间点获得并且第二样品在第一时间点之后的第二时间点、或任选地第三时间点或第四时间点获得,以确定受试者是否将具有阳性或阴性头部CT扫描。在一些实施方式中,第一样品在疑似损伤之后约2小时内取得且第二样品在第一样品之后约3小时至约6小时内取得。在一些实施方式中,第一时间点是对头部损伤或疑似损伤后的约0至约2小时。例如,第一时间点可以在疑似损伤后约0至约2小时、约0小时至约90分钟、约0小时至约60分钟、约0小时至约45分钟、约0小时至约30分钟、约0小时至约20分钟、约0小时至约15分钟、约0小时至约10分钟、约0小时至约5分钟、约5分钟至约90分钟、约5分钟至约60分钟、约5分钟至约45分钟、约5分钟至约30分钟、约5分钟至约20分钟、约5分钟至约15分钟、约5分钟至约10分钟、约10分钟至约90分钟、约10分钟至约60分钟、约10分钟至约45分钟、约10分钟至约30分钟、约10分钟至约20分钟、约10分钟至约15分钟、约15分钟至约90分钟、约15分钟至约60分钟、约15分钟至约45分钟、

约15分钟至约30分钟、约15分钟至约20分钟、约20分钟至约90分钟、约20分钟至约60分钟、约20分钟至约45分钟或约20分钟至约30分钟之间。

[0288] 在一些实施方式中,第二时间点、或任选的第三时间点或第四时间点是第一时间点后的约1小时至约10小时,诸如第一时间点后的约3小时至约6小时。在一些实施方式中,第二时间点是第一时间点后的约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时或约10小时。

[0289] 在一些实施方式中,绝对量可以通过具有至少约65%至约100%之间的敏感性和至少约65%至约100%之间的特异性的测定法确定的。例如,绝对量可以通过具有至少约80%至100%之间的敏感性和至少约65%至100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,敏感性为至少约65.0%,敏感性为至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。在一些实施方式中,特异性为至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约91.0%、至少约92.0%、至少约93%、至少约94.0%、至少约95.0%、至少约96.0%、至少约97.0%、至少约98.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。例如,敏感性为至少约100%并且特异性为至少约75%,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约99%,或敏感性为约87%并且特异性为约95%。

[0290] 在一些实施方式中,样品中cTnI的绝对量为约1pg/mL至约50pg/mL、约1pg/mL至约45pg/mL、约1pg/mL至约40pg/mL、约1pg/mL至约35pg/mL、约1pg/mL至约30pg/mL、约1pg/mL至约25pg/mL、约1pg/mL至约20pg/mL、约1pg/mL至约15pg/mL、约1pg/mL至约10pg/mL、约1pg/mL至约9pg/mL、约1pg/mL至约8pg/mL、约1pg/mL至约7pg/mL、约1pg/mL至约6pg/mL、约1pg/mL至约5pg/mL、约1pg/mL至约4pg/mL、约1pg/mL至约3pg/mL、约1pg/mL至约2pg/mL、约1pg/mL至约1.5pg/mL、约1.5pg/mL至约50pg/mL、约1.5pg/mL至约45pg/mL、约1.5pg/mL至约40pg/mL、约1.5pg/mL至约35pg/mL、约1.5pg/mL至约30pg/mL、约1.5pg/mL至约25pg/mL、约1.5pg/mL至约20pg/mL、约1.5pg/mL至约15pg/mL、约1.5pg/mL至约10pg/mL、约1.5pg/mL至约9pg/mL、约1.5pg/mL至约8pg/mL、约1.5pg/mL至约7pg/mL、约1.5pg/mL至约6pg/mL、约1.5pg/mL至约5pg/mL、约1.5pg/mL至约4pg/mL、约1.5pg/mL至约3pg/mL、约1.5pg/mL至约2pg/mL、约2pg/mL至约50pg/mL、约2pg/mL至约45pg/mL、约2pg/mL至约40pg/mL、约2pg/mL至约35pg/mL、约2pg/mL至约30pg/mL、约2pg/mL至约25pg/mL、约2pg/mL至约20pg/mL、约2pg/mL至约15pg/mL、约2pg/mL至约10pg/mL、约2pg/mL至约9pg/mL、约2pg/mL至约8pg/mL、约2pg/mL至约7pg/mL、约2pg/mL至约6pg/mL、约2pg/mL至约5pg/mL、约2pg/mL至约4pg/mL、约2pg/mL至约3pg/mL、约3pg/mL至约50pg/mL、约3pg/mL至约45pg/mL、约3pg/mL至约40pg/mL、约3pg/mL至约35pg/mL、约3pg/mL至约30pg/mL、约3pg/mL至约25pg/mL、约3pg/mL至约20pg/mL、约3pg/mL至约15pg/mL、约3pg/mL至约10pg/mL、约3pg/mL至约9pg/mL、约3pg/mL至约8pg/mL、约3pg/mL至约7pg/mL、约3pg/mL至约6pg/mL、约3pg/mL至约5pg/mL、约3pg/mL至约4pg/mL、约4pg/mL至约50pg/mL、约4pg/mL至约45pg/mL、约4pg/mL至约40pg/mL、约4pg/mL至约35pg/mL、约4pg/mL至约30pg/mL、约4pg/mL至约25pg/mL、约4pg/mL至约20pg/mL、约4pg/

mL至约15pg/mL、约4pg/mL至约10pg/mL、约4pg/mL至约9pg/mL、约4pg/mL至约8pg/mL、约4pg/mL至约7pg/mL、约4pg/mL至约6pg/mL、约4pg/mL至约5pg/mL、约5pg/mL至约50pg/mL、约5pg/mL至约45pg/mL、约5pg/mL至约40pg/mL、约5pg/mL至约35pg/mL、约5pg/mL至约30pg/mL、约5pg/mL至约25pg/mL、约5pg/mL至约20pg/mL、约5pg/mL至约15pg/mL、约5pg/mL至约10pg/mL、约5pg/mL至约9pg/mL、约5pg/mL至约8pg/mL、约5pg/mL至约7pg/mL、约5pg/mL至约6pg/mL、约6pg/mL至约50pg/mL、约6pg/mL至约45pg/mL、约6pg/mL至约40pg/mL、约6pg/mL至约35pg/mL、约6pg/mL至约30pg/mL、约6pg/mL至约25pg/mL、约6pg/mL至约20pg/mL、约6pg/mL至约15pg/mL、约6pg/mL至约10pg/mL、约6pg/mL至约9pg/mL、约6pg/mL至约8pg/mL、约6pg/mL至约7pg/mL、约7pg/mL至约50pg/mL、约7pg/mL至约45pg/mL、约7pg/mL至约40pg/mL、约7pg/mL至约35pg/mL、约7pg/mL至约30pg/mL、约7pg/mL至约25pg/mL、约7pg/mL至约20pg/mL、约7pg/mL至约15pg/mL、约7pg/mL至约10pg/mL、约7pg/mL至约9pg/mL、约7pg/mL至约8pg/mL、约8pg/mL至约50pg/mL、约8pg/mL至约45pg/mL、约8pg/mL至约40pg/mL、约8pg/mL至约35pg/mL、约8pg/mL至约30pg/mL、约8pg/mL至约25pg/mL、约8pg/mL至约20pg/mL、约8pg/mL至约15pg/mL、约8pg/mL至约10pg/mL、约8pg/mL至约9pg/mL、约9pg/mL至约50pg/mL、约9pg/mL至约45pg/mL、约9pg/mL至约40pg/mL、约9pg/mL至约35pg/mL、约9pg/mL至约30pg/mL、约9pg/mL至约25pg/mL、约9pg/mL至约20pg/mL、约9pg/mL至约15pg/mL、约9pg/mL至约10pg/mL、约10pg/mL至约50pg/mL、约10pg/mL至约45pg/mL、约10pg/mL至约40pg/mL、约10pg/mL至约35pg/mL、约10pg/mL至约30pg/mL、约10pg/mL至约25pg/mL、约10pg/mL至约20pg/mL、约10pg/mL至约15pg/mL、约20pg/mL至约50pg/mL、约20pg/mL至约45pg/mL、约20pg/mL至约40pg/mL、约20pg/mL至约35pg/mL、约20pg/mL至约30pg/mL、或约20pg/mL至约25pg/mL。在一些实施方式中，cTnI的绝对量可以为至少约0.5pg/mL、至少约1.0pg/mL、至少约1.5pg/mL、至少约2.0pg/mL、至少约2.5pg/mL、至少约3.0pg/mL、至少约4.0pg/mL、至少约5.0pg/mL、至少约6.0pg/mL、至少约7.0pg/mL、至少约8.0pg/mL、至少约9.0pg/mL、至少约10pg/mL、至少约15pg/mL、至少约20pg/mL、至少约25pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL或至少约50pg/mL。

[0291] 在一些实施方式中，早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的绝对量可以在约5pg/mL至约1000pg/mL之间。在一些实施方式中，绝对量可以在至少约5pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约

25pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约25pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约300pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约400pg/mL至约750pg/mL之间、或在至少约400pg/mL至约500pg/mL之间。在一些实施方式中,绝对量可以为至少约5pg/mL、至少约6pg/mL、至少约7pg/mL、至少约8pg/mL、至少约9pg/mL、至少约10pg/mL、至少约11pg/mL、至少约12pg/mL、至少约13pg/mL、至少约14pg/mL、至少约15pg/mL、至少约16pg/mL、至少约17pg/mL、至少约18pg/mL、至少约19pg/mL、至少约20pg/mL、至少约21pg/mL、至少约22pg/mL、至少约23pg/mL、至少约24pg/mL、至少约25pg/mL、至少约26pg/mL、至少约27pg/mL、至少约28pg/mL、至少约29pg/mL、至少约30pg/mL、至少约35pg/mL、至少约40pg/mL、至少约45pg/mL、至少约50pg/mL、至少约55pg/mL、至少约60pg/mL、至少约65pg/mL、至少约70pg/mL、至少约75pg/mL、至少约80pg/mL、至少约85pg/mL、至少约90pg/mL、至少约95pg/mL、至少约100pg/mL、至少约110pg/mL、至少约120pg/mL、至少约129pg/mL、至少约130pg/mL、至少约140pg/mL、至少约150pg/mL、至少约200pg/mL、至少约250pg/mL、至少约300pg/mL、至少约350pg/mL、至少约400pg/mL、至少约450pg/mL、至少约500pg/mL、至少约550pg/mL、至少约600pg/mL、至少约650pg/mL、至少约700pg/mL、至少约750pg/mL、至少约800pg/mL、至少约900pg/mL或至少约1000pg/mL。

[0292] 为了进行上述方法,本领域技术人员(例如医师)将理解并且知晓如何进行额外测试以便检测或评估其它合并症(例如除TBI以外的其它疾病、病症、或病状)。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0293] 在一个实施方式中,为了证实本文所述方法中cTnI量或水平的变化可归因于受试者的头部损伤或疑似头部损伤而非急性心脏综合征(诸如心肌梗塞、心力衰竭等)的结果,医师或其它保健提供者可以执行或进行一种或多种额外测试或程序以证实不存在急性心脏综合征。这种额外测试或程序包括以下中的一种或多种:心电图、全血细胞(CBC)计数、综合代谢检查、脂质特征(例如测定HDL、LDL、三甘油酯等)、血管造影、用于检测或确定c反应蛋白(CRP)、脑钠肽、血浆神经酰胺中一种或多种的水平的一种或多种测试等。

[0294] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被确定为患有TBI的人类受试者,如下所述。在一些实施方式中,所述方法进一步包括如下所述监测被确定为患有TBI的人类受试者。在一些实施方式中,该方法进一步包括要求额外的测试以获得关于创伤性脑损伤的进一步临床信息。在一些实施方式中,该方法包括用保护心脏的心肌

保护治疗治疗被评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度脑损伤的人类受试者,如下所述。

[0295] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如像免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。这类测定法在本文的第8-12章节中进一步详细描述。

[0296] 6. 用心肌保护疗法治疗患有创伤性脑损伤的人类受试者的方法

[0297] 除了其它方法,本公开涉及一种用于治疗患有或疑似患有创伤性脑损伤的人类受试者的方法。在创伤性脑损伤(TBI)的急性期出现心肌损伤可能促进不良的TBI结果。因此,施用一种或多种心肌保护疗法或治疗剂(例如改善心脏的疗法)可能改善TBI结果并且可以用于本文所述的方法中。这些心肌保护疗法可以单独施用而无任何其它治疗剂。可选地,这些心肌保护疗法可以与经施用以治疗TBI的其它治疗剂,诸如下文第7章中公开的那些组合施用。

[0298] 具体地,涉及一种或多种心肌保护疗法或治疗剂的本公开的方法包括:a)对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内取自人类受试者的样品进行测定以测量或检测心肌肌钙蛋白I的水平,其中所述样品是生物样品;并且b)如果样品中心肌肌钙蛋白I的水平高于心肌肌钙蛋白I的参考水平,则向受试者提供心肌保护疗法或治疗剂。在一些实施方式中,心肌保护疗法任选地可以包括施用一种或多种 β 阻断剂、利尿剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、钙通道阻滞剂、脂质降低疗法、斯达汀(也称为3-羟基-3-甲基戊二酰基辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂)、硝酸盐、抗血小板药、抗凝血剂、抗凝剂等,诸如本领域中已知。施用这类心肌保护疗法和治疗剂的性质、量和时序也是本领域已知的。

[0299] 在一些实施方式中,样品可以在疑似头部损伤约0分钟内、约1分钟内、约2分钟内、约3分钟内、约4分钟内、约5分钟内、约6分钟内、约7分钟内、约8分钟内、约9分钟内、约10分钟内、约11分钟内、约12分钟内、约13分钟内、约14分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内获自或取自受试者。

[0300] 通常,cTnI的参考水平也可以用作基准,针对该基准评估在测定测试样品的cTnI之后获得的结果。通常,在进行这种比较时,cTnI的参考水平通过以下获得:以足够次数且在适当条件下运行特定测定法以使得可以将分析物存在性、量或浓度与TBI的特定阶段或终点或与特定标志进行相联系或关联。通常,用对参考受试者(或受试者群体)的测定来获得cTnI的参考水平。所测量的cTnI可以包括其片段、其降解产物和/或其酶促裂解产物。

[0301] 在一些实施方式中,该方法可以包括从受试者获得样品并且使样品与心肌肌钙蛋白I的抗体接触以允许形成抗体和心肌肌钙蛋白I的复合物。所述方法还包括检测所得的抗体-心肌肌钙蛋白I复合物。

[0302] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如像免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、免疫印迹分析、或蛋白质

免疫染色法、或光谱法,诸如高效液相色谱法 (HPLC) 或液体色谱-质谱法 (LC/MS)。这类测定法在本文的第8-12章节中进一步详细描述。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。例如,临床化学形式可以包括涉及一种抗体或不涉及抗体的测定法。可以用于临床化学格式的分析仪的实例描述于美国专利公开号2016/0320422和2015/0112630中。

[0303] 7. 治疗和监测罹患创伤性脑损伤的受试者

[0304] 可以治疗或监测在上述方法中被鉴定或评估为患有创伤性脑损伤,诸如轻度创伤性脑损伤或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗(诸如本领域已知的任何治疗)治疗被评估为患有创伤性脑损伤的人类受试者。例如,创伤性脑损伤的治疗可以采取多种形式,这取决于头部损伤的严重性。例如,对于罹患轻度TBI的受试者,治疗可以包括休息、避免体力活动(诸如运动)、避开光或在外出时戴太阳镜、施用一种或多种治疗剂(用于缓解头痛或偏头痛的药物、抗-恶心药物等)中的一种或多种。对罹患中度、重度或中度至重度TBI的患者的治疗可以包括施用一种或多种适当的治疗剂(诸如像利尿剂、抗惊厥药物、用于镇静以及将个体置于药物诱导的昏迷中的药物、或其它制药或生物制药药物(已知用于或未来开发用于治疗TBI的)、一种或多种手术程序(诸如像去除血肿、修复颅骨骨折、减压颅骨切除术等)、保护气道、和一种或多种疗法(诸如像一次或多次康复、物理疗法、职业疗法、认知行为疗法、愤怒管理、咨询心理学等)。在一些实施方式中,所述方法进一步包括监测被评估为患有创伤性脑损伤(例如轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性)的人类受试者。在一些实施方式中,可以用CT扫描或MRI监测被鉴定为患有创伤性脑损伤,诸如轻度创伤性脑损伤或重度创伤性脑损伤的受试者。用于本文所述的轻度或中度、重度、或中度至重度TBI的治疗可以联合第6章中所述的一种或多种心肌保护疗法或治疗剂施用。

[0305] 8. 用于测量cTnI水平的方法

[0306] 在上文所述的方法中,cTnI水平可以通过任何手段测量,所述手段诸如抗体依赖性方法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析法、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法 (HPLC) 或液体色谱-质谱法 (LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。

[0307] 在一些实施方式中,测量cTnI的水平包括使样品与第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是捕获抗体,并且第二特异性结合成员是检测抗体。在一些实施方式中,测量cTnI的水平包括使样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1) 捕获抗体(例如cTnI捕获抗体),其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成捕获抗体-cTnI抗原复合物(例如cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物),和(2) 检测抗体(例如cTnI检测抗体),其包括可检测标记并且结合cTnI上未被捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-检测抗体复合物(例如cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物),使得形成捕获抗体-cTnI抗原-检测抗体复合物(例如cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物),以及基于通过捕获抗体-cTnI抗原-检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中cTnI的量或浓度。

[0308] 在一些实施方式中,将第一特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施

方式中,将第二特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是如下所述的cTnI抗体。

[0309] 在一些实施方式中,样品是经稀释的或未经稀释的。样品可以为约1至约25微升、约1至约24微升、约1至约23微升、约1至约22微升、约1至约21微升、约1至约20微升、约1至约18微升、约1至约17微升、约1至约16微升、约15微升或约1微升、约2微升、约3微升、约4微升、约5微升、约6微升、约7微升、约8微升、约9微升、约10微升、约11微升、约12微升、约13微升、约14微升、约15微升、约16微升、约17微升、约18微升、约19微升、约20微升、约21微升、约22微升、约23微升、约24微升或约25微升。在一些实施方式中,样品为约1至约150微升或更少或约1至约25微升或更少。

[0310] 除定点照护装置外的一些仪器(诸如Abbott Laboratories仪器ARCHITECT®和其它核心实验室仪器)可能能够测量在10%CV下在约0.032 μ g/L下或更低的样品中cTnI的水平。

[0311] 其它检测方法包括使用纳米孔装置或纳米井装置或可以适于在纳米孔装置或纳米井装置上使用。纳米孔装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161402中,其据此通过引用整体并入。纳米井装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161400中,其据此通过引用整体并入。

[0312] 9. 用于测量UCH-L1水平的方法

[0313] 在上文所述的方法中,UCH-L1水平可以通过任何手段测量,所述手段诸如抗体依赖性方法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析、蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。

[0314] 在一些实施方式中,测量UCH-L1的水平包括使样品与第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是捕获抗体,并且第二特异性结合成员是检测抗体。在一些实施方式中,测量UCH-L1的水平包括使样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1)捕获抗体(例如UCH-L1捕获抗体),其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成捕获抗体-UCH-L1抗原复合物(例如UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物),和(2)检测抗体(例如UCH-L1检测抗体),其包括可检测标记并且结合UCH-L1上未被捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-检测抗体复合物(例如UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物),使得形成捕获抗体-UCH-L1抗原-检测抗体复合物(例如UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物),以及基于通过捕获抗体-UCH-L1抗原-检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中UCH-L1的量或浓度。

[0315] 在一些实施方式中,将第一特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,将第二特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是如下所述的UCH-L1抗体。

[0316] 在一些实施方式中,样品是经稀释的或未经稀释的。样品可以为约1至约25微升、约1至约24微升、约1至约23微升、约1至约22微升、约1至约21微升、约1至约20微升、约1至约18微升、约1至约17微升、约1至约16微升、约15微升或约1微升、约2微升、约3微升、约4微升、约5微升、约6微升、约7微升、约8微升、约9微升、约10微升、约11微升、约12微升、约13微升、

约14微升、约15微升、约16微升、约17微升、约18微升、约19微升、约20微升、约21微升、约22微升、约23微升、约24微升或约25微升。在一些实施方式中,样品为约1至约150微升或更少或约1至约25微升或更少。

[0317] 除定点照护装置外的一些仪器(诸如Abbott Laboratories仪器ARCHITECT®和其它核心实验室仪器)可能能够测量样品中高于或大于25000pg/mL的UCH-L1水平。

[0318] 其它检测方法包括使用纳米孔装置或纳米井装置或可以适于在纳米孔装置或纳米井装置上使用。纳米孔装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161402中,其据此通过引用整体并入。纳米井装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161400中,其据此通过引用整体并入。

[0319] 10. 用于测量GFAP水平的方法

[0320] 在上文所述的方法中,GFAP水平可以通过任何手段测量,所述手段诸如抗体依赖性方法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。

[0321] 在一些实施方式中,测量GFAP的水平包括使样品与第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是捕获抗体,并且第二特异性结合成员是检测抗体。在一些实施方式中,测量GFAP的水平包括使样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1) 捕获抗体(例如GFAP捕获抗体),其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成捕获抗体-GFAP抗原复合物(例如GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物),和(2) 检测抗体(例如GFAP检测抗体),其包括可检测标记并且结合GFAP上未被捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-检测抗体复合物(例如GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物),使得形成捕获抗体-GFAP抗原-检测抗体复合物(例如GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物),以及基于通过捕获抗体-GFAP抗原-检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中GFAP的量或浓度。

[0322] 在一些实施方式中,将第一特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,将第二特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是如下所述的GFAP抗体。

[0323] 在一些实施方式中,样品是经稀释的或未经稀释的。样品可以为约1至约25微升、约1至约24微升、约1至约23微升、约1至约22微升、约1至约21微升、约1至约20微升、约1至约18微升、约1至约17微升、约1至约16微升、约15微升或约1微升、约2微升、约3微升、约4微升、约5微升、约6微升、约7微升、约8微升、约9微升、约10微升、约11微升、约12微升、约13微升、约14微升、约15微升、约16微升、约17微升、约18微升、约19微升、约20微升、约21微升、约22微升、约23微升、约24微升或约25微升。在一些实施方式中,样品为约1至约150微升或更少或约1至约25微升或更少。

[0324] 除定点照护装置外的一些仪器(诸如Abbott Laboratories仪器ARCHITECT®和其它核心实验室仪器)可能能够测量样品中高于或大于25000pg/mL的GFAP水平。

[0325] 其它检测方法包括使用纳米孔装置或纳米井装置或可以适于在纳米孔装置或纳米井装置上使用。纳米孔装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161402中,其据此通

过引用整体并入。纳米井装置的实例描述于国际专利公开号WO 2016/161400中,其据此通过引用整体并入。

[0326] 11. 抗体

[0327] 本文所述的方法可以使用特异性结合于心肌肌钙蛋白I (cTnI) 的分离抗体和/或特异性结合于不是cTnI的早期生物标记物的分离抗体,所述早期生物标记物诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合。

[0328] a. 心肌肌钙蛋白I抗

[0329] 本文所述的方法可以使用特异性结合于心肌肌钙蛋白I (或其片段) 的分离抗体,称为“心肌肌钙蛋白I抗体”。心肌肌钙蛋白I抗体可以用于评估作为创伤性脑损伤的量的心肌肌钙蛋白I状态、检测生物样品中心肌肌钙蛋白I的存在、定量生物样品中存在的心肌肌钙蛋白I的量、或检测生物样品中心肌肌钙蛋白I的存在并定量其量。

[0330] (1) 人类心肌肌钙蛋白I (cTnI)

[0331] 人类心肌肌钙蛋白I (cTnI) 以及肌钙蛋白T (TnT) 和肌钙蛋白C (TnC) 是形成横纹肌的细肌丝的肌钙蛋白复合物的3种亚基。心肌肌钙蛋白I是抑制性亚基;阻断肌动蛋白-肌球蛋白相互作用并且进而介导横纹肌松弛。cTnI亚家族含有三种基因:cTnI-骨骼-快速颤搐、cTnI-骨骼-慢速颤搐和cTnI-心肌。此基因编码cTnI-心肌蛋白并且专门在心肌肌肉组织中表达。

[0332] 人类心肌肌钙蛋白I可以具有以下氨基酸序列:

[0333] MADGSSDAAR EPRPAPAPIR RRSSNYRAYA TEPHAKKSK ISASRKLQK TLLLQIAKQE LEREAERRG EKGRALSTRC QPLELAGLGF AELQDLRQL HARVDKVDDEE RYDIEAKVTK NITEIADLTQ KIFDLRGKFK RPTLRRVRIS ADAMMQALLG ARAKESLDLR AHLKQVKKED TEKENREVDG WRKNIDALSG MEGRKKKFES (SEQ ID NO:1)。

[0334] 人类心肌肌钙蛋白I可以为SEQ ID NO:1的片段或变体。心肌肌钙蛋白I的片段的长度可以是在5与210个氨基酸之间、10与210个氨基酸之间、50与210个氨基酸之间、60与210个氨基酸之间、65与210个氨基酸之间、100与210个氨基酸之间、150与210个氨基酸之间、100与210个氨基酸之间或175与210个氨基酸之间。片段可以包含来自SEQ ID NO:1的多个连续氨基酸。

[0335] (2) 心肌肌钙蛋白I识别抗体

[0336] 抗体是与心肌肌钙蛋白I、其片段、心肌肌钙蛋白I的表位或其变体结合的抗体。抗体可以是抗心肌肌钙蛋白I抗体的片段或其变体或衍生物。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体、完全人抗体或抗体片段 (诸如Fab片段), 或其混合物。抗体片段或衍生物可以包含F(ab')₂、Fv或scFv片段。抗体衍生物可以通过模拟肽产生。此外,描述用于产生单链抗体的技术可以适用于产生单链抗体。

[0337] 抗心肌肌钙蛋白I抗体可以是嵌合抗心肌肌钙蛋白I或人源化抗心肌肌钙蛋白I抗体。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体都是单价的。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体均包含与Fc区连接的单个Fab区。

[0338] 人抗体可以源自噬菌体展示技术或源自表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。人抗体可以作为人体内免疫应答的结果产生并且被分离。参见例如Funaro等人, BMC

Biotechnology, 2008 (8) :85。因此,抗体可以是人而非动物谱系的产物。因为它是人源性的,所以可以最小化对自身抗原反应的风险。可选地,标准酵母展示文库和展示技术可用于选择和分离人抗心肌钙蛋白I抗体。例如,初始人单链可变片段(scFv)的文库可以用于选择人抗心肌钙蛋白I抗体。转基因动物可以用于表达人抗体。

[0339] 人源化抗体可以是结合所需抗原的来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0340] 所述抗体与已知抗体的区别在于它具有与本领域中已知的抗体不同的生物学功能。

[0341] i. 表位

[0342] 抗体可以免疫特异性结合于人类心肌钙蛋白I (SEQ ID NO:1)、其片段或其变体。抗体可以免疫特异性识别并结合表位区域内的至少三个氨基酸、至少四个氨基酸、至少五个氨基酸、至少六个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸或至少十个氨基酸。抗体可以免疫特异性识别并结合这样的表位,所述表位具有表位区域的至少三个连续氨基酸、至少四个连续氨基酸、至少五个连续氨基酸、至少六个连续氨基酸、至少七个连续氨基酸、至少八个连续氨基酸、至少九个连续氨基酸或至少十个连续氨基酸。

[0343] (3) 抗心肌钙蛋白I抗体

[0344] 可以使用上述技术以及使用本领域中已知的常规技术产生抗心肌钙蛋白I抗体。在一些实施方式中,抗心肌钙蛋白I抗体可以是未缀合的心肌钙蛋白I抗体,诸如可购自以下的心肌钙蛋白I抗体:Abcam (诸如抗心肌钙蛋白I抗体(ab47003))、ThermoFisher (诸如心肌钙蛋白I单克隆抗体(12F10)、心肌钙蛋白I多克隆抗体、心肌钙蛋白I抗体(1HCLC)、ABFINITY™免寡克隆心肌钙蛋白I抗体(1H11L19)、ABFINITY™免单克隆)、Santa Cruz (诸如心肌钙蛋白I抗体(C-4) (目录号sc-133117)、心肌钙蛋白I抗体(4) (目录号sc-130351)、心肌钙蛋白I抗体(12) (目录号sc-130350)、心肌钙蛋白I抗体(H-170) (目录号sc-15368)、心肌钙蛋白I抗体(C-19) (目录号sc-8118)、心肌钙蛋白I-C抗体(G-11) (目录号sc-376662)、心肌钙蛋白I-C抗体(M46) (目录号sc-52277)、心肌钙蛋白I-C抗体(10B11) (目录号sc-52266))和hytest (单克隆小鼠抗心肌钙蛋白I (目录号4T21))。

[0345] b. UCH-L1抗体

[0346] 本文所述的方法可以使用特异性结合于泛素羧基末端水解酶L1 (“UCH-L1”) (或其片段)的分离抗体,称为“UCH-L1抗体”。UCH-L1抗体可以用于评估作为创伤性脑损伤的量度的UCH-L1状态、检测样品中UCH-L1的存在、定量样品中存在的UCH-L1的量、或检测样品中UCH-L1的存在并定量其量。

[0347] (1) 泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)

[0348] 泛素羧基末端水解酶L1 (“UCH-L1”) 也称为“泛素C末端水解酶”,是去泛素化酶。UCH-L1是其产物水解泛素的小C末端加合物以产生泛素单体的基因家族的成员。UCH-L1的表达对神经元和弥漫性神经内分泌系统及其肿瘤的细胞具有高度特异性。它大量存在于所有神经元(占总脑蛋白的1%-2%)中,在神经元和睾丸/卵巢中特异性表达。UCH-L1的催化三联体含有在位置90的半胱氨酸、在位置176的天冬氨酸和在位置161的组氨酸,它们负责其水解酶活性。

[0349] 人类UCH-L1可具有以下氨基酸序列:

[0350] MQLKPMEINPEMLNKVLSRLGVAGQWRFDVVLGLEEESLGSVPAPACALLLPLTAQHENFRKKQIE
ELKGQEVSPKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDKLGFEDGSVLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIQAAHD
AVAQEQGQCRVDDKVNHFHILFNNDVGHLYELDGRMPFPVNHGASSEDLLKDKAAKVCREFTEREQGEVRFSAVALC
KAA (SEQ ID NO:2)。

[0351] 人类UCH-L1可以是SEQ ID NO:2的片段或变体。UCH-L1的片段的长度可以是在5与225个氨基酸之间、10与225个氨基酸之间、50与225个氨基酸之间、60与225个氨基酸之间、65与225个氨基酸之间、100与225个氨基酸之间、150与225个氨基酸之间、100与175个氨基酸之间或175与225个氨基酸之间。片段可以包含来自SEQ ID NO:2的多个连续氨基酸。

[0352] (2) UCH-L1识别抗体

[0353] 抗体是与UCH-L1、其片段、UCH-L1的表位或其变体结合的抗体。抗体可以是抗UCH-L1抗体的片段或其变体或衍生物。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体、完全人抗体或抗体片段(诸如Fab片段),或其混合物。抗体片段或衍生物可以包含F(ab')₂、Fv或scFv片段。抗体衍生物可以通过模拟肽产生。此外,描述用于产生单链抗体的技术可以适用于产生单链抗体。

[0354] 抗UCH-L1抗体可以是嵌合抗UCH-L1或人源化抗UCH-L1抗体。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体都是单价的。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体均包含与Fc区连接的单个Fab区。

[0355] 人抗体可以源自噬菌体展示技术或源自表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。人抗体可以作为人体内免疫应答的结果产生并且被分离。参见例如Funaro等人, BMC Biotechnology, 2008 (8):85。因此,抗体可以是人而非动物谱系的产物。因为它是人源性的,所以可以最小化对自身抗原反应的风险。可选地,标准酵母展示文库和展示技术可用于选择和分离人抗UCH-L1抗体。例如,天然人单链可变片段(scFv)的文库可用于选择人抗UCH-L1抗体。转基因动物可以用于表达人抗体。

[0356] 人源化抗体可以是结合所需抗原的来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0357] 所述抗体与已知抗体的区别在于它具有与本领域中已知的抗体不同的生物学功能。

[0358] i. 表位

[0359] 抗体可以免疫特异性结合于UCH-L1 (SEQ ID NO:2)、其片段或其变体。抗体可以免疫特异性识别并结合表位区域内的至少三个氨基酸、至少四个氨基酸、至少五个氨基酸、至少六个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸或至少十个氨基酸。抗体可以免疫特异性识别并结合这样的表位,所述表位具有表位区域的至少三个连续氨基酸、至少四个连续氨基酸、至少五个连续氨基酸、至少六个连续氨基酸、至少七个连续氨基酸、至少八个连续氨基酸、至少九个连续氨基酸或至少十个连续氨基酸。

[0360] (3) 抗UCH-L1抗体

[0361] 可以使用上述技术以及使用本领域中已知的常规技术产生抗UCH-L1抗体。在一些实施方式中,抗UCH-L1抗体可以是未缀合的UCH-L1抗体,诸如可从以下获得的UCH-L1抗体: United State Biological (目录号:031320)、Cell Signaling Technology (目录号:

3524)、Sigma-Aldrich(目录号:HPA005993)、Santa Cruz Biotechnology, Inc.(目录号:sc-58593或sc-58594)、R&D Systems(目录号:MAB6007)、Novus Biologicals(目录号:NB600-1160)、Biorbyt(目录号:orb33715)、Enzo Life Sciences, Inc.(目录号:ADI-905-520-1)、Bio-Rad(目录号:VMA00004)、BioVision(目录号:6130-50)、Abeam(目录号:ab75275或ab104938)、Invitrogen Antibodies(目录号480012)、ThermoFisher Scientific(目录号:MA1-46079、MA5-17235、MA1-90008或MA1-83428)、EMD Millipore(目录号:MABN48)或Sino Biological Inc.(目录号:50690-R011)。抗UCH-L1抗体可以与荧光团缀合,诸如可从BioVision(目录号:6960-25)或Aviva Systems Biology(目录号OAAF01904-FITC)获得的缀合的UCH-L1抗体。

[0362] c. GFAP抗体

[0363] 本文所述的方法可以使用特异性结合于胶质细胞原纤维酸性蛋白(“GFAP”) (或其片段) 的分离抗体,称为“GFAP抗体”。GFAP抗体可用于评估作为创伤性脑损伤的量的GFAP状态、检测样品中GFAP的存在、定量样品中存在的GFAP的量、或检测样品中GFAP的存在并定量其量。

[0364] (1) 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)

[0365] 胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)是一种50kDa的胞浆内丝状蛋白,构成星形胶质细胞中细胞骨架的一部分,它已被证明是星形细胞来源的最具特异性的标记物。GFAP蛋白质由人类中的GFAP基因编码。GFAP是成熟星形胶质细胞的主要中间丝。在分子的中央棒状结构域中,GFAP与其它中间丝共有大量结构同源性。GFAP通过为星形胶质细胞过程提供结构稳定性来参与星形胶质细胞的活动性和形状。胶质细胞原纤维酸性蛋白及其分解产物(GFAP-BDP)是在创伤性脑损伤(TBI)之后作为病理生理应答的一部分释放到血液中的脑特异性蛋白。在创伤、遗传病症或化学物质对人类CNS造成损伤之后,星形胶质细胞增殖并显示出广泛的细胞体和过程肥大,且GFAP明显上调。相比之下,随着星形胶质细胞恶性增加,存在GFAP产生的渐进损失。也可以在以下中检测到GFAP:施万细胞(Schwann cell)、肠胶质细胞、唾液腺赘生物、转移性肾癌、会厌软骨、垂体细胞、未成熟少突胶质细胞、乳头状脑膜瘤和乳腺肌上皮细胞。

[0366] 人类GFAP可具有以下氨基酸序列:

[0367] MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLGPGTRLSLARMPPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRAS
ERAEMMELNDRFASYIEKVRFLQKQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNL
AQDLATVRQKQLQDETNRLEAENLAAYRQEADATLARLDLKERKIESLEEEIRFLRKIHEEEVRELQEQLARQQV
HVELDVAKPDLTAALKEIRTQYEAMASSNMHEAEWYRSKFADLTDAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDL
ESLRGTNESLERQMQREERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEG
EENRITIPVQTFNSNLQIRETSLDTKSVSEGHKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDV(MSEQ ID NO:3)。

[0368] 人类GFAP可以是SEQ ID NO:3的片段或变体。GFAP的片段的长度可以在5与400个氨基酸之间、10与400个氨基酸之间、50与400个氨基酸之间、60与400个氨基酸之间、65与400个氨基酸之间、100与400个氨基酸之间、150与400个氨基酸之间、100与300个氨基酸之间或200与300个氨基酸之间。片段可以包含来自SEQ ID NO:3的多个连续氨基酸。SEQ ID NO:3的人类GFAP片段或变体可为GFAP分解产物(BDP)。GFAP BDP可为38kDa、42kDa(弱41kDa)、47kDa(弱45kDa);25kDa(弱23kDa);19kDa或20kDa。

[0369] (2)GFAP识别抗体

[0370] 抗体是与GFAP、其片段、GFAP的表位或其变体结合的抗体。抗体可以是抗GFAP抗体的片段或其变体或衍生物。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体、完全人抗体或抗体片段(诸如Fab片段),或其混合物。抗体片段或衍生物可以包含F(ab')₂、Fv或scFv片段。抗体衍生物可以通过模拟肽产生。此外,描述用于产生单链抗体的技术可以适用于产生单链抗体。

[0371] 抗GFAP抗体可以是嵌合抗GFAP或人源化抗GFAP抗体。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体都是单价的。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体均包含与Fc区连接的单个Fab区。

[0372] 人抗体可以源自噬菌体展示技术或源自表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。人抗体可以作为人体内免疫应答的结果产生并且被分离。参见例如Funaro等人,BMC Biotechnology,2008(8):85。因此,抗体可以是人而非动物谱系的产物。因为它是人源性的,所以可以最小化对自身抗原反应的风险。可选地,标准酵母展示文库和展示技术可用于选择和分离人抗GFAP抗体。例如,天然人单链可变片段(scFv)的文库可用于选择人抗GFAP抗体。转基因动物可以用于表达人抗体。

[0373] 人源化抗体可以是结合所需抗原的来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0374] 所述抗体与已知抗体的区别在于它具有与本领域中已知的抗体不同的生物学功能。

[0375] i.表位

[0376] 抗体可以免疫特异性结合GFAP(SEQ ID NO:3)、其片段或其变体。抗体可以免疫特异性识别并结合表位区域内的至少三个氨基酸、至少四个氨基酸、至少五个氨基酸、至少六个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸或至少十个氨基酸。抗体可以免疫特异性识别并结合这样的表位,所述表位具有表位区域的至少三个连续氨基酸、至少四个连续氨基酸、至少五个连续氨基酸、至少六个连续氨基酸、至少七个连续氨基酸、至少八个连续氨基酸、至少九个连续氨基酸或至少十个连续氨基酸。

[0377] (3)抗GFAP抗体

[0378] 可以使用上述技术以及使用本领域中已知的常规技术产生抗GFAP抗体。在一些实施方式中,抗GFAP抗体可为未缀合GFAP抗体,诸如可购自以下的GFAP抗体:Dako(目录号:M0761)、ThermoFisher Scientific(目录号:MA5-12023、A-21282、13-0300、MA1-19170、MA1-19395、MA5-15086、MA5-16367、MA1-35377、MA1-06701或MA1-20035)、AbCam(目录号:ab10062、ab4648、ab68428、ab33922、ab207165、ab190288、ab115898或ab21837)、EMD Millipore(目录号:FCMAB257P、MAB360、MAB3402、04-1031、04-1062、MAB5628)、Santa Cruz(目录号:sc-166481、sc-166458、sc-58766、sc-56395、sc-51908、sc-135921、sc-71143、sc-65343或sc-33673)、Sigma-Aldrich(目录号:G3893或G6171)或Sino Biological Inc.(目录号:100140-R012-50)。抗GFAP抗体可以与荧光团缀合,诸如可购自以下的缀合的GFAP抗体:ThermoFisher Scientific(目录号:A-21295或A-21294)、EMD Millipore(目录号:MAB3402X、MAB3402B、MAB3402B或MAB3402C3)或AbCam(目录号:ab49874或ab194325)。

[0379] d.抗体制备/产生

[0380] 抗体可以通过多种技术,包括本领域技术人员熟知的那些技术中的任一种制备。通常,抗体可以通过细胞培养技术产生,所述细胞培养技术包括经由常规技术或经由将抗体基因、重链和/或轻链转染到适合的细菌或哺乳动物细胞宿主中以允许产生抗体(其中抗体可以是重组的)来进行单克隆抗体的产生。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为这类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0381] 用于表达重组抗体的示范性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216-4220(1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol,159:601-621(1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0382] 宿主细胞也可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可以对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可以用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣抗原所必需的轻链和重链中的任一者或两者的DNA。所述抗体也涵盖由此类截短DNA分子表达的分子。此外,可以通过用标准化学交联方法使抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是抗体(即结合分析物,例如人肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)且另一重链和另一轻链对除分析物以外的抗原具有特异性。

[0383] 在用于重组表达抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体内,使抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至CMV增强子/AdMLP启动子调控元件以驱动基因高度转录。重组表达载体也携带DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选择的转化株宿主细胞以便允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中回收完整抗体。将标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞,并且从培养基中回收抗体。更进一步地,合成重组抗体的方法可以通过在适合培养基中培养宿主细胞,直到合成重组抗体进行。所述方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0384] 制备单克隆抗体的方法涉及制备能够产生具有所需特异性的抗体的永生细胞系。这类细胞系可以由从免疫动物获得的脾细胞产生。可以用分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)或其片段和/或变体免疫动物。用于免疫动物的肽可以包含编码人Fc(例如片段可结晶区)或人抗体的尾区的氨基酸。然后可以通过例如与骨髓瘤细胞融合配偶体的融合使脾细胞永生。可以采用多种融合技术。例如,可以将脾细胞和骨髓瘤细胞与非离子洗涤剂合并几分钟,并且然后以低密度接种在支持杂交细胞生长但不支持骨髓瘤细胞生长的选择性培养基上。一种这种技术使用次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷(HAT)选择。另一种技术包括电融合。在足够的时间,通常约1至2周之后,观察到杂交体的集落。选择单一集落并测试

其培养物上清液对多肽的结合活性。可以使用具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0385] 可以从生长的杂交瘤集落的上清液中分离单克隆抗体。此外,可以采用各种技术来提高产量,诸如将杂交瘤细胞系注射到适合的脊椎动物宿主(诸如小鼠)的腹膜腔中。然后可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。可以通过常规技术,诸如色谱法、凝胶过滤、沉淀和提取从抗体中除去污染物。亲和色谱法是在纯化抗体的过程中使用的方法的实例。

[0386] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先裂解IgG分子以产生数个片段,其中两个(F(ab)片段)各自包含包括完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够裂解IgG分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。

[0387] Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解裂解以及偶尔蛋白水解裂解IgG或IgA免疫球蛋白分子来产生。可以使用重组技术衍生Fv片段。Fv片段包括非共价VH::VL异二聚体,所述非共价VH::VL异二聚体包括保留了天然抗体分子的大量抗原识别能力和结合能力的抗原结合位点。

[0388] 抗体、抗体片段或衍生物可以包含分别插置在重链框架(“FR”)组和轻链框架(“FR”)组之间的重链互补决定区(“CDR”)组和轻链互补决定区(“CDR”)组,所述框架组为CDR提供支撑并限定CDR相对于彼此的空间关系。CDR组可能含有重链或轻链V区的三个高变区。

[0389] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它适合方法,包括但不限于从肽或蛋白质文库(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA、酵母等展示库)中选择重组抗体的方法;例如,如使用本领域中已知的方法可从各种商业供应商诸如Cambridge Antibody Technologies(Cambridgeshire,UK)、MorphoSys(Martinsreid/Planegg,Del.)、Biovation(Aberdeen,Scotland,UK)BioInvent(Lund,Sweden)获得的。参见美国专利号4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514、5,976,862。替代方法依赖于免疫能够产生人抗体谱系的转基因动物(例如SCID小鼠,Nguyen等人(1997)Microbiol.Immunol.41:901-907;Sandhu等人(1996)Crit.Rev.Biotechnol.16:95-118;Eren等人(1998)Immunol.93:154-161),如本领域中已知的和/或如本文所述的。这类技术包括但不限于核糖体展示(Hanes等人(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:4937-4942;Hanes等人(1998)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,95:14130-14135);单细胞抗体产生技术(例如选择淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利号5,627,052,Wen等人(1987)J.Immunol.17:887-892;Babcook等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:7843-7848);凝胶微滴和流式细胞术(Powell等人(1990)Biotechnol.8:333-337;One Cell Systems,(Cambridge,Mass).;Gray等人(1995)J.Imm.Meth.182:155-163;Kenny等人(1995)Bio/Technol.13:787-790);B细胞选择(Steenbakkers等人(1994)Molec.Biol.Reports 19:125-134(1994))。

[0390] 亲和力成熟抗体可以通过本领域中已知的多种程序中的任一种产生。例如,参见Marks等人,BioTechnology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机诱变由以下描述:Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:3809-3813(1994);Schier等人.,Gene,169:147-155(1995);Yelton等人,J.Immunol.,155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.,154(7):3310-3319(1995);Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992)。在选择性诱变位置和在接受

或超突变位置由活性增强氨基酸残基进行的选择性突变描述于美国专利号6,914,128B1。

[0391] 抗体变体还可以使用以下制备:将编码抗体的多核苷酸递送至适合的宿主,诸如以提供在其乳汁中产生这类抗体的转基因动物或哺乳动物,诸如山羊、牛、马、绵羊等来制备。这些方法在本领域中是已知的并且例如描述于美国专利号5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362和5,304,489中。

[0392] 抗体变体也可以通过以下制备:递送多核苷酸以提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍),它们在植物部分或由其培养的细胞中产生这类抗体、特定部分或变体。例如,Cramer等人(1999)Curr.Top.Microbiol.Immunol 240:95-118和其中引用的参考文献描述了例如使用诱导型启动子产生表达大量重组蛋白的转基因烟草叶。转基因玉米已经用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物活性与在其它重组系统中产生的或从天然来源纯化的那些相当。参见例如Hood等人,Adv.Exp.Med.Biol.(1999)464:127-147和其中引用的参考文献。抗体变体也已经由包括抗体片段,诸如单链抗体(scFv)的转基因植物种子,包括烟草种子和马铃薯块茎大量产生。参见,例如Conrad等人(1998)Plant Mol.Biol.38:101-109和其中引用的参考文献。因此,根据已知方法,也可以使用转基因植物产生抗体。

[0393] 可以例如通过添加外源性序列来修饰免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、缔合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其它适合的特征来产生抗体衍生物。通常,保持非人或人CDR序列的一部分或全部,同时用人或其它氨基酸替换可变区和恒定区的非人序列。

[0394] 小抗体片段可以是具有两个抗原结合位点的双体,其中片段包含于同一多肽链(VH VL)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。参见例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448。通过使用太短而不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。还参见授予Chen等人的美国专利号6,632,926,其通过引用整体并入本文,并且公开了抗体变体,所述抗体变体具有一个或多个插入到亲本抗体的高变区中的氨基酸并且对靶抗原的结合亲和力比亲本抗体对抗原的结合亲和力强至少约2倍。

[0395] 抗体可以是线性抗体。用于制备线性抗体的程序在本领域中是已知的并描述于Zapata等人,(1995)Protein Eng.8(10):1057-1062。简而言之,这些抗体包含一对串联Fd片段(VH-CH1-VH-CH1),所述片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0396] 可以通过已知方法从重组细胞培养物中回收和纯化抗体,所述已知方法包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法。高效液相色谱法("HPLC")也可以用于纯化。

[0397] 可检测地标记抗体可能是有用的。用于将抗体缀合至这些试剂的方法在本领域中是已知的。仅出于说明的目的,可以用可检测部分,诸如放射性原子、发色团、荧光团等标记抗体。这类标记的抗体可以在体内或在分离的测试样品中用于诊断技术。它们可以与细胞因子、配体、另一种抗体连接。用于偶联抗体以实现抗肿瘤作用的适合试剂包括细胞因子,

诸如白介素2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子 (TNF); 用于光动力疗法中的光敏剂, 包括酞菁四磺酸铝 (III)、血卟啉和酞菁; 放射性核素, 诸如碘-131 (131I)、钇-90 (90Y)、铋-212 (212Bi)、铋-213 (213Bi)、锝-99m (99mTc)、铼-186 (186Re) 和铼-188 (188Re); 抗生素, 诸如多柔比星、阿霉素、柔红霉素、甲氨蝶呤、道诺霉素、新抑癌素和卡铂; 细菌、植物和其它毒素, 诸如白喉毒素、假单胞菌外毒素A、葡萄球菌肠毒素A、相思豆毒素蛋白-A毒素、蓖麻毒素A (去糖基化蓖麻毒素A和天然蓖麻毒素A)、TGF- α 毒素、来自中华眼镜蛇 (*naja naja atra*) 的细胞毒素和白树毒素 (一种植物毒素); 来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白, 诸如局限曲菌素 (一种由局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 产生的核糖体失活蛋白)、皂草素 (一种来自石碱草 (*Saponaria officinalis*) 的核糖体失活蛋白) 和RNA酶; 酪氨酸激酶抑制剂; ly207702 (二氟化嘌呤核苷); 含有反囊性剂的脂质体 (例如, 反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等); 和其它抗体或抗体片段, 诸如F(ab)。

[0398] 经由使用杂交瘤技术、选择淋巴细胞抗体方法 (SLAM)、转基因动物和重组抗体文库进行的抗体产生在下文更详细地描述。

[0399] (1) 使用杂交瘤技术的抗分析物单克隆抗体

[0400] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术 (包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术或其组合) 来制备。例如, 可以使用杂交瘤技术产生单克隆抗体, 所述杂交瘤技术包括本领域中已知的并且例如在以下中教导的那些: Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第二版, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling等人, *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, N.Y., 1981)。还应注意, 如本文所用的术语“单克隆抗体”并不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自单一克隆的抗体, 包括任何真核生物、原核生物或噬菌体克隆, 而不是指产生所述抗体的方法。

[0401] 产生单克隆抗体的方法以及由所述方法产生的抗体可以包含培养分泌本公开的抗体的杂交瘤细胞, 其中优选地, 杂交瘤通过以下产生: 将从用分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 免疫的动物, 例如大鼠或小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 并且然后筛选由融合产生的杂交瘤中分泌能够结合本公开的多肽的抗体的杂交瘤克隆。简而言之, 大鼠可以用分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 抗原免疫。在优选的实施方式中, 将分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 抗原与佐剂一起施用以刺激免疫应答。这类佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI (胞壁酰二肽) 或 ISCOM (免疫刺激复合物)。这类佐剂可以通过将多肽隔离在局部储库中来保护多肽免于快速分散, 或者它们可以含有刺激宿主分泌对巨噬细胞和免疫系统的其它组分具有趋化性的因子的物质。优选地, 如果正在施用多肽, 则免疫程序将涉及多肽的两次或更多次施用, 散布于数周内; 然而, 也可以使用多肽的单次施用。

[0402] 在用分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 抗原免疫动物之后, 可以从动物获得抗体和/或产生抗体的细胞。通过将动物放血或处死, 从动物获得含有抗分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 抗体的血清。可以按从动物获得的原样使用血清, 可以从血清中获得免疫球蛋白部分, 或者可以从血清中纯化抗分析物 (例如心肌钙蛋白 I、UCH-L1 或 GFAP) 抗体。以这种方式获得的血清或免疫球蛋白是多克隆的, 因此具有异质的一系列特性。

[0403] 一旦检测到免疫应答,例如,在大鼠血清中检测到对抗原分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)具有特异性的抗体,就收获大鼠脾并且分离脾细胞。然后通过熟知的技术使脾细胞与任何适合的骨髓瘤细胞(例如来自可从American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., US)获得的细胞系SP20的细胞)融合。通过限制稀释法选择和克隆杂交瘤。然后通过本领域中已知的方法测定杂交瘤克隆中分泌能够结合分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的抗体的细胞。可以通过用阳性杂交瘤克隆免疫大鼠来产生通常含有高水平抗体的腹水。

[0404] 在另一个实施方式中,产生抗体的永生化杂交瘤可以从免疫化动物制备。在免疫之后,将动物处死并且将脾B细胞按本领域熟知的那样融合至永生化骨髓瘤细胞。参见例如Harlow和Lane,同上。在优选的实施方式中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。在融合和抗生素选择之后,使用分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)、或其部分、或表达分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的细胞筛选杂交瘤。在优选的实施方式中,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA),优选ELISA进行初始筛选。PCT公开号W0 00/37504中提供了ELISA筛选的实例。

[0405] 选择产生抗分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)抗体的杂交瘤、将其克隆并且进一步针对所需特征,包括稳健的杂交瘤生长、高抗体产量和所需的抗体特征进行筛选。杂交瘤可以在同系动物、缺乏免疫系统的动物(例如裸鼠)中体内培养和扩增,或者在细胞培养物中体外培养和扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法是本领域普通技术人员所熟知的。

[0406] 在优选的实施方式中,杂交瘤是大鼠杂交瘤。在另一个实施方式中,杂交瘤在非人、非大鼠物种,诸如小鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中产生。在又一个优选的实施方式中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌性骨髓瘤与表达抗分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)抗体的人细胞融合。

[0407] 可以通过已知技术产生识别特定表位的抗体片段。例如,可以通过使用酶(诸如木瓜蛋白酶(以产生两个相同的Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段))对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生本公开的Fab和F(ab')₂片段。IgG分子的F(ab')₂片段保留了较大(“亲本”)IgG分子的两个抗原结合位点,所述IgG分子包括两个轻链(含有可变轻链区和恒定轻链区)、重链的CH1结构域、和亲本IgG分子的形成二硫键的铰链区。因此,F(ab')₂片段仍然能够交联抗原分子,如亲本IgG分子。

[0408] (2) 使用SLAM的抗分析物单克隆抗体

[0409] 在本公开的另一个方面,使用本领域中称为选择淋巴细胞抗体方法(SLAM)的方法,从单一、分离的淋巴细胞产生重组抗体,如美国专利号5,627,052;PCT公开号W0 92/02551;和Babcook等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:7843-7848(1996)中所述。在此方法中,使用抗原特异性溶血空斑测定法筛选分泌感兴趣抗体的单细胞,例如源自任一只免疫动物的淋巴细胞,其中使用接头(诸如生物素)将抗原分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)、分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的亚基或其片段与绵羊红细胞偶联,并且用于鉴定分泌对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)具有特异性的抗体的单细胞。在鉴定感兴趣抗体分泌细胞后,通过逆转录酶-PCR(RT-PCR)从细胞中挽救重链和轻链可变区cDNA,并且然后这些可变区可以在哺乳动物宿主细胞,诸如COS或CHO细胞中、在适

当的免疫球蛋白恒定区(例如人恒定区)的背景下表达。源自体内选择的淋巴细胞、用扩增的免疫球蛋白序列转染的宿主细胞然后可以在体外进行进一步的分析和选择,例如,通过淘选转染的细胞以分离表达针对分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列可以进一步在体外操纵,诸如通过体外亲和力成熟方法。参见例如PCT公开号WO 97/29131和PCT公开号WO 00/56772。

[0410] (3) 使用转基因动物的抗分析物单克隆抗体

[0411] 在本公开的另一个实施方式中,通过用分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)抗原免疫包含一些或全部人免疫球蛋白基因座的非人动物来产生抗体。在一个实施方式中,非人动物是**XENOMOUSE®**转基因小鼠,一种包含人免疫球蛋白基因座的较大片段且缺乏小鼠抗体产生的工程化小鼠品系。参见例如Green等人,Nature Genetics,7:13-21(1994)和美国专利号5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598和6,130,364。还参见PCT公开号WO 91/10741、WO 94/02602、WO 96/34096、WO 96/33735、WO 98/16654、WO 98/24893、WO 98/50433、WO 99/45031、WO 99/53049、WO 00/09560和WO 00/37504。**XENOMOUSE®**转基因小鼠产生完全人抗体的成人样人谱系,并且产生抗原特异性人单克隆抗体。**XENOMOUSE®**转基因小鼠通过引入人重链基因座和 κ 轻链基因座的兆碱基大小的种系构型YAC片段而含有约80%的人抗体谱系。参见Mendez等人,Nature Genetics,15:146-156(1997);Green和Jakobovits,J.Exp.Med.,188:483-495(1998),其公开据此通过引用并入。

[0412] (4) 使用重组抗体文库的抗分析物单克隆抗体

[0413] 体外方法也可以用于制备本公开的抗体,其中筛选抗体文库以鉴定具有所需的分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)结合特异性的抗体。关于重组抗体文库的这种筛选的方法在本领域中是熟知的,且包括在以下中描述的方法:例如美国专利号5,223,409(Ladner等人);PCT公开号WO 92/18619(Kang等人);PCT公开号WO 91/17271(Dower等人);PCT公开号WO 92/20791(Winter等人);PCT公开号WO 92/15679(Markland等人);PCT公开号WO 93/01288(Breitling等人);PCT公开号WO 92/01047(McCafferty等人);PCT公开号WO 92/09690(Garrard等人);Fuchs等人,Bio/Technology,9:1369-1372(1991);Hay等人,Hum.Antibod.Hybridomas,3:81-85(1992);Huse等人.,Science,246:1275-1281(1989);McCafferty等人,Nature,348:552-554(1990);Griffiths等人.,EMBO J.,12:725-734(1993);Hawkins等人.,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992);Clackson等人.,Nature,352:624-628(1991);Gram等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:3576-3580(1992);Garrard等人.,Bio/Technology,9:1373-1377(1991);Hoogenboom等人.,Nucl.Acids Res.,19:4133-4137(1991);Barbas等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982(1991);美国专利申请公开号2003/0186374;和PCT公开号WO 97/29131,其各自内容通过引用并入本文。

[0414] 重组抗体文库可以来自用分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)、或分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的部分免疫的受试者。可选地,重组抗体文库可以来自初始受试者,即尚未用分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)免疫的受试者,诸如来自尚未用人分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)免疫的人受试者的人抗体文库。本公开的抗体通过以下选择:用包含肽的人分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)筛

选重组抗体文库以进而选择识别分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1、或GFAP)的那些抗体。用于进行这种筛选和选择的方法在本领域中是熟知的,诸如先前段落中的参考文献中所述。为选择对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)具有特定结合亲和力的本公开的抗体,诸如以特定 K_{off} 速率常数自分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP) I解离的那些抗体,可使用本领域中已知的表面等离子体共振方法来选择具有所需 K_{off} 速率常数的抗体。为选择对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)具有特定中和活性的本公开的抗体,诸如具有特定 IC_{50} 的那些抗体,可使用本领域中已知用于评估对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)活性的抑制的标准方法。

[0415] 在一个方面,本公开涉及一种结合人分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的分离抗体、或其抗原结合部分。优选地,抗体是中和抗体。在各种实施方式中,抗体是重组抗体或单克隆抗体。

[0416] 例如,也可以使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法来产生抗体。在噬菌体展示方法中,将功能性抗体结构域展示于携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。这种噬菌体可以用于展示自谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可以用抗原,例如使用标记的抗原或结合于或捕获于固体表面或珠粒的抗原来选择或鉴定表达结合感兴趣抗原的抗原结合结构域的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,其包括fd和M13结合结构域,由具有重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白质的Fab、Fv或二硫键稳定的Fv抗体结构域的噬菌体表达。可以用于制备抗体的噬菌体展示方法的实例包括在以下中公开的方法:Brinkmann等人, *J. Immunol. Methods*, 182:41-50 (1995); Ames等人, *J. Immunol. Methods*, 184:177-186 (1995); Kettleborough等人, *Eur. J. Immunol*, 24:952-958 (1994); Persic等人, *Gene*, 187:9-18 (1997); Burton等人, *Advances in Immunology*, 57:191-280 (1994); PCT公开号W0 92/01047; PCT公开号W0 90/02809; W0 91/10737; W0 92/01047; W0 92/18619; W0 93/11236; W0 95/15982; W0 95/20401; 和美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108。

[0417] 如上文参考文献中所述,在噬菌体选择之后,可以从噬菌体分离抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人抗体,或任何其它所需的抗原结合片段,并且在任何所需宿主中表达,所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如如下文详细描述。例如,也可以使用本领域中已知的方法来采用用于重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术,诸如以下中所公开的技术:PCT公开号W0 92/22324; Mullinax等人, *BioTechniques*, 12(6):864-869 (1992); Sawai等人, *Am. J. Reprod. Immunol*, 34:26-34 (1995); 和Better等人, *Science*, 240:1041-1043 (1988)。可以用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括美国专利号4,946,778和5,258,498; Huston等人, *Methods in Enzymology*, 203:46-88 (1991); Shu等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7995-7999 (1993); 和Skerra等人, *Science*, 240:1038-1041 (1988)中所述的技术。

[0418] 作为通过噬菌体展示来筛选重组抗体文库的替代方案,本领域中已知用于筛选大型组合文库的其它方法可以应用于鉴定本公开的抗体。如PCT公开号W0 98/31700 (Szostak和Roberts) 和Roberts和Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:12297-12302 (1997)中所

述,替代性表达系统的一种类型是重组抗体文库表达为RNA-蛋白质融合物的表达系统。在此系统中,通过在体外翻译于其3'末端处携带嘌呤霉素(一种肽基受体抗生素)的合成mRNA来在mRNA与其编码的肽或蛋白质之间产生共价融合物。因此,可以基于所编码的肽或蛋白质(例如抗体或其部分)的特性(诸如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合),自mRNA的复杂混合物(例如组合文库)富集特异性mRNA。可以通过如上所述的重组方式(例如在哺乳动物宿主细胞中)表达从筛选这类文库所回收的编码抗体或其部分的核酸序列,并且另外可以通过对突变已引入到最初选择的序列中的mRNA-肽融合物进行更多轮筛选或通过如上所述的用于重组抗体的体外亲和力成熟的其它方法来经受进一步亲和力成熟。该方法的优选实例是PROfusion展示技术。

[0419] 在另一种途径中,抗体也可以使用本领域中已知的酵母展示方法来产生。在酵母展示方法中,使用遗传方法将抗体结构域系栓至酵母细胞壁并且使它们展示于酵母表面上。具体来说,这种酵母可以用于展示从谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可以用于制备抗体的酵母展示方法的实例包括通过引用并入本文的美国专利号6,699,658(Wittrup等人)中公开的方法。

[0420] e.产生重组分析物抗体

[0421] 抗体可以通过本领域中已知的许多技术中的任一个产生。例如,从宿主细胞表达,其中通过标准技术将编码重链和轻链的一种或多种表达载体转染至宿主细胞中。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为这类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0422] 用于表达本公开的重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216-4220(1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol,159:601-621(1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0423] 宿主细胞也可以用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可以对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码本公开的抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可以用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣抗原所必需的轻链和重链中的任何一者或两者的DNA。本公开的抗体也涵盖由这类截短DNA分子表达的分子。此外,可以通过用标准化学交联方法使本公开的抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是本公开的抗体(即结合人分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP))且另一重链和另一轻链对除人分析物(例如心肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的抗原具有特异性。

[0424] 在用于重组表达本公开的抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。

在重组表达载体内,使抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至CMV增强子/AdMLP启动子调控元件以驱动基因高度转录。重组表达载体也携带DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选择的转化株宿主细胞以便允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中回收完整抗体。将标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞,并且从培养基中回收抗体。更进一步地,本公开提供一种合成本公开的重组抗体的方法,所述方法通过在适合培养基中培养本公开的宿主细胞,直到合成本公开的重组抗体来进行。所述方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0425] (1) 人源化抗体

[0426] “人源化抗体”可以是抗体或其变体、衍生物、类似物或部分,其免疫特异性地结合于感兴趣抗原且包含具有基本上人抗体的氨基酸序列的框架(FR)区和具有基本上非人抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。人源化抗体可以来自结合所需抗原的非人物种抗体,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0427] 如本文所用,在CDR的背景下的术语“基本上”是指氨基酸序列与非人抗体CDR的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR。人源化抗体包含至少一个且通常两个可变结构域的基本上全部(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的那些CDR区并且全部或基本上全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。根据一个方面,人源化抗体也包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。在一些实施方式中,人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域两者。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。在一些实施方式中,人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中,人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方式中,人源化抗体仅含有轻链和/或重链的人源化可变结构域。

[0428] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列,并且可以使用本领域中熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能。

[0429] 人源化抗体的框架区和CDR区无需精确对应于亲本序列,例如可以通过取代、插入或/或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体CDR或共有框架进行诱变以使该位点处的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而,在一个实施方式中,此类突变将不是广泛的。通常,至少90%、至少95%、至少98%、或至少99%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文所用,术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用,术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的每个位置由家族中最常出现在那个位置的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现,那么共有序列中可以包括任一者。

[0430] 可以设计人源化抗体以使对啮齿动物抗人抗体的不想要的免疫应答最小化,这限制了那些部分在人类接受者中的治疗应用的持续时间和有效性。人源化抗体可以具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人残基常常被称为“输入”残基,其通常

取自可变结构域。可以通过用高变区序列取代人抗体的对应序列来进行人源化。因此,这类“人源化”抗体是嵌合抗体,其中显著小于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。例如,参见美国专利号4,816,567,其内容通过引用并入本文。人源化抗体可以是人抗体,其中一些高变区残基和可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。可以使用任何已知方法进行对本公开的抗体的人源化或工程化,诸如但不限于美国专利号5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539和4,816,567中所述的那些方法。

[0431] 人源化抗体可以保留对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的高亲和力和和其它有利的特性。可以使用亲本序列和人源化序列的三维模型,通过亲本序列和各种概念性人源化的产物的分析方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的。说明和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用进行分析,即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。以此方式,可以从接受者和输入序列中选择和合并FR残基,使得实现所需的抗体特征,诸如增加的对分析物(例如心肌肌钙蛋白I、UCH-L1或GFAP)的亲和力。通常,高变区残基可能直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0432] 作为人源化的替代方案,可以产生人抗体(在本文中也称为“完全人抗体”)。例如,可以经由PROfusion和/或酵母相关技术从文库中分离人抗体。还有可能产生转基因动物(例如,小鼠),所述转基因动物能够在免疫后在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全谱系。例如,在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合子缺失导致完全抑制内源性抗体产生。人种系免疫球蛋白基因阵列在这种种系突变小鼠中的转移将导致在抗原激发后产生人抗体。人源化或完全人抗体可以根据美国专利号5,770,429、5,833,985、5,837,243、5,922,845、6,017,517、6,096,311、6,111,166、6,270,765、6,303,755、6,365,116、6,410,690、6,682,928和6,984,720中所述的方法来制备,其各自的内容通过引用并入本文。

[0433] 12. 方法的变型

[0434] 所公开的确定样品中存在的感兴趣分析物(例如cTnI和除cTnI以外的一种或多种生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的存在或量的方法可以如本文所述。所述方法还可以根据用于分析分析物的其它方法进行调整。熟知的变型的实例包括但不限于免疫测定法,诸如夹心免疫测定法(例如单克隆-单克隆夹心免疫测定法、单克隆-多克隆夹心免疫测定法,包括酶检测(酶免疫测定法(EIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),竞争性抑制免疫测定法(例如正向和反向)、酶扩大免疫测定技术(EMIT)、竞争性结合测定法、生物发光共振能量转移(BRET)、一步抗体检测测定法、均质测定法、异质测定法、即时捕获测定法等。

[0435] a. 免疫测定法

[0436] 感兴趣的分析物、和/或其片段的肽(例如cTnI和UCH-L1和/或GFAP、和/或其肽或片段,即cTnI和除cTnI以外的一种或多种早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)和/或片段)可以使用免疫测定中cTnI的抗体和一种或多种不是cTnI的额外生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP抗体)来分析。可以使用抗体并且检测与分析物(例如cTnI和一种或多种除

cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的特异性结合来确定分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的存在或量。例如,抗体、或其抗体片段可以特异性结合于分析物(例如,cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))。如果需要,可以将一种或多种抗体与一种或多种可商购获得的单克隆/多克隆抗体组合使用。这类抗体可从诸如R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) 和Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) 的公司获得。

[0437] 身体样品中存在的分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的存在或量可以使用免疫测定法容易地确定,诸如夹心免疫测定法(例如单克隆-单克隆夹心免疫测定法、单克隆-多克隆夹心免疫测定法,包括放射性同位素检测(放射免疫测定法(RIA))和酶检测(酶免疫测定法(EIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)(例如Quantikine ELISA assays, R&D Systems, Minneapolis, MN))。可以使用的定点照护装置的实例是*i-STAT*[®](Abbott, Laboratories, Abbott Park, IL)。可以使用的其它方法例如包括化学发光微粒免疫测定法,特别是采用*ARCHITECT*[®]自动分析仪(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)的方法。其它方法包括例如质谱法,和免疫组织化学法(例如,利用来自组织活检的切片),其使用抗分析物(例如抗cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))抗体(单克隆、多克隆、嵌合、人源化、人等)或其对分析物(例如抗cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的抗体片段。其它检测方法包括例如美国专利号6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792中描述的那些,其各自通过引用整体并入本文。抗体与分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的特异性免疫结合可以经由附接至抗体的直接标记,诸如荧光或发光标签、金属和放射性核素,或经由间接标记,诸如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶来检测。

[0438] 固定化抗体或其抗体片段的使用可以结合到免疫测定法中。可以将抗体固定化在多种支持物上,诸如磁性或色谱基质颗粒、测定板(诸如微量滴定孔)的表面、固体基质材料片等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列方式涂布在固体支持物上来制备测定条。然后将此条浸入到测试样品中并通过洗涤和检测步骤迅速处理以产生可测量信号,诸如显色的点。

[0439] 可以使用均质形式。例如,在从受试者获得测试样品之后,制备混合物。该混合物含有在被评估分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品和第一特异性结合配偶体以及一种或多种额外的特异性结合配偶体(诸如第二特异性结合配偶体、第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体等)。在一些实施方式中,该混合物含有在被评估分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品和第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体以及第三特异性结合配偶体。添加测试样品、第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体和第三特异性结合配偶体(如果存在)以形成混合物的顺序并不关键。使测试样品同时与第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体和/或第三特异性结合配偶体接触。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体和测试样品中含

有的任何cTnI可以形成第一特异性结合配偶体-分析物(例如cTnI)-抗原复合物并且第二特异性结合配偶体和一种或多种额外的特异性结合配偶体(例如第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体等)和测试样品中含有的任何除cTnI以外的早期生物标记物(例如UCH-L1和/或GFAP)可以形成第二特异性结合配偶体分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物和第三特异性结合配偶体分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合UCH-L1。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合GFAP。在又其它实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合UCH-L1并且第三特异性结合配偶体可以结合GFAP。第一特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。第二特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。第三特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。此外,第一、第二和/或第三特异性结合配偶体中的一种或多种可以用如上所述的可检测标记来标记或含有所述可检测标记。

[0440] 可以使用异质形式。例如,在从受试者获得测试样品之后,制备第一混合物。该混合物含有在被评估分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品和第一特异性结合配偶体,其中第一特异性结合配偶体和测试样品中含有的任何cTnI形成第一特异性结合配偶体-分析物(例如cTnI)-抗原复合物以及一种或多种额外的特异性结合配偶体(诸如第二特异性结合配偶体、第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体),其中一种或多种额外的特异性结合配偶体和测试样品中含有的除cTnI以外的任一种或多种早期生物标记物形成一种或多种特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物。在一些实施方式中,该混合物含有在被评估分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品和第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体以及第三特异性结合配偶体。添加测试样品、第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体和第三特异性结合配偶体(如果存在)以形成混合物的顺序并不关键。使测试样品同时与第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体和/或第三特异性结合配偶体接触。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体和测试样品中含有的任何cTnI可以形成第一特异性结合配偶体-分析物(例如cTnI)-抗原复合物并且第二特异性结合配偶体和一种或多种额外的特异性结合配偶体(例如第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体等)和测试样品中含有的任何除cTnI以外的早期生物标记物(例如UCH-L1和/或GFAP)

可以形成第二特异性结合配偶体分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物和/或第三特异性结合配偶体分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合UCH-L1。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合GFAP。在其它实施方式中,第一特异性结合配偶体可以结合cTnI并且第二特异性结合配偶体可以结合UCH-L1并且第三特异性结合配偶体可以结合GFAP。第一特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。第二特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。第三特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗cTnI抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:1的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续氨基酸的氨基酸序列的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。此外,第一、第二和/或第三特异性结合配偶体中的一种或多种可以用如上所述的可检测标记来标记或含有所述可检测标记。添加测试样品和特异性结合配偶体(第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体、第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体等)中的每一种以形成混合物的顺序并不关键。

[0441] 可以将特异性结合配偶体(例如第一特异性结合配偶体、第二特异性结合配偶体、第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体和/或第五特异性结合配偶体等)中的一种或多种固定化在固相上。用于免疫测定法(针对本文所述的特异性结合配偶体中的任一种)中的固相可以为在本领域中已知的任何固相,诸如但不限于磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、比色管、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘片和芯片。在固相是珠粒的那些实施方式中,珠粒可以是磁性珠粒或磁性颗粒。磁性珠粒/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁性的、超顺磁性的或铁磁流体的。示例性铁磁材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO以及NiO/Fe。亚铁磁材料的实例包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄(或FeO·Fe₂O₃)。珠粒可以具有磁性的实心核心部分并且被一个或多个非磁性层包围。另选地,磁性部分可以是围绕非磁性核心的层。其上固定化有第一特异性结合成员的固体支持物可以以干燥形式或以液体储存。磁性珠粒在与具有其上固定化有第一特异性结合成员的磁性珠粒的样品接触之前或之后可以经受磁场。

[0442] 在形成含有一种或多种特异性结合配偶体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1或GFAP))抗原复合物之后,使用本领域已知的任何技术从所述复合物中除去任何未结合的分析物。例如,未结合的分析物可以通过洗涤除去。然而,合乎需要的是第一特异性结合配偶体以超过测试样品中存在的任何分析物(例如cTnI和UCH-L1和/或GFAP)的量存在,以使得测试样品中存在的所有分析物(例如cTnI和UCH-L1和/或GFAP)都被第一特异性结合配偶体结合。

[0443] 在除去任何未结合的分析物(例如cTnI和UCH-L1和/或GFAP)之后,将一种或多种额外的特异性结合配偶体(诸如第二特异性结合配偶体、第三特异性结合配偶体、第四特异性结合配偶体、第五特异性结合配偶体等)添加到混合物中以形成额外的(即第二、第三、第四、第五等)特异性结合配偶体-感兴趣分析物(例如一种或多种除cTnI以外的生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))-额外的(即第二、第三、第四、第五等)特异性结合配偶体复合物。额外的(即第二、第三、第四、第五等)特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如除cTnI以外的生物标记物的抗体(诸如像抗UCH-L1抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:2的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位;和/或抗GFAP抗体,其结合具有包含SEQ ID NO:3的至少三个连续(3)氨基酸的氨基酸序列的表位)。此外,额外的(即第二、第三、第四、第五等)特异性结合配偶体用如上所述的可检测标记来标记或含有所述可检测标记。

[0444] 固定化抗体或其抗体片段的使用可以结合到免疫测定法中。可以将抗体固定化在多种支持物上,诸如磁性或色谱基质颗粒(诸如磁性珠粒)、胶乳颗粒或表面改性的胶乳颗粒、聚合物或聚合物薄膜、塑料或塑料薄膜、平面基材、测定板(诸如微量滴定孔)的表面、固体基质材料片等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列方式涂布在固体支持物上来制备测定条。然后可以将此条浸入到测试样品中并通过洗涤和检测步骤迅速处理以产生可测量信号,诸如显色的点。

[0445] (1) 夹心免疫测定法

[0446] 夹心免疫测定法测量抗体(即至少一种捕获抗体)和检测抗体(即至少一种检测抗体)的两个层之间的抗原量。对于待检测的每种感兴趣分析物,诸如cTnI或一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP),捕获抗体和检测抗体结合抗原(例如感兴趣分析物,诸如cTnI或一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))上的不同表位。合乎需要地,捕获抗体与表位的结合不会干扰检测抗体与表位的结合。单克隆或多克隆抗体均可用作夹心免疫测定法中的捕获抗体和检测抗体。

[0447] 通常,采用至少两种抗体来分离和定量测试样品中的分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))。更具体地,至少两种抗体结合每种分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的某些表位,从而形成免疫复合物,其被称为“夹心”。可以将一种或多种抗体用于捕获测试样品中的分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)) (这些抗体常称为一种或多种“捕获”抗体)并且将一种或多种抗体用于使可检测(即可定量)标记结合夹心(这些抗体常称为一种或多种“检测抗体”)。在夹心测定法中,抗体与其表位的结合合乎需要地不会因测定中任何其它抗体与其相应表位的结合而减弱。选择抗体以使得与疑似含有分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品接触的一种或多种第一抗体不与第二或后续抗体所识别的表位的全部或部分结合,从而干扰一种或多种第二检测抗体结合分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的能力。

[0448] 抗体可以在所述免疫测定法中用作第一抗体。抗体免疫特异性结合于分析物(例如cTnI或一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))上的表位。除了本公开的抗体之外,所述免疫测定法可以包含第二抗体,所述第二抗体免疫特异性结合于未被第一抗体识别或结合的表位。

[0449] 疑似含有分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品可以同时或依次地与每种分析物的至少一种第一捕获抗体(或多种第一捕获抗体)和至少一种第二检测抗体(或多种第二检测抗体)接触。在夹心测定形式中,首先在允许形成第一抗体-分析物(例如,cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))抗原复合物的条件下使疑似含有分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的测试样品与每种分析物的特异性结合于特定表位的至少一种第一捕获抗体接触。如果使用超过一种捕获抗体,则形成第一多重捕获抗体-抗原(诸如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))复合物。在夹心测定法中,每种分析物的抗体,优选至少一种捕获抗体,以测试样品中预期的每种分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的最大量的摩尔过量量使用。例如,每ml微粒涂布缓冲液可以使用约5pg/mL至约1mg/mL抗体。

[0450] i. 抗cTnI捕获抗体

[0451] 任选地,在使测试样品与至少一种第一捕获抗体接触之前,至少一种第一捕获抗体可以结合至固体支持物,所述固体支持物有利于从测试样品分离第一抗体-分析物(例如cTnI)复合物。可以使用本领域中已知的任何固体支持物,包括但不限于由聚合物材料制成、呈孔、管或珠粒(例如微粒)形式的固体支持物。一种(或多种)抗体可以通过吸附、通过使用化学偶联剂的共价键合或通过本领域中已知的其它手段与固体支持物结合,前提条件是这种结合不会干扰抗体结合分析物(例如cTnI)的能力。此外,如果需要,可以将固体支持物衍生化以允许与抗体上的各种官能团反应。这种衍生化需要使用某些偶联剂,诸如但不限于顺丁烯二酸酐、N-羧基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺。

[0452] 此后将疑似含有分析物(例如cTnI)的测试样品孵育以允许形成第一捕获抗体(或多种捕获抗体)-分析物(例如cTnI)复合物。孵育可以在约4.5至约10.0的pH下,在约2°C至约45°C的温度下,并且持续至少约一(1)分钟至约十八(18)小时、约2-6分钟、约7-12分钟、约5-15分钟或约3-4分钟的时段来进行。

[0453] ii. 抗UCH-L1和/或GFAP捕获抗体

[0454] 任选地,在使测试样品与至少一种第一捕获抗体接触之前,至少一种第一捕获抗体可结合至固体支持物,所述固体支持物有利于从测试样品分离第一抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物。可以使用本领域中已知的任何固体支持物,包括但不限于由聚合物材料制成、呈孔、管或珠粒(例如微粒)形式的固体支持物。一种(或多种)抗体可以通过吸附、通过使用化学偶联剂的共价键合或通过本领域中已知的其它手段与固体支持物结合,前提条件是这种结合不会干扰抗体结合分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的能力。此外,如果需要,可以将固体支持物衍生化以允许与抗体上的各种官能团反应。这种衍生化需要使用某些偶联剂,诸如但不限于顺丁烯二酸酐、N-羧基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺。

[0455] 此后将疑似含有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品孵育以允许形成第一捕获抗体(或多种捕获抗体)-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物。孵育可以在约4.5至约10.0的pH下,在约2°C至约45°C的温度下,并且持续至少约一(1)分钟至约十八(18)小时、约2-6分钟、约7-12分钟、约5-15分钟或约3-4分钟的时段来进行。

[0456] iii.检测抗体

[0457] 在形成第一/多重捕获抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))复合物之后,然后使复合物与至少一种第二检测抗体接触(在允许形成第一/多重抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))抗原-第二抗体复合物的条件下)。在一些实施方式中,使测试样品与捕获抗体同时地与检测抗体接触。如果使第一抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))复合物与超过一种检测抗体接触,则形成第一/多重抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))-多重抗体检测复合物。与第一抗体一样,当使至少第二(和后续)抗体与第一抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))复合物接触时,在与上述的那些类似的条件下孵育一段时间是形成第一/多重抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))-第二/多重抗体复合物所需的。优选地,至少一种第二抗体含有可检测标记。在形成第一/多重抗体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))-第二/多重抗体复合物之前、同时或之后,可检测标记可以结合至少一种第二抗体。可以使用本领域中已知的任何可检测标记。

[0458] 化学发光测定法可以根据Adamczyk等人,Anal.Chim.Acta 579(1):61-67(2006)中所述的方法进行。虽然可以使用任何适合测定法形式,但微板化学发光计(Mithras LB-940,Berthold Technologies U.S.A.,LLC,Oak Ridge,TN)使得能够快速测定多个小体积样品。使用96孔黑色聚苯乙烯微孔板(Costar#3792)时,化学发光计可以配备有多个试剂注射器。可以将每个样品添加至单独的孔中,然后同时/依次添加如由所采用的测定类型所确定的其它试剂。合乎需要地,避免采用吡啶芳基酯的中性或碱性溶液中的假碱形成,例如通过酸化。然后逐孔记录化学发光应答。就这一点而言,记录化学发光应答的时间部分地取决于添加试剂和所采用的特定吡啶之间的延迟。

[0459] 添加测试样品和一种或多种特异性结合配偶体以形成用于化学发光测定法的混合物的顺序并不关键。如果第一特异性结合配偶体用吡啶化合物可检测地标记,则形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-抗原(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))复合物。可选地,如果使用第二特异性结合配偶体并且第二特异性结合配偶体用吡啶化合物可检测地标记,则形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))-第二特异性结合配偶体复合物。任何未结合的特异性结合配偶体(无论标记或未标记的)都可以使用本领域中已知的任何技术(诸如洗涤)从混合物中除去。

[0460] 过氧化氢可以在混合物中原位产生,或者在添加上述吡啶化合物之前、同时或之后提供或供应至混合物。过氧化氢可以许多方式(诸如将为本领域技术人员所显而易见的方式)原位产生。

[0461] 可选地,可以简单地将过氧化氢源添加至混合物。例如,过氧化氢源可以是已知含有过氧化氢的一种或多种缓冲液或其它溶液。就这一点而言,可以简单地添加过氧化氢溶液。

[0462] 在同时或依次向样品中添加至少一种碱性溶液之后,产生指示分析物(例如cTnI

和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)存在的可检测信号,即化学发光信号。碱性溶液含有至少一种碱并且具有大于或等于10、优选大于或等于12的pH。碱性溶液的实例包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钙、碳酸钙和碳酸氢钙。添加至样品中的碱性溶液的量取决于碱性溶液的浓度。基于所用碱性溶液的浓度,本领域技术人员可容易地确定添加至样品中的碱性溶液的量。可以采用除化学发光标记以外的其它标记。例如,可以采用酶标记(包括但不限于碱性磷酸酶)。

[0463] 可以使用本领域技术人员已知的常规技术检测产生的化学发光信号或其它信号。基于产生信号的强度,可以定量样品中的感兴趣分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的量。具体地,样品中分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的量与产生信号的强度成正比。所存在的分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的量可以通过将所产生的光的量与分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的标准曲线比较或通过参考标准物比较来定量。可以通过质谱法、重量分析方法和本领域中已知的其它技术使用分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的已知浓度的连续稀释液或溶液来生成标准曲线。

[0464] (2) 正向竞争抑制测定

[0465] 在正向竞争形式中,将已知浓度的标记的感兴趣分析物(例如,具有荧光标记、用可裂解接头附接的标签等的cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的等分试样用于与测试样品中用于与感兴趣分析物抗体(例如,cTnI抗体和一种或多种不结合cTnI的额外抗体(诸如UCH-L1和/或GFAP抗体))结合的感兴趣分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))比较。

[0466] 在正向竞争测定中,固定化的特异性结合配偶体(诸如抗体)可以依次或同时与测试样品和标记的感兴趣分析物、其感兴趣分析物片段或感兴趣分析物变体接触。感兴趣分析物肽、感兴趣分析物片段或感兴趣分析物变体可以用任何可检测标记标记,包括由用可裂解接头附接的标签组成的可检测标记。在此测定中,可以将每种分析物的抗体固定化在固体支持物上。可选地,可以将每种分析物的抗体与固定化在固体支持物(诸如微粒或平面基材)上的抗体,诸如抗物种抗体偶联。

[0467] 将标记的感兴趣分析物、测试样品和每种分析物的抗体在与上文结合夹心测定形式所述的那些类似的条件下孵育。然后可以针对每种分析物产生两种不同物种的抗体-感兴趣分析物复合物。具体地,产生的抗体-感兴趣分析物复合物之一含有可检测标记(例如荧光标记等),而另一种抗体-感兴趣分析物不含可检测标记。抗体-感兴趣分析物复合物可以但不必在定量可检测标记之前与测试样品的其余部分分离。无论抗体-感兴趣分析物复合物是否与测试样品的其余部分分离,然后都定量抗体-感兴趣分析物复合物中可检测标记物的量。然后可以确定测试样品中感兴趣分析物(诸如膜相关的感兴趣分析物、可溶性感兴趣分析物、可溶性感兴趣分析物的片段、感兴趣分析物的变体(膜相关的或可溶性感兴趣分析物)或其任何组合)的浓度,例如,如上所述的。

[0468] (3) 反向竞争抑制测定

[0469] 在反向竞争测定法中,固定化的感兴趣分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))可以依次或同时地与测试样品和至少一种标记抗体接触。

[0470] 感兴趣分析物可以与固体支持物,诸如上文结合夹心测定形式讨论的固体支持物结合。

[0471] 将固定化的感兴趣分析物、测试样品和每种分析物的至少一种标记抗体在与上文结合夹心测定形式所述的那些类似的条件下孵育。然后针对每种分析物产生两种不同物种的感兴趣分析物-抗体复合物。具体地,对于每种分析物,产生的感兴趣分析物-抗体复合物之一被固定化并且含有可检测标记(例如荧光标记等),而另一种感兴趣分析物-抗体没有被固定化且不含可检测标记。通过本领域已知的技术,诸如洗涤,从固定化的感兴趣分析物-抗体复合物的存在中除去未固定化的感兴趣分析物-抗体复合物和测试样品的其余部分。一旦除去未固定化的感兴趣分析物抗体复合物则在裂解标签后定量固定化的感兴趣分析物-抗体复合物分析物中可检测标记的量。然后通过比较如上所述的可检测标记的数量来确定测试样品中每种感兴趣分析物的浓度。

[0472] (4) 一步免疫测定法或“即时捕获”测定法

[0473] 在即时捕获免疫测定法中,将固体基质预先涂布有固定剂。将每种分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的捕获剂和每种分析物的检测剂共同添加至固体基质,之后进行洗涤步骤,然后检测。捕获剂可以结合分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))并且包含固定剂的配体。捕获剂和检测剂可以是抗体或如本文所述或本领域中已知的能够捕获或检测的任何其它部分。配体可以包含肽标签并且固定剂可以包含抗肽标签抗体。另选地,配体和固定剂可以是能够结合在一起,以便用于即时捕获测定法的任何试剂对(例如特异性结合对,以及如本领域中已知的其它试剂对)。可以测量超过一种分析物。在一些实施方式中,可以用抗原涂布固体基质,并且待分析的分析物是抗体。

[0474] 在某些其它实施方式中,在一步免疫测定法或“即时捕获”中,使用了预先涂布有固定剂(诸如生物素、链霉抗生物素蛋白等)的固体支持物(诸如微粒)和至少第一特异性结合成员和第二特异性结合成员(分别用作捕获试剂和检测试剂)。第一特异性结合成员包含固定剂的配体(例如,如果固体支持物上的固定剂是链霉抗生物素蛋白,则第一特异性结合成员上的配体可以是生物素)并且还结合感兴趣分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))。第二特异性结合成员包含可检测标记并且结合感兴趣分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))。可以将固体支持物和第一和第二特异性结合成员(依次或同时地)添加到测试样品中。第一特异性结合成员上的配体与固体支持物上的固定剂结合,形成固体支持物/第一特异性结合成员复合物。存在于样品中的任何感兴趣分析物与固体支持物/第一特异性结合成员复合物结合以形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物。第二特异性结合成员与固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物结合,并且检测到可检测标记。在检测之前可以采用任选的洗涤步骤。在某些实施方式中,在一步测定法中,可以测量超过一种分析物。在某些其它实施方式中,可以采用超过两种特异性结合成员。在某些其它实施方式中,可以添加多种可检测标记。在某些其它实施方式中,可以检测到多种感兴趣分析

物,或者测量、确定或评估它们的量、水平或浓度。

[0475] 即时捕获测定法的使用可以以如本文所述、并且在本领域中已知的多种形式进行。例如,所述形式可以是如上所述的夹心测定法,但另选地可以是竞争测定法,可以采用单一特异性结合成员、或使用诸如已知的其它变型。

[0476] 13. 其它因素

[0477] 如上所述的诊断、预后和/或评估的方法可以进一步包括使用其它因素进行诊断、预后和评估。在一些实施方式中,可以使用格拉斯哥昏迷量表或扩展的格拉斯哥结局量表(GOSE)来诊断创伤性脑损伤。也可以单独使用或与格拉斯哥昏迷量表组合使用其它测试、量表或指数。一个实例是瑞秋洛斯阿米哥斯量表(Rancho Los Amigos Scale)。瑞秋洛斯阿米哥斯量表测量意识、认知、行为和与环境的互动的水平。瑞秋洛斯阿米哥斯量表包括:I级:无反应;II级:总体反应;III级:局部反应;IV级:困惑-躁动;V级:困惑-不适当反应;VI级:困惑-适当反应;VII级:自动-适当反应;和VIII级:有目的-适当反应。

[0478] 14. 样品

[0479] 在一些实施方式中,在人类受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。在一些实施方式中,在人类受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。此类化学物质和/或毒素的实例包括火、霉菌、石棉、杀虫剂和杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体(诸如一氧化碳、硫化氢和氰化物)、有机金属(诸如甲基汞、四乙基铅和有机锡)和/或一种或多种滥用药物。在一些实施方式中,样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的人类受试者获得。

[0480] 在又一个实施方式中,本文所述的方法使用的样品还可以用于通过使用下文所述的抗cTnI抗体(和抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体)或其抗体片段确定受试者中的cTnI和除cTnI以外的一种或多种早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的水平来确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或处于罹患轻度创伤性脑损伤的风险中。因此,在特定实施方式中,本公开还提供了一种用于确定患有本文所述且本领域已知的创伤性脑损伤或处于本文所述且本领域已知的创伤性脑损伤的风险中的受试者是否是用于疗法或治疗的候选者的方法。通常,受试者是以下中的至少一者:(i) 经历过头部损伤;(ii) 摄入和/或暴露于一种或多种化学物质和/或毒素;(iii) 罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水或罹患其任何组合;或(iv) (i) - (iii)的任何组合;或者,实际上已被诊断患有TBI或处于TBI的风险下(诸如像,罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者)和/或展现出不利的(即临床上不希望的)如本文所述的cTnI或cTnI片段和除cTnI以外的一种或多种早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP或UCH-L1和/或GFAP片段)的浓度或量。

[0481] a. 测试或生物样品

[0482] 如本文所用,“样品”、“测试样品”、“生物样品”是指含有或疑似含有cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的流体样品。样品可以源自任何适合的来源。在一些情况下,样品可以包含液体、流动的微粒固体或固体颗粒的流体悬浮液。在一些情况下,可以在本文所述的分析之前处理样品。例如,可以在分析之前将样品从

其来源分离或纯化;然而,在某些实施方式中,可以直接测定含有cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的未处理样品。在一个具体实例中,含有cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的来源是人体物质(例如体液、血液(诸如全血、血清、血浆)、尿液、唾液、汗液、痰液、精液、粘液、泪液、淋巴液、羊水、间质液、肺灌洗液、脑脊髓液、粪便、组织、器官等)。组织可以包括但不限于骨骼肌组织、肝组织、肺组织、肾组织、心肌组织、脑组织、骨髓、子宫颈组织、皮肤等。样品可以是液体样品或固体样品的液体提取物。在某些情况下,样品的来源可以是器官或组织,诸如活检样品,其可以通过组织分解/细胞裂解而溶解。

[0483] 可以分析广泛范围体积的流体样品。在一些示范性实施方式中,样品体积可以是约0.5nL、约1nL、约3nL、约0.01 μ L、约0.1 μ L、约1 μ L、约5 μ L、约10 μ L、约100 μ L、约1mL、约5mL、约10mL等。在一些情况下,流体样品的体积在约0.01 μ L与约10mL之间、在约0.01 μ L与约1mL之间、在约0.01 μ L与约100 μ L之间、或在约0.1 μ L与约10 μ L之间。

[0484] 在一些情况下,流体样品可以在用于测定中之前进行稀释。例如,在含有cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的来源为人体液(例如全血、血清或血浆)的实施方式中,流体可以用适当的溶剂(例如缓冲液,诸如PBS缓冲液)进行稀释。在使用之前可以将流体样品稀释约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多。在其它情况下,流体样品在用于测定中之前不进行稀释。

[0485] 在一些情况下,样品可以经历分析前处理。分析前处理可以提供额外的功能性,诸如非特异性蛋白质去除和/或有效但可廉价实现的混合功能性。分析前处理的一般方法可以包括使用电动力捕获、AC电动力学、表面声波、等速电泳、介电泳、电泳或本领域已知的其它预浓缩技术。在一些情况下,流体样品可以在用于测定中之前进行浓缩。例如,在含有cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的来源为人体液(例如全血、血清或血浆)的实施方式中,流体可以通过沉淀、蒸发、过滤、离心或其组合来浓缩。在使用之前可以将流体样品浓缩约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多。

[0486] b. 对照

[0487] 可能希望包括对照样品。对照样品可以与如上所述的来自受试者的样品同时分析。可以将受试者样品获得的结果与从对照样品获得的结果进行比较。可以提供标准曲线,可以将样品的测定结果与其进行比较。如果使用荧光标记,则这类标准曲线呈现作为测定单位,即荧光信号强度的函数的标记物水平。使用取自多个供体的样品,可以提供针对正常健康组织中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的参考水平,以及针对取自可能具有上文阐述的一个或多个特征的供体的组织中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的“有风险”水平的标准曲线。

[0488] 因此,鉴于上文,提供了一种用于确定测试样品中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的存在、量或浓度的方法。所述方法包括通过以下测定测试样品的cTnI和UCH-L1和/或GFAP:免疫测定法,例如采用至少一种结合cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)上的表位的捕获抗体和至少一种结合cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)上的

不同于捕获抗体的表位的表位并且任选地包括可检测标记的检测抗体,并且包括将作为测试样品中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的存在、量或浓度的直接或间接指示的由可检测标记生成的信号与作为校准物中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的存在、量或浓度的直接或间接指示的生成信号进行比较。校准物任选地、且优选地是一系列校准物的一部分,其中每种校准物与系列中的其它校准物的不同之处在于cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的浓度。

[0489] 15. 试剂盒

[0490] 本文提供一种试剂盒,该试剂盒可以用于测定或评估测试样品的cTnI和/或cTnI片段以及一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP或UCH-L1和/或GFAP片段)。该试剂盒包含用于测定测试样品的cTnI的至少一种组分和用于测定含有cTnI的测试样品的说明书以及用于测定测试样品的除cTnI以外的一种或多种早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的说明书。例如,该试剂盒可以包含用于通过免疫测定法,例如化学发光微粒免疫测定法测定测试样品的cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的说明书。试剂盒中所包括的说明书可以粘贴于包装材料上或可以作为包装说明书包括在内。虽然说明书通常是书写或印刷的材料,但它们不限于此类。本公开涵盖了能够存储这类说明并将其传达给最终使用者的任何介质。这类介质包括但不限于电子存储介质(例如磁盘、磁带、磁片盒、芯片)、光学介质(例如CD ROM)等。如本文所用,术语“说明书”可以包括提供说明书的互联网网站的地址。

[0491] 至少一种组分可以包括至少一种组合物,该组合物包含特异性结合于cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的一种或多种分离抗体或其抗体片段。抗体可以是cTnI检测抗体和/或捕获抗体和/或结合一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物的抗体,诸如UCH-L1和/或GFAP捕获抗体和/或UCH-L1和/或GFAP检测抗体。

[0492] 可选地或另外,试剂盒可以包含用于进行测定的校准物或对照,例如纯化的且任选冻干的cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)、和/或至少一个容器(例如管、微量滴定板或条,其可以已经用抗cTnI抗体或除抗cTnI抗体以外的抗体(诸如抗UCH-L1和/或GFAP单克隆抗体涂布)和/或缓冲液,诸如测定缓冲液或洗涤缓冲液,其中任一者都可以提供为浓缩溶液、可检测标记(例如酶标记)的底物溶液、或终止溶液。优选地,试剂盒包含进行测定法所必需的所有组分,即试剂、标准物、缓冲液、稀释剂等。说明书还可以包括用于生成标准曲线的说明书。

[0493] 试剂盒可以进一步包含用于定量cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的参考标准物。参考标准物可以用于建立标准曲线以内推和/或外推cTnI浓度和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的浓度。在一些实施方式中,cTnI的参考标准物可以对应于来源于健康参考群体的第99个百分点。这类参考标准物可以使用本领域已知的常规技术确定。参考标准物可以包含高UCH-L1和/或GFAP浓度水平,例如约100000pg/mL、约125000pg/mL、约150000pg/mL、约175000pg/mL、约200000pg/mL、约225000pg/mL、约250000pg/mL、约275000pg/mL或约300000pg/mL;中等UCH-L1和/或GFAP浓度水平,例如约25000pg/mL、约40000pg/mL、约45000pg/mL、约50000pg/mL、约55000pg/mL、约60000pg/mL、约75000pg/mL或约100000pg/mL;和/或低UCH-

L1和/或GFAP浓度水平,例如约1pg/mL、约5pg/mL、约10pg/mL、约12.5pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约25pg/mL、约30pg/mL、约35pg/mL、约40pg/mL、约45pg/mL、约50pg/mL、约55pg/mL、约60pg/mL、约65pg/mL、约70pg/mL、约75pg/mL、约80pg/mL、约85pg/mL、约90pg/mL、约95pg/mL或约100pg/mL。

[0494] 试剂盒中提供的任何抗体,诸如对cTnI具有特异性的重组抗体和/或对一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)具有特异性的一种或多种抗体可以合并可检测标记,诸如荧光团、放射性部分、酶、生物素/抗生物素蛋白标记、发色团、化学发光标记等,或者试剂盒可以包括用于标记抗体的试剂或用于检测抗体(例如检测抗体)的试剂和/或用于标记分析物(例如cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的试剂或用于检测分析物(例如,cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP))的试剂。抗体、校准物和/或对照可以提供于独立容器中或预分配至适当测定形式中,例如预分配至微量滴定板中。

[0495] 任选地,试剂盒包括质量控制组分(例如敏感性组、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备为本领域中所熟知且描述于各种免疫诊断产品的插页上。敏感性组成员任选地用于确立测定法性能特征,并且进一步任选地是免疫测定试剂盒试剂的完整性和测定法的标准化的可用指标。

[0496] 试剂盒也可以任选地包括进行诊断测定法或有利于质量控制评价所需的其它试剂,诸如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。用于分离和/或处理测试样品的其它组分(诸如缓冲液和溶液)(例如预处理试剂)也可以包括于试剂盒中。试剂盒可以另外包括一个或多个其它对照。试剂盒的一种或多种组分可以被冻干,在所述情况下试剂盒可以进一步包括适于复原冻干组分的试剂。

[0497] 试剂盒的各种组分任选地根据需要提供于适合容器,例如微量滴定板中。试剂盒可以进一步包括用于容纳或存储样品的容器(例如用于尿液、全血、血浆或血清样品的容器或盒)。适当时,试剂盒任选地也可以含有反应器皿、混合器皿和有利于制备试剂或测试样品的其它组分。试剂盒也可以包括用于帮助获得测试样品的一种或多种仪器,诸如注射器、移液管、钳子、测量匙等。

[0498] 如果可检测标记是至少一种吡啶化合物,则试剂盒可以包括至少一种吡啶-9-甲酰胺、至少一种吡啶-9-羧酸芳基酯或其任何组合。如果可检测标记是至少一种吡啶化合物,则试剂盒也可以包括过氧化氢来源,诸如缓冲液、溶液和/或至少一种碱性溶液。如果需要,试剂盒可以含有固相,诸如磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、比色管、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘片或芯片。

[0499] 如果需要,试剂盒可以进一步包括用于测定测试样品中的另一种分析物的一种或多种组分,这些组分单独地或与说明书进一步组合,所述另一种分析物可以是生物标记物,诸如创伤性脑损伤或病症的生物标记物。

[0500] a. 试剂盒和方法的适应性

[0501] 试剂盒(或其组分)以及用于通过本文所述的免疫测定法评估或测定测试样品中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的浓度的方法可以适用于多种自动化和半自动化系统(包括其中固相包括微粒的那些),例如美国专利号5,063,081、美国专利申请公开号2003/0170881、2004/0018577、2005/0054078和2006/

0160164中所述的和如例如由Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为Abbott定点照护 (**i-STAT®**或*i-STAT Alinity*, Abbott Laboratories) 商业市售的, 以及美国专利号5, 089, 424和5, 006, 309中所述的那些和如例如由Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为 **ARCHITECT®**或Abbott Alinity装置系列商业市售的。

[0502] 自动化或半自动化系统与非自动化系统 (例如ELISA) 之间相比的一些差异包括第一特异性结合配偶体 (例如分析物抗体或捕获抗体) 所附接的底物 (其可能影响夹心形成和分析物反应性), 以及捕获、检测和/或任何任选洗涤步骤的长度和时间。非自动化形式 (诸如ELISA) 关于样品和捕获试剂可能需要相对较长的孵育时间 (例如约2小时), 而自动化或半自动化形式 (例如 **ARCHITECT®**和任何后继平台, Abbott Laboratories) 可能具有相对较短的孵育时间 (例如, 对于 **ARCHITECT®**为大约18分钟)。类似地, 非自动化形式 (诸如ELISA) 可能以相对较长孵育时间 (例如约2小时) 孵育检测抗体 (诸如缀合试剂), 而自动化或半自动化形式 (例如 **ARCHITECT®**和任何后继平台) 可能具有相对较短的孵育时间 (例如对于 **ARCHITECT®**和任何后继平台为大约4分钟)。

[0503] 可从Abbott Laboratories获得的其它平台包括但不限于 **AxSYM®**、**IMx®** (参见例如美国专利号5, 294, 404, 其据此通过引用整体并入)、**PRISM®**、EIA (珠粒) 和 Quantum™ II以及其它平台。另外, 测定法、试剂盒和试剂盒组分可以在其它形式中, 例如在电化学或其它手持型或定点照护型测定系统上采用。如先前所提及的, 本公开例如适用于进行夹心免疫测定法的商业Abbott定点照护 (**i-STAT®**, Abbott Laboratories) 电化学免疫测定系统。免疫传感器及其制造方法和在单次使用测试装置中操作的方法描述于例如美国专利号5, 063, 081、美国专利申请公开号2003/0170881、2004/0018577、2005/0054078和2006/0160164中, 其关于此方面的教导均通过引用整体并入。

[0504] 具体地, 关于测定法对 **i-STAT®** 系统的适应性, 优选以下配置。将微制作的硅芯片制造有一对金安培计工作电极和银-氯化银参考电极。在一个工作电极上, 将具有固定化的捕获抗体的聚苯乙烯珠粒 (直径0.2mm) 粘附到电极上的图案化聚乙烯醇的聚合物涂层上。将该芯片组装成具有适于免疫测定法的流体形式的 **i-STAT®** 盒。在硅芯片的一部分上, 存在cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物 (诸如UCH-L1和/或GFAP) 的特异性结合配偶体, 诸如一种或多种cTnI抗体 (一种或多种单克隆/多克隆抗体或其片段、其变体或其变体的可以结合cTnI的片段) 或一种或多种抗cTnI DVD-Ig (或其片段、其变体或其变体的可以结合cTnI的片段) 和一种或多种对除cTnI以外的早期生物标记物具有特异性的抗体 (诸如UCH-L1和/或GFAP抗体 (一种或多种单克隆/多克隆抗体或其片段、其变体或其变体的可以结合UCH-L1和/或GFAP的片段)) 或一种或多种抗UCH-L1和/或抗GFAP DVD-Ig (或其片段、其变体、或其变体的可以结合UCH-L1和/或GFAP和/或GFAP的片段), 其中的每一者都可以可检测地标记。在盒的流体袋内是包括对氨基苯酚磷酸盐的含水试剂。

[0505] 在操作中, 将来自疑似患有TBI的受试者的样品添加到测试盒的保持室中, 并且将盒插入到 **i-STAT®** 读取器中。盒内的泵元件将样品推入到含有芯片的管道中。使样品与传感器接触, 从而使酶缀合物溶解到样品中。将样品在传感器上振荡, 以促进大约2-12分钟的夹层形成。在测定法的倒数第二步中, 将样品推入到废物室中并且使用含有针对碱性磷

酸酶的底物的洗涤流体来洗涤过量的酶缀合物并从传感器芯片上取样。在测定的最后步骤中,碱性磷酸酶标记与对氨基苯酚磷酸酯反应以裂解磷酸酯基团并允许释放的对氨基苯酚在工作电极处被电化学氧化。基于所测量的电流,读取器能够通过嵌入算法和制造厂确定的校准曲线计算样品中cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的量。

[0506] 如本文所述的方法和试剂盒必然涵盖用于进行免疫测定法的其它试剂和方法。例如,涵盖各种缓冲液,诸如本领域中已知和/或可以易于制备或优化以例如用于洗涤、用作缀合物稀释剂、微粒稀释剂和/或用作校准物稀释剂的缓冲液。示例性缀合物稀释剂是在某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中所采用且含有2-(N-吗啉基)乙烷磺酸(MES)、盐、蛋白阻断剂、抗微生物剂和洗涤剂的ARCHITECT®缀合物稀释剂。示例性校准物稀释剂是在某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中所采用的ARCHITECT®人校准物稀释剂,其包含含有MES、其它盐、蛋白阻断剂和抗微生物剂的缓冲液。另外,如2008年12月31日提交的美国专利申请号61/142,048中所述,可以例如在i-STAT®盒形式中,使用与信号抗体连接的核酸序列作为信号放大剂获得改善的信号产生。

[0507] 虽然本文的某些实施方式在用于评估疾病(诸如创伤性脑损伤)时是有利的,但是测定法和试剂盒也可以任选地在适当时用于评估其它疾病、病症和病状中的cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)。

[0508] 测定方法也可用于鉴定改善疾病,诸如创伤性脑损伤的化合物。例如,可以使表达cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的细胞与候选化合物接触。可以使用本文所述的测定方法将与化合物接触的细胞中的cTnI和一种或多种除cTnI以外的早期生物标记物(诸如UCH-L1和/或GFAP)的表达水平与对照细胞中的表达水平进行比较。

[0509] 本公开具有多个方面,这通过以下非限制性实施例说明。

[0510] 16. 实施例

[0511] 对于本领域技术人员显而易见的是,本文所述的本公开方法的其它适合修改和变型是容易应用和了解的,并且可以在不脱离本公开或本文公开的方面和实施方式的范围下使用适合等同物来进行。现已详细描述本公开,通过参考以下实施例将对其有更明确理解,所述实施例仅旨在说明本公开的一些方面和实施方式,并且不应视为限制本公开的范围。本文中提及的所有期刊参考文献、美国专利和公布的公开内容均据此通过引用全文并入。

[0512] 本公开具有多个方面,这通过以下非限制性实施例说明。

[0513] 实施例1

[0514] **i-STAT®** UCH-L1测定法

[0515] 测试作为捕获单克隆抗体的单克隆抗体对(诸如抗体A)和作为检测单克隆抗体的抗体B和C。抗体A是在Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)内部开发的示例性抗UCH-L1抗体。抗体B和C识别UCH-L1的不同表位并增强样品中抗原的检测,由Banyan Biomarkers (Alachua, Florida)开发。在Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)内部开发的其它抗体在以各种组合一起用作捕获抗体或检测抗体时也显示出或预期显示出相似的信号增强。

针对关键性能属性评价UCH-L1测定法设计。盒配置是抗体配置:抗体A(捕获抗体)/抗体B+C(检测抗体);试剂条件:0.8%固体,125 μ g/mL Fab碱性磷酸酶簇缀合物;和进样打印:UCH-L1标准物。测定时间为10-15min(具有7-12min的样品捕获时间)。将i-STAT UCH-L1测定法用于TBI患者群体研究中。

[0516] 实施例2

[0517] **i-STAT®**GFAP测定法

[0518] 将**i-STAT®**GFAP测定法用于TBI患者群体研究中。使用单克隆抗体对(诸如抗体A)作为捕获单克隆抗体,并且使用抗体B作为检测单克隆抗体。抗体A和抗体B是在Abbott Laboratories(Abbott Park, IL)内部开发的示例性抗GFAP抗体。针对关键性能属性评价GFAP测定法设计。盒配置是抗体配置:抗体A(捕获抗体)/抗体B(检测抗体);试剂条件:0.8%固体,250 μ g/mL Fab碱性磷酸酶簇缀合物;和进样打印:GFAP特异性。测定时间为10-15min(具有7-12min的样品捕获时间)。

[0519] 实施例3

[0520] 研究1-TBI群体

[0521] 研究1是大型且复杂的项目。其机构和公私伙伴关系由超过11个临床站点、7个核心组成,共有近50个合作机构、公司和慈善机构。基于来自三个临床站点的临床数据的早期初步研究帮助精修了TBI通用数据元素,并且创建了用于研究1的TBI信息共享的原型。

[0522] 受试者组:总共招募2700至3000名TBI患者,平均进入按临床护理路径区分的3个临床组中:1.在急诊科中评价且出院的患者(ED);2.住进医院但未住进ICU的患者(ADM);和3.住进ICU的患者(ICU)。将每个临床组($n=300$)的另外100名患有颅外创伤但未患有TBI的患者作为对照,总共招募3000名患者。该分层计划有利于比较效果研究(CER)分析,并且不受传统区别为“轻度/中度/重度”TBI的限制。数据收集取决于临床护理路径(ED、ADM、ICU)和每个目标的要求。将每组中的患者分层为3个群组,所述群组限定了要收集的数据范围。

[0523] 对照是符合以下标准的成人整形外科创伤患者:1.对于肢体和/或骨盆损伤和/或肋骨骨折的简易损伤评分 ≤ 4 (非危及生命的);2.符合与TBI受试者相同的纳入和排除标准,除了在ED中对疑似头部损伤进行CT或MRI的标准不适用。通过针对意识丧失(LOC)、意识障碍和创伤后遗忘症(PTA)/RA采访潜在对照,将TBI排除在当前损伤之外;3.为每个站点提供了根据源自TBI群组的年龄和性别分布要针对的对照数的计划;以及4.将对照招募到CA-MRI群组中以进行随访,并且如果无法完成MRI就诊,则在2周时送至综合评估(CA)。

[0524] 受试者合格性:招募了就诊于急诊科(ED)、根据美国康复医学会议(ACRM)标准具有急性TBI病史的所有年龄段中的成人患者,其中患者已遭受的创伤性诱导的脑功能生理中断,如表现为以下项中的 ≥ 1 个:任何时段意识丧失(LOC);针对紧接在事故发生之前或之后的事件的任何记忆丧失(例如,健忘症);在事故发生时精神状态的任何改变(感到头昏、迷失方向和/或混乱);和/或可能是或可能不是永久性的局灶性神经功能缺损。创伤性诱导的包括头部被撞击、头部撞击物体,或者脑部经历加速/减速运动(例如颈部受伤)而没有对头部的直接外部创伤。

[0525] 使用的纳入/排除标准显示在表2中。

[0526] 表2

标准	数据来源	注释
纳入标准		
1. 年龄 0-100	群组	
2. 记录/验证的 TBI (ACRM 标准)	群组, 采访	
3. 损伤发生在小于 24 小时之前	群组, 采访	
4. 用于临床护理的急性脑补 CT	群组	受试者必须进行脑部 CT 扫描
5. 足以进行测试的视力/听力	群组, 采访	
6. 英语或西班牙语流利	群组, 采访	测试组合或人员可用性
7. 能够提供知情同意书	采访	
排除标准		
[0527] 1. 会影响随访和结果评估的严重多发伤	群组	严重的身体创伤可能会混淆 TBI 结果测试。
2. 犯人或被拘留的患者	群组, 采访	
3. 女性受试者怀孕	群组, 采访	
4. 精神病患者 (例如 5150、5250)	群组	
5. 会干扰随访和结果评估有效性的严重衰弱性基线心理健康障碍 (例如精神分裂症或躁郁症)	群组, 采访	衰弱性精神病症会严重影响随访的可靠性和/或在归因于 TBI 指数时造成困难。
6. 损害基线意识认知或随访和结果评估有效性的严重的衰弱性神经系统疾病 (例如中风、CVA、痴呆、肿瘤)	群组, 采访	记录的衰弱性基线认知障碍除了不能完全被接受外, 还会混淆结果评估。
7. 可能干扰随访和结果评估的重大的	群组, 采访	
既往病史 (例如药物滥用、酗酒、HIV/AIDS、可能会干扰知情同意的重大可传染疾病、晚期癌症、学习障碍、发育障碍)		
[0528] 8. MRI 的禁忌症 (针对 CA+MRI 群组)	MRI 筛选	
9. 随访的可能性低 (例如, 参与者或家人表示兴趣低, 在另一个州或国家居住, 无家可归或缺乏可靠的联系方式)	采访	
10. 当前参与介入试验 (例如药物、设备、行为)	群组, 采访	对于参加针对 TBI 的复苏终点研究联盟院前氨甲环酸研究的地点, 共同纳入排除除外。
11. 渗透性 TBI	群组	
12. ASIA 评分为 C 或更糟的脊髓损伤	群组	

[0529] 对于3个临床组 (即ED、ADM和ICU) 中的每个组, 将受试者进一步置于三个不同的评估群组的一个中: 简要评估 (BA群组)、加压评估 (CA) 群组或加压评估+MRI (CA+MRI) 群组。关于具有80%随访率的里程碑计划, 参见表3。

[0530] 表3

(附加)	第 1 年			第 2 年			第 3 年			第 4 年	总计
组	CA+MRI	CA	N	CA+MRI	CA	N	CA	BA	N	BA	N
[0531] ED	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
ADM	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
ICU	150	87	237	50	58	108	155	100	255	300	900
对照	0	99	99	0	66	66	135	0	135	0	300
总计	450	360	810	150	240	390	600	300	900	900	3000

[0532] 简要评估 (BA) 群组总共包括1200名受试者,ED、ADM和ICU组各自具有400名受试者。针对BA群组收集了以下数据:人口统计学和完整的临床病程数据;在第1天(损伤后<24小时)针对血清、血浆、DNA和RNA的抽血;在第1天基线收集的3-6小时内针对血清的重复抽血(对包括该组分的站点是任选的);作为住院诊治经过的一部分从第1天开始取得的临床脑CT扫描;以及使用NINDS CDE网站上公开的NIH TBI-CDE v.2.0核心结局指标测量,通过第2周、第3、6和12个月时的结构化电话访问收集的结局数据。

[0533] 加压评估 (CA) 群组总共包括1200名受试者,ED、ADM和ICU组各自具有300名受试者+100名对照。针对CA群组收集了以下数据:人口统计学和完整的临床病程数据;ADM和ICU组的高密度日常临床数据;在第1天(损伤后<24小时)针对血清、血浆、RNA和DNA的抽血;在第1天基线收集的3-6小时内针对血清的重复抽血(任选地用于包括该组分的站点);对于ADM和ICU,在第3天(48-72小时)和第5天(96-120小时)针对血清、血浆和RNA的抽血;在第1天至第5天的脑脊液收集(任选地用于包括该组分的站点);作为住院诊治经过的一部分取得的所有临床脑CT扫描;在第2周和第6个月时针对血清、血浆和RNA的抽血;以及通过使用NIH TBI-CDEs v.2.0核心、基本和补充结局指标测量,通过第2周、第6个月和第12个月结构化面对面访问和在3个月时经由结构化电话访问收集的结局数据。

[0534] 综合评估+MRI (CA+MRI) 群组总共包括600名受试者,ED、ADM和ICU组各自具有200名。针对CA+MRI群组收集了以下数据:人口统计学和完整的临床病程数据;ADM和ICU组的高密度日常临床数据;在第1天(损伤后<24小时)针对血清、血浆、RNA和DNA的抽血;在第1天基线收集的3-6小时内针对血清的重复抽血(任选地用于包括该组分的站点);对于ADM和ICU,在第3天(48-72小时)和第5天(96-120小时)针对血清、血浆和RNA的抽血;在第1天至第5天的脑脊液收集(任选地用于包括该组分的站点);作为住院诊治经过的一部分取得的所有临床头部CT扫描;在第2周和第6个月时针对血清、血浆和RNA的抽血;在第2周和第6个月取得的3T研究MRI;以及通过使用NIH TBI-CDEs v.2.0核心、基本和补充结局指标测量,通过第2周、第6个月和第12个月结构化面对面访问和在3个月时经由结构化电话访问收集的结局数据。

[0535] 在纳入后,数据收集在医院开始。对于CA+MRI患者,2周MRI在自损伤之日的14天±4天完成。对应的2周结局在2周MRI的±3天完成。对于CA和BA患者,2周结局在自损伤之日的14天的±4天完成。3个月时的结局在自损伤之日的90天的±7天完成。对于CA+MRI患者,6个月时的MRI在自受伤之日的180天的±14天完成,其中相应的6个月结局在6个月MRI的±14天。对于CA和BA患者,6个月结局在自损伤之日的180天的±14天完成。BTACT应在结局的±7

天内完成(但不是在同一天并且不超过自损伤起的201天)。12个月时的结局在自损伤之日的360天的±30天完成。

[0536] 使用Abbott Architect STAT hsTnI测定在小样品量来自研究1的59名患者中测量HsTnI和UCH-L1(表4)。

[0537] 表4-通过CT扫描和MRI结果获得的受试者特征

受试者特征	总计 (n=59)	CT 或 MRI 阳性 (n=46, 77.97%)	CT 或 MRI 阴性 (n=13, 22.03%)	P 值
年龄	46.0 [24.0-60.0]	45.5 [23.0-60.0]	50.0 [39.0-57.0]	0.7419
性别				
男	50/59 (85%)	39/46 (85%)	11/13 (85%)	1.0000
女	9/59 (15%)	7/46 (15)	2/13 (15%)	
种族/种族划分				
非洲裔美国人或非洲人	6/58 (10%)	4/45 (9%)	2/13 (15%)	0.2398
白种人	48/58 (83%)	39/45 (87%)	9/13 (69%)	
拉丁美洲人	4/58 (7%)	2/45 (4%)	2/13 (15%)	
TBI 病史				
是, 没有 LOC	9/56 (16%)	3/43 (7%)	6/13 (46%)	0.0037
是, 有 LOC	8/56 (14%)	6/43 (14%)	2/13 (15%)	
没有先前 TBI	39/56 (70%)	34/43 (79%)	5/13 (38%)	
ED 表现				
意识丧失				
否	6/58 (10%)	2/45 (4%)	4/13 (31%)	0.0227
是	47/58 (81%)	38/45 (84%)	9/13 (69%)	
未知	5/58 (9%)	5/45 (11%)		
拉斯哥昏迷量表	15.0 [3.0-15.0]	14.0 [3.0-15.0]	15.0 [15.0-15.0]	0.0162
拉斯哥昏迷量表分类				
重度 (3-8)	16/59 (27%)	16/46 (35%)		0.0177

[0538]

[0539]

中度 (9-12)	3/59 (5%)	3/46 (7%)		
轻度 (13-15)	40/59 (68%)	27/46 (59%)	13/13 (100%)	
损伤途径				
机动车辆 (驾驶员/乘客)	10/59 (17%)	9/46 (20%)	1/13 (8%)	0.2975
摩托车/ATV/高尔夫球车 (驾驶员/乘客)	5/59 (8%)	3/46 (7%)	2/13 (15%)	
被任何类型车辆撞击的个体	3/59 (5%)	2/46 (4%)	1/13 (8%)	
从移动物体跌倒 (自行车/滑板/马等)	3/59 (5%)	3/46 (7%)		
从静止物体跌倒 (屋顶/阶梯/等)	27/59 (46%)	20/46 (43%)	7/13 (54%)	
袭击	10/59 (17%)	9/46 (43%)	1/13 (8%)	
被物体撞击在头部, 不是袭击 (树/等)	1/59 (2%)		1/13 (8%)	
醇水平 (g/dL)	0.1 [0.0-0.2]	0.1 [0.0-0.2]	0.0 [0.0-0.0]	0.1588
药物筛选				
阴性	51/59 (86%)	41/46 (89%)	10/13 (77%)	0.3567
阳性	8/59 (14%)	5/46 (11%)	3/13 (23%)	
生物标记物结果				
自损伤起的收集时间 (分钟)	771.0 (+/-339.8)	779.4 (+/-296.8)	743.0 (+/-468.7)	0.7383
UCH-L1 (pg/mL)	342.5 [102.8-718.3]	514.0 [167.2-859.8]	62.4 [44.5-136.8]	<0.0001
预后评分				
格拉斯哥结局量表 (3 个月)	6.0 [5.0-7.0]	5.5 [4.0-7.0]	7.0 [7.0-7.0]	0.0130
格拉斯哥结局量表 (6 个月)	6.0 [5.0-7.0]	6.0 [4.0-7.0]	7.0 [5.5-7.5]	0.1941
格拉斯哥结局量表 (12 个月)	7.0 [5.0-8.0]	6.5 [5.0-8.0]	7.0 [6.0-8.0]	0.4412

	Rivermead 调查表前3项(6个月)	0.0 [0.0-2.0]	0.0 [0.0-2.5]	0.0 [0.0-2.0]	0.8378
	Rivermead 调查表最后 13 项 (6个月)	9.0 [4.0-15.0]	8.5 [4.0-15.0]	13.0 [0.0-27.0]	0.5449
[0540]	WAIS-III 处理速度指数 (6个月)	30.0 [5.0-55.0]	30.0 [5.0-50.0]	43.0 [18.0-77.0]	0.3235
	生活满意度量表 (6个月)	21.5 (+/-6.2)	21.7 (+/-5.7)	20.4 (+/-8.5)	0.6205
	功能独立性测量 (6个月)	126.0 [125.0-126.0]	126.0 [124.0-126.0]	126.0 [126.0-126.0]	0.2958

[0541] *24名受试者接受MRI。

[0542] 连续变量呈现为中值[25-75%四分位距]并且使用威氏秩和检验进行比较

[0543] 或呈现为平均值(+/-SD)并且基于数据分布使用t检验进行比较。

[0544] 分类变量呈现为数字/总计(百分比)并且使用卡方或费舍尔精确检验。

[0545] 除了在脑损伤24小时内的抽血之外,每名患者还进行广泛的医学评价,包括头部CT、神经精神病学测试、格拉斯哥昏迷评分(GCS),并且许多患者还在损伤2周内进行了随访MRI。按照细致的标准化抽血方案和处理,将血浆样品等分以在-80℃下储存,然后解冻并测试。将每个样品一式两份运行,列出的结果是两次运行的平均值。图1示出了UCH-L1水平在损伤后的最初24小时(范围大约2-23小时)内与损伤相关联。表4示出了乙醇(ETOH)水平不与生物标记物水平相关联(皮尔逊相关性=0.023,p值=0.89),因为ETOH消耗经常与TBI,特别是重度TBI相关。

[0546] 表5示出了对小样品量来自研究1的191名患者的数据分析,具体地,对时间点2与时间点1之间的hsTnI和UCH-L1水平的变化的分析。在自损伤24小时内取得时间点1样品,并且在取得时间点1样品之后约3-6小时取得时间点2样品。UCH-L1似乎从时间点1到时间点2有显著变化(n=191,中值增量(即从时间点1到时间点2的变化)=-38pg/mL,威氏符号秩次检验p值<0.0001)。还参见图2。图2示出了箱线图,其指示在时间点1和时间点2处在研究的所有患者中测定的UCH-L1水平。GFAP似乎从时间点1到时间点2有显著变化(n=191,中值增量(即从时间点1到时间点2的变化)=-1pg/mL,威氏符号秩次检验p值=0.7932)。还参见图34。图34示出了箱线图,其指示在时间点1和时间点2处在研究的所有患者中测定的GFAP水平。HsTnI似乎从时间点1到时间点2有显著变化(n=89,中值增量(即从时间点1到时间点2的变化)=0.091537pg/mL,威氏符号秩次检验p值<0.6085)。还参见图3。图3示出了箱线图,其指示在时间点1和时间点2处在研究的所有患者中测定的hsTnI水平。这些数据只是比较时间点的分析,而不是基于CT、MRI或GCS+/-。UCH-L1似乎从时间点1到时间点2有显著变化(n=191,中值增量(即从时间点1到时间点2的变化)=-38pg/mL,威氏符号秩次检验p值<0.0001)。

[0547] 表5

	含量测定	样品量 (n)	中值增量	最小增量	最大增量	威氏符号秩次统计	P 值
[0548]	hsTnI	89	0.091537	-226.4837	29419.421	122	0.6085
	UCH-L1	191	-38	-6070	2528	-5398.5	<0.0001
	GFAP	191	-1	-18183	10368	193.5	0.7932

[0549] 基于何时取得时间点1样品,例如,损伤之后0至约6小时(“0-6小时组”)、损伤之后约6至约12小时(“6-12小时组”)进一步分析来自研究1中的191个样品的数据并且将所述数据与头部CT扫描结果和/或GCS评分相关联。将时间点1和时间点2样品中的hsTnI水平与指示轻度或中度/重度TBI的阳性或阴性头部CT扫描结果和/或GCS评分进行比较。由于该分析是基于取得时间点1样品的时间,因此每组的受试者数量很少。参见表6。

[0550] 表6

		时间范围 (小时) *					总受试者数目	
		0-6	6-12	12-18	18-24	>24		
[0551]	CT 扫描	阳性	6	21	33	31	4	95
		阴性	8	17	25	25	0	75
	GCS 评分	轻度	12	27	45	41	1	126
		中度/重度	2	10	15	15	2	44

[0552] *自损伤时间起的取得第一样品的时间

[0553] CT扫描.图4示出了来自0-6小时组、具有阳性或阴性头部CT扫描的受试者中的hsTnI结果。图4示出了在具有阳性或阴性CT扫描的受试者中在时间点1和时间点2处的hsTnI水平的分布。对于0-6小时组,在时间点1和时间点2处,CT阳性受试者中的hsTnI水平均高于CT阴性受试者。来自0-6小时组、具有阳性CT扫描的受试者中的hsTnI水平从时间点1到时间点2具有显著的增加。

[0554] 图5示出了在来自0-6小时组的受试者中的hsTnI水平的绝对量(“绝对增量”)。与具有阴性头部CT扫描的受试者相比,具有阳性头部CT扫描的受试者的hsTnI水平从时间点1到时间点2具有更大的变化。

[0555] GCS评分.图6示出了来自0-6小时组、基于其GCS评分被鉴定为患有轻度或中度至重度(“中度/重度”)TBI的受试者中的hsTnI结果。图6示出了在被确定为患有轻度或中度/重度的受试者中在时间点1和时间点2处的hsTnI水平的分布。对于0-6小时组,在时间点1和时间点2处,中度/重度受试者中的hsTnI水平均显著高于轻度受试者。0-6小时组中的hsTnI水平从时间点1到时间点2具有显著的增加。

[0556] 图7示出了0-6小时组的hsTnI水平的绝对量(或时间点1与时间点2之间的变化;“绝对增量”)。与基于GCS评分被确定患有轻度TBI的受试者相比,基于GCS评分被确定患有中度/重度TBI的受试者的hsTnI水平从时间点1到时间点2具有更大变化。

[0557] 图8示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1(在头部损伤之后0至12小时内取得)处的UCH-L1测定结果的ROC分析。

[0558] 图9示出了与轻度与中度/重度TBI GCS评分相关联的时间点1(在头部损伤之后超

过12小时取得)处的UCH-L1测定结果的ROC分析。

[0559] 图10示出了与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平和UCH-L1水平的组合的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差和时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的ROC分析。在头部损伤0至12小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。图11示出了与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平和UCH-L1水平的组合的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差和时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的ROC分析。在头部损伤超过12小时取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。

[0560] 实施例4

[0561] 研究2-针对创伤性脑损伤开发多模态分类方案

[0562] 这项研究的目的是为脑损伤开发分类方案,该方案指示损伤的性质(类型)和严重程度。例如,血清生物标记物揭示细胞类型。创伤患者分为三组进行分析:仅脑损伤、仅非脑损伤和组合损伤。将脑损伤和非脑损伤的创伤组相互比较,并与脑/非脑创伤的组合进行比较。将这些创伤组与非创伤对照组进行比较。将创伤患者的CSF与非创伤患者的CSF进行了比较。次要目标是确定任何一项测量(单独或组合使用)是否可作为TBI术后临床预后的指标。

[0563] 基于以下几种测量,开发了一种针对创伤性脑损伤的客观多模态分类方案和结局度量:1)基于血液的生物标记物;2)生理测量及评价;和3)射线照相测量(CT和3T MRI)。基于血液的生物标记物可以指示受损的细胞类型(例如神经胶质细胞相对于神经元),而射线照相可以检测结构变化。

[0564] 研究地点:在明尼苏达州的亨内平县医疗中心(HCMC)招募了创伤患者。参与者包括出现在HCMC急诊部(ED)、创伤急救室或直接转移到神经外科的各个年龄段的创伤患者。排除患有重大精神或神经病症、发育异常或是犯人的创伤患者。通过搜索所有创伤入院的医疗记录并与医院使用的美国外科医师学院创伤记录进行交叉核对来鉴别受试者。

[0565] 在入院时招募经历以下的所有创伤患者以进行筛选:1)标准化(模板化)病史检查和体检;2)如果针对其它适应症抽血,则分析血清生物标记物;3)按照临床指示的射线照相研究;4)按照1)-3)的临床指示进行的随访;5)仅对进入手术室的患者进行的病理标本分析;6)仅对接受脑室造瘘术导管的患者进行的CSF分析;7)仅对接受Licox的患者进行的脑组织氧合分析;和8)按照临床指示在TBI中心进行的结局评估。在入院时,潜在的参与者在提供知情同意书之前经历了24小时的筛选过程(表7)。

[0566] 表7-筛选评估

	成人	儿科
所有	手术创伤史和身体	
	从神经手术-创伤史和身体的选择	
[0567] 清醒	SCAT3: SAC, SSS-C	儿童 SCAT3: SAC-C, SSS-C
OR	病原性样本	
VC	CSF 分析	
Licox	脑组织氧合	

[0568] OR: 进入手术室的患者; VC: 接受脑室造瘘术导管的患者; Licox: 接受Licox的患者

[0569] 此外, 同意的患者和对照者(年龄和性别匹配) 经历了上述研究以及以下附加研究: 1基因组、血清和CSF; 和2) 选定情况下的3T MRI (测试组中的血清标记物; 对照组中的正常标记物)。创伤患者包括从无脑受伤、CT阴性到需要进行手术的结构性脑损伤的全部范围。历经大约15个月招募患者和对照者。追踪存活的创伤受试者, 直到他们退出HCMC服务。邀请在ER中评估并释放的受试者进行研究随访。

[0570] 筛选过程包括标准化和模板化病史检查和体检。该模板是EPIC中当前的“手术创伤史和身体”模板, 还有一个附加问题: 询问患者是否遭受了头部创伤。如果患者遭受了头部创伤, 则三个部分自动下拉以显示额外信息。第一部分是来自神经外科创伤史和身体模板的信息, 包括蛛网膜下腔级别、出血级别、脑内出血和社会历史(教育水平、就业、生活安排和种族)。最后两部分是标准化脑损伤评估工具: 脑震荡的标准化评估(SAC) 和症状严重程度评分(SSS)。这些评估的婴儿版本可用, 并在有指示时使用。此外, “手术创伤史和身体”模板中已经包括的意识丧失问题被复制到此下拉部分, 其中包含问题子集, 其为意识丧失事件和患者当前的方向提供更加清楚的了解。将在入院前24小时内进行的临床上最准确的评估用于将来的数据分析。

[0571] 还基于以下标准包括非TBI受试者: 纳入时年龄在15与50岁之间; 在性别、年龄、偏手性、教育程度和扫描仪标准方面具有与TBI人群相似的特征; 并能够足够清晰的沟通和语言流畅, 以允许受试者提供书面知情同意, 或未成年人获得父母或监护人的同意, 以及完成研究评估以参与研究的所有部分。非TBI受试者在有以下情况时被排除: 在过去6个月内被诊断为轻度TBI; 在过去的10年内, 先前有中度至重度TBI (GCS<13); 在过去的10年中, 有癫痫, 伴有反复发作; 基于DAST-10筛选, 在过去10年内有药物滥用(大麻除外); 基于AUDIT-C筛选, 有酒精滥用; 当前的原发性第I轴或第II轴精神障碍, 但归为轻度且预计不会影响研究行为或完整性的疾病除外; 脑质量、神经外科手术、中风、白质病和/或痴呆病史; 已知的认知功能障碍或结构性脑疾病/畸形; 基于先前神经影像学检查发现的结构性脑损伤; 开了抗精神病药/抗癫痫药; 研究者认为, 无法(例如由于紧急医疗需要) 或不愿意准确地完成研究程序或存在任何可能影响研究结果的利益冲突; 或MRI扫描的禁忌症, 包括: a. 根据现场实际情况, 目前或疑似怀孕; b. 根据研究人员在参与研究期间可能对受试者造成危害的其它状况; 和c. 无法遵守地方的MR安全政策的任何部分。

[0572] 样本收集和处理. 在每次样本收集时获取至多40mL (大约3大匙) 血液。在遇测(Encounter) 1、2 4和5时抽取2管血清和2管血浆。在遇测3时, 抽取2管血清、1管血浆和1或2

管全血。这些研究样本经过处理、等分、冷冻并运到Abbott Laboratories进行生物标记物测试和存储。将样品等分试样送到测试地点进行额外的TBI生物标记物测试。如果存在以下情况,则该样本视为对于该研究而言是无法评估的:它含有的体积不足以进行必要的测量;样本有严重溶血、脂血或黄疸;没有将其收集在正确类型的收集管中;它没有正确标记;或收集地点或Abbott Laboratories未将其正确存储。

[0573] 通过抽血获得血清样本。如果出于临床目的在入院时获得抽血,则获得并保留额外的样本用于研究目的。如果没有出于临床目的抽取血液,则受过训练的研究人员会抽取研究所需的血液。除非标准护理要求中心静脉通道(在这种情况下通过该通道抽取血液),否则通过静脉穿刺抽取血液。入院时进行第一次抽血,第一次抽血后3-6小时进行第二次抽血,且在创伤后24小时进行第三次抽血。寻找易受TBI影响的遗传标记或TBI的预测标记的探索工作也在进行中。在每个时间点,收集40mL(少于3大匙)血液:20mL血清(2管)和20mL血浆(2管)。在遇测1期间,仅收集2管血清和1管血浆用于血液生物标记物分析。此全血收集在全血试管中为6.0mL。如果患者纳入遇测2而非遇测1,则对他们收集2管血清和1管血浆以进行血液生物标记物分析。此全血收集在全血试管中为6.0mL。

[0574] 根据NINOS标准化表(表8)限制抽血量。对于七岁以下的儿童,抽血的尝试次数限制到两次尝试。在NINOS标准化表格不允许抽取足够的血液用于研究,或者在儿童患者中有两次抽取血液的尝试失败的情况下,需要获取根据临床护理标准抽取的剩余血液样品以用于本研究中完整的生物标记物分析。此血液抽取允许分析至多390个与创伤性脑损伤相关的基于血液的生物标记物。

[0575] 表8最大可允许总抽血体积

[0576]

体重 (Kg)	体重 (lbs)	总血液体积 (mL)	一次抽血时的最大可允许体积 (mL) (=总血液体积的2.5%)	30天时段内的最大体积(临床研究) (mL)	血液抽取时所需的最小Hgb	受试者患有呼吸损害/CV损害时抽血时所需的最小Hgb
1	2.2	100	2.5	5	7.0	9.0-10.0
2	4.4	200	5	10	7.0	9.0-10.0
3	6.3	240	6	12	7.0	9.0-10.0
4	8.8	320	8	16	7.0	9.0-10.0
5	11	400	10	20	7.0	9.0-10.0
6	13.2	480	12	24	7.0	9.0-10.0
7	15.4	560	14	28	7.0	9.0-10.0
8	17.6	640	16	32	7.0	9.0-10.0
9	19.8	720	18	36	7.0	9.0-10.0
10	22	800	20	40	7.0	9.0-10.0
11-15	24-33	880-1200	22-30	44-60	7.0	9.0-10.0
16-20	35-44	1280-1600	32-40	64-80	7.0	9.0-10.0
21-25	46-55	1680-2000	42-50	84-100	7.0	9.0-10.0
26-30	57-66	2080-2400	52-60	104-120	7.0	9.0-10.0
31-35	68-77	2480-2800	62-70	124-140	7.0	9.0-10.0
36-40	79-88	2880-3200	72-80	144-160	7.0	9.0-10.0
41-45	90-99	3280-3600	82-90	164-180	7.0	9.0-10.0
46-50	101-110	3680-4000	92-100	184-200	7.0	9.0-10.0
51-55	112-121	4080-4400	102-110	204-220	7.0	9.0-10.0
56-60	123-132	4480-4800	112-120	224-240	7.0	9.0-10.0
61-65	134-143	4880-5200	122-130	244-260	7.0	9.0-10.0
68-70	145-154	5280-5600	132-140	264-280	7.0	9.0-10.0
71-75	156-185	5680-6000	142-150	284-300	7.0	9.0-10.0
76-80	167-176	6080-6400	152-160	304-360	7.0	9.0-10.0
81-85	178-187	6480-6800	162-170	324-340	7.0	9.0-10.0
86-90	189-198	6880-7200	172-180	344-360	7.0	9.0-10.0
91-95	200-209	7280-7600	182-190	364-380	7.0	9.0-10.0
96-100	211-220	7680-8000	192-200	384-400	7.0	9.0-10.0

[0577] 除了初始体检外,送去手术室的那些患者经历病理标本分析,记录那些接受了Licox的患者的脑组织氧合信息,且收集那些接受了脑室造瘘术导管的患者的CSF以进行分析。为了分析CSF,以抽取血液的相同间隔收集了5.0mL。根据照护标准进行射线照相研究。在筛选过程中进行的所有评估均未用其余数据进行分析,直到获得知情同意。如果患者最终未同意研究,则弃置样本和初始评估结果。

[0578] 参与者出院后,获得患者的病历记录以获取有关临床过程的信息,包括在ED花费的时间、所用的任何手术或其它神经监测方法以及急性护理结果评估。如果患者在ICU花费了时间,也从该时间段提取信息,所述信息包括Moberg监护仪和每日治疗强度水平的数据。

[0579] 创伤患者分为三组进行分析:仅脑损伤、仅非脑损伤和组合损伤。在这项研究中包括并从ED招募两个年龄和性别相匹配的对照组:非创伤和CSF对照。非创伤对照是未经历任何创伤的那些,且该组很大程度上由因脑损伤而入院的患者的家属和朋友构成。两个对照组同意经历单一密集型评估,该评估包括抽血和认知评估、神经学评估以及生存质量评估(SAC、NOS-TBI、QoLABI)。接受选择性脑室造瘘术或腰椎引流导管的患者(术前)同意成为CSF对照组的一部分。从此对照组中患者的脑室造瘘术导管中收集5mL CSF,以与从研究组中接受脑室造瘘术导管作为其护理标准的一部分收集的CSF进行比较。还向CSF对照组提供参与和另外两个对照组相同的密集型评估的机会,该评估包括抽血和3T MRI扫描。

[0580] 随访:要求同意参加研究随访部分的所有患者都返回医院。在第2周、第4周、个月、第6个月和1年于TBI门诊诊所接诊返回的患者。如果他们在TBI门诊诊所没有安排的预约,就在那些时间点为其安排时间到脑损伤研究实验室(PL.610)。表9提供每次评估的时间线。以如上所述的相同方法在五个随访时间点中的每一个时间点进行抽血以用于生物标记物分析。在第3个月、第6个月和一年完成列于表10和11中的结果评估组。通过参与者的病例记录获得作为标准护理一部分的射线照相扫描,但选择也在其脑损伤之后第2周和第6个月经历3T MRI扫描的同意的参与者和对照。每次MRI检查花费大约一小时,并且包括以下脉冲序列:(1)矢状短TR定位器;(2)轴位Fse;(3)轴位FLAIR;(4)轴位SWI;(5)轴位T2*成像。在患者不能到医院进行随访的情况下,在他们损伤之后三个月和一年通过电话与他们接触以完成BT ACT,该BT ACT为设计用于经由电话施用的15-20分钟认知评估。

[0581] 表9-结果时间线

	血液抽取	3T MRI	CSF 收集	CT 扫描	评估	总时间(分钟)
[0582] ADM	X		X(若指定)			10
2周	X	X				70
4周	X					10
[0583] 3个月	X				X	70
6个月	X	X				70
1年	X	X		X*	X	160(130,无CT)

[0584] 表10结果评估-未最终化

		成人	儿科
[0585]	结果	所有	GOS 和 GOSE
		清醒	SCAT3: SSS 和 SAC
	GOAT		儿童 SCAT3: 儿童和父母报告; SAC-C
	遗忘持续时间		GOAT
	NOS-TBI		遗忘持续时间
	生存质量: - MPAI-4		NOS-TBI
未清醒	生存质量: - 神经精神病学等级评定程序表 - 儿童生存质量量表 (针对儿童和代理人)		
		CRS-R (仅脑干反射网?)	

[0586] 表11可能的婴儿评估

名称	年龄	时间	描述
Bayley III, BSID*	0-3.5	30-90	认知、语言 (感受和表达) 和动作发展 最常用于针对此年龄范围的测试
BITSEA*	1-3	7-12	父母对社交和情绪行为的感知 42 项中的 17 项对应于自闭症, 因此能够将其缩短
CBCL	1.5-5	25-30	父母对活动、社交和学校表现的表现感知
[0587] MSEL*	1	15	认知和运动能力 (总体运动、视觉接收、细微运动、语言) 最常用于为上学做准备
	3	25-35	
	5	40-60	
Shape School*	3-6		抑制和转换过程: 新出现的执行功能
Trails-Preschool*	2-6	5-10	神经心理学功能: 心理运动速度、复杂注意力、执行功能 高级连线测试

[0588] *请求访问

[0589] 统计分析规划. 通过检查每名患者针对每种生物标记物的最大浓度抽取值, 或距事故桶的时间或两者, 来分析生物标记物数据. 为解决确定血液中生物标记物浓度与临床神经学和磁共振成像数据之间的关联性的主要目的, 采用多次分析. 使用主成分分析检查哪些生物标记物可能解释相同的差异, 或者生物标记物是否对差异作用极小. 将生物标记物用于逻辑回归分析, 且基于主成分分析的结果和临床输入, 排除了一些生物标记物. 将 0.05 的显著性水平用于逻辑回归分析. 对于这组数据, ROC 分析还用于检查每种生物标记物在确定 MRI 状态或神经测试结果方面的预测能力.

[0590] 实施例5

[0591] 研究2-分析

[0592] 如实施例4中所述, 使用 Abbott Architect STAT hsTnI 测定测量取自受试者的样品中的高敏感性肌钙蛋白 I (hsTnI)。图12、14和16示出了基于CT扫描结果, 在损伤之后前24

小时内(范围大约2-23小时),hsTnI(图12)、UCH-L1(图14)和GFAP(图15)水平与损伤相关联。图13、15和17示出了基于GCS评分,在损伤之后前24小时内(范围大约2-23小时),hsTnI(图13)、UCH-L1(图15)和GFAP(图17)水平与损伤相关联。

[0593] 在损伤24小时内取自受试者的样品:测量在疑似损伤约2小时内取自人类受试者的样品中的hsTnI水平和UCH-L1。图18示出了与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果;AUC=0.430)相关联的hsTnI水平的ROC分析。图12示出了使用hsTnI截止水平预测阳性CT扫描结果的敏感性和特异性。

[0594] 表12 CT扫描-单生物标记物参考水平分析

生物标记物	水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
hsTnI	1.15	87.5	31.25
	1.29	75.0	31.25
UCH-L1	854	83.33	69.57
	688	91.67	68.12
	78	91.67	30.43
GFAP	459	66.67	98.55
	193	75.00	97.10
	181.9	83.33	97.10
[0596]	108	91.67	91.30
	34	91.67	71.01
	33	100.00	68.12
	30	100.00	66.67
	11	100.00	31.88

[0597] 图19示出了与GCS评分结果(轻度与中度/重度TBI;AUC=0.588)相关联的hsTnI的ROC分析。图13示出使用hsTnI截止水平基于GCS评分预测中度/重度TBI的敏感性和特异性。

[0598] 表13 GCS评分-单生物标记物参考水平分析

生物标记物	水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
hsTnI	5.80	85.71	33.33
	4.71	85.71	40.0
UCH-L1	3019	70.00	85.92
	2919	80.00	84.51
	856	90.00	69.01
	305	100.00	54.93
	78	100.00	30.99
GFAP	36	70.00	69.01
	28	80.00	60.56
	23	90.00	59.16
	12	90.00	35.21
	11	90.00	29.58

[0599]

[0600] 取自所有受试者的样品：图20示出了将所有受试者在时间点1处的hsTnI水平与CT扫描结果相关联的ROC曲线。图26示出了将所有受试者在时间点1处的UCH-L1水平与CT扫描结果相关联的ROC曲线。图30示出了将所有受试者在时间点1处的GFAP水平与CT扫描结果相关联的ROC曲线。基于ROC曲线的所有受试者的参考水平的敏感性和特异性示出在表14中。

[0601] 表14 CT扫描-单生物标记物参考水平分析

生物标记物	参考水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)	
hsTnI	1.65	81.58	20.59	
UCH-L1	2.16	71.05	30.88	
	14.75	31.58	79.41	
	30.43	21.05	82.35	
	2783	31.58	75.00	
	413	81.58	45.59	
	383	84.21	41.18	
	340	86.84	39.71	
	293	86.84	30.88	
	GFAP	1929	31.58	100.00
		164	81.58	85.29
132		84.21	82.35	
116		86.84	77.94	
109		92.11	76.47	
108		94.74	76.47	
33		100.00	38.24	
27	100.00	30.88		

[0602]

[0603]

[0604] 图28示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中，与CT状态

(阳性与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI水平与UCH-L1水平的组合的ROC分析。图15示出了使用hsTnI截止水平和UCH-L1截止水平的组合预测阳性CT扫描结果的敏感性和特异性。在以下情况下的截止值是其中受试者的hsTnI或UCH-L1 (或两者) 高于截止值。

[0605] 表15 CT扫描-两种生物标记物参考水平分析

hsTnI水平 (pg/mL)	UCH-L1水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
10	450	76.32	32.35
10	400	81.58	29.41
5	550	81.58	29.41

[0607] 图32示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果)相关联的hsTnI水平与GFAP水平的组合的ROC分析。图16示出了使用hsTnI截止水平和GFAP截止水平的组合预测阳性CT扫描结果的敏感性和特异性。在以下情况下的截止值是其中受试者的hsTnI或GFAP (或两者) 高于截止值。

[0608] 表16 CT扫描-两种生物标记物参考水平分析

hsTnI水平 (pg/mL)	GFAP水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
5	150	86.84	54.41
10	150	84.21	64.71
10	100	94.74	58.82
15	100	94.74	64.71
15	50	94.74	42.65
15	100	94.74	64.71
15	150	84.21	70.59
20	150	84.21	70.59
35	150	81.58	73.53
50	150	81.58	82.53
50	100	94.74	75.00

[0610] 图21示出了将所有受试者在时间点1处的hsTnI水平与GCS评分相关联的ROC曲线。图27示出了将所有受试者在时间点1处的UCH-L1水平与GCS评分相关联的ROC曲线。图31示出了将所有受试者在时间点1处的GFAP水平与GCS评分相关联的ROC曲线。基于ROC曲线的所有受试者的参考水平的敏感性和特异性示出在表17中。

[0611] 表17 GCS评分-单生物标记物参考水平分析

生物标记物	参考水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
hsTnI	43.79	32.14	94.87
	21.23	46.43	85.90
	1.94	85.71	30.77
UCH-L1	5895	32.14	96.15
	515	82.14	50.00
	410	85.71	43.59
	305	89.29	34.62
	293	89.29	30.77
GFAP	2972	32.14	98.72
	52	82.14	42.31
	47	85.71	39.74
[0613]	34	89.29	33.33

[0614] 图29示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平与UCH-L1水平的组合的ROC分析。图18示出了使用hsTnI截止水平和UCH-L1截止水平两者的组合基于GCS评分预测中度/重度TBI的敏感性和特异性。在以下情况下的截止值是其中受试者的hsTnI或UCH-L1(或两者)高于截止值。

[0615] 表18 GCS评分-两种生物标记物参考水平分析

hsTnI水平 (pg/mL)	UCH-L1水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
10	400	89.29	30.77
10	550	85.71	39.74
5	550	89.29	30.77
5	500	89.29	29.49

[0617] 图33示出了在头部损伤之后24小时内第一时间点1处取得的样品中,与GCS评分结果(轻度与中度/重度)相关联的hsTnI水平与GFAP水平的组合的ROC分析。图19示出了使用hsTnI截止水平和GFAP截止水平两者的组合基于GCS评分预测中度/重度TBI的敏感性和特异性。在以下情况下的截止值是其中受试者的hsTnI或GFAP(或两者)高于截止值。

[0618] 表19 GCS评分-两种生物标记物参考水平分析

hsTnI水平 (pg/mL)	GFAP水平 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
5	70	85.71	32.05
10	70	85.71	39.74
10	100	85.71	48.72
15	100	85.71	53.85
15	150	82.14	62.82
20	100	85.71	53.85
20	150	82.14	62.82
35	100	85.71	56.41

35	150	82.14	66.67
50	150	78.57	73.08

[0620] 实施例6

[0621] 研究2-绝对量分析

[0622] 在损伤2小时内取自受试者的样品：在疑似损伤约2小时内的第一时间点取自人类受试者的样品和在第一时间点之后3-6小时的第二时间点取自人类受试者的样品中测量hsTnI水平。图22示出了与CT状态(阳性与阴性CT扫描结果；AUC=0.514)相关联的hsTnI结果的绝对量(“绝对增量”) (即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差)的ROC分析。表20示出了使用hsTnI截止水平预测阳性CT扫描结果的敏感性和特异性，其中预测小于截止值的值具有阳性CT扫描结果。

[0623] 表20 CT扫描-hsTnI绝对增量分析

生物标记物	绝对量 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
hsTnI	2.54	66.67	55.56
	1.16	83.33	27.78

[0625] 图23示出了与GCS评分结果(轻度与中度/重度；AUC=0.380)相关联的hsTnI结果的绝对量(“绝对增量”) (即时间点2处的hsTnI水平与时间点1处的hsTnI水平之间的绝对差)的ROC分析。表21示出了使用hsTnI截止水平基于GCS评分预测中度/重度TBI的敏感性和特异性，其中预测小于截止值的值具有中度/中度TBI。

[0626] 表21 GCS评分-hsTnI绝对增量分析

生物标记物	绝对量 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
hsTnI	4.73	66.67	31.25
	20.62	83.33	12.5

[0628] 取自所有受试者的样品：图24示出了将所有受试者在时间点1处的hsTnI水平与CT扫描结果相关联的ROC曲线。基于ROC曲线的所有受试者的hsTnI水平的绝对量(或时间点1与时间点2之间的变化)的敏感性和特异性示出在表22中。

[0629] 表22

绝对量 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
16.050	88.24	19.36
10.755	82.35	19.36
0.720	35.29	70.97
0.389	29.41	90.32

[0631] 图25示出了将所有受试者在时间点1和时间点2处的hsTnI水平的变化绝对量与GCS评分(轻度与中度/重度)相关联的ROC曲线。基于ROC曲线的所有受试者的hsTnI水平的绝对量(或时间点1与时间点2之间的变化)的敏感性和特异性示出在表23中。

[0632] 表23

绝对量 (pg/mL)	敏感性 (%)	特异性 (%)
3.33	45.46	32.43

5.80	72.73	21.62
17.17	81.82	13.51

[0634] 应理解先前详细描述和随附实施例仅是说明性的,并且不应视为对本公开的范围的限制,所述范围仅由随附权利要求及其等效物限定。

[0635] 所公开的实施方式的各种改变和修改对本领域技术人员是显而易见的。在不偏离其本质和范围的前提下,可以进行与包括但不限于本公开的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂和/或使用有关的方法有关的这类改变和修改。

[0636] 出于完整性的原因,在以下编号条款中列出本公开的各个方面:

[0637] 条款1、一种用于帮助诊断和评价人类受试者中的轻度创伤性脑损伤的方法,该方法包括:a)对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测心肌肌钙蛋白I (cTnI)的水平 and 早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP)或其组合;并且b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0638] 条款2、如条款1所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0639] 条款3、如条款2所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0640] 条款4、如条款3所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0641] 条款5、如条款4所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0642] 条款6、如条款2所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0643] 条款7、如条款6所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0644] 条款8、如条款7所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0645] 条款9、如条款1至8中任一项所述的方法,其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0646] 条款10、如条款1至9中任一项所述的方法,其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约500pg/mL或约550pg/mL。

[0647] 条款11、如条款1至9中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约70pg/mL、约100pg/mL或约150pg/mL。

[0648] 条款12、如条款1至11中任一项所述的方法,其中所述参考水平是:(a)通过具有至

少约85%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的；(b) 通过具有至少约87.5%的敏感性和至少约31%的特异性的测定法确定的；(c) 在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间；(d) 在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间；或在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0649] 条款13、如条款1至12中任一项所述的方法，其中所述样品在疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。

[0650] 条款14、如条款1至13中任一项所述的方法，所述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0651] 条款15、如条款1至14中任一项所述的方法，所述方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。

[0652] 条款16、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法，该方法包括：a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定，以测量或检测样品中心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平，其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合；并且b) 当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时，对受试者进行CT扫描，并且当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时，不对受试者进行CT扫描。

[0653] 条款17、如条款16所述的方法，其中所述样品在疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。

[0654] 条款18、如条款16或17所述的方法，其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

[0655] 条款19、如条款18所述的方法，其中基于所述CT扫描，所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0656] 条款20、如条款16至19中任一项所述的方法，其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

[0657] 条款21、如条款20所述的方法，其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0658] 条款22、如条款16至21中任一项所述的方法，其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0659] 条款23、如条款16至22中任一项所述的方法，其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约450pg/mL、或约550pg/mL。

[0660] 条款24、如条款16至22中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约50pg/mL、约100pg/mL、或约150pg/mL。

[0661] 条款25、如条款16至24中任一项所述的方法,其中所述参考水平是:(a)通过具有至少约65%至100%之间的敏感性和至少约29%至100%之间的特异性的测定法确定的;(b)通过具有至少约85%的敏感性和至少约33%的特异性的测定法确定的;(c)在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间;(d)在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间;或(e)在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0662] 条款26、一种帮助诊断和评价已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者的方法,该方法包括:a)对在疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测心肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且b)确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0663] 条款27、如条款26所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0664] 条款28、如条款27所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0665] 条款29、如条款28所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0666] 条款30、如条款29所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0667] 条款31、如条款27所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0668] 条款32、如条款31所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0669] 条款33、如条款32所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0670] 条款34、如条款26至33中任一项所述的方法,其中所述样品在疑似头部损伤之后约5分钟内、约10分钟内、约12分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约60分钟内或约90分钟内取得。

[0671] 条款35、如条款26至34中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤治疗治疗被评估为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0672] 条款36、如条款26至35中任一项所述的方法,所述方法进一步包括监测被评估为患有轻度创伤性脑损伤的受试者。

[0673] 条款37、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的受试者进行头部计

计算机断层(CT)扫描的方法,该方法包括:a)对在疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测样品中心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且b)当所述样品中cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者进行CT扫描,并且当所述样品中cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者进行CT扫描。

[0674] 条款38、如条款37所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

[0675] 条款39、如条款38所述的方法,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0676] 条款40、如条款37至39中任一项所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

[0677] 条款41、如条款40所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0678] 条款42、如条款37至41中任一项所述的方法,其中样品在疑似头部损伤之后约5分钟内、约10分钟内、约12分钟内、约15分钟内、约20分钟内、约30分钟内、约60分钟内或约90分钟内取得。

[0679] 条款43、如条款1至42中任一项所述的方法,其中测量cTnI的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0680] 条款44、如条款1至43中任一项所述的方法,其中测量所述cTnI的水平包括:A.使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1)cTnI捕获抗体,其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物,和(2)cTnI检测抗体,其包括可检测标记并且结合cTnI上未被cTnI捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,由此使得形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,以及B.基于通过cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中cTnI的量或浓度。

[0681] 条款45、如条款1至44中任一项所述的方法,其中所述样品选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

[0682] 条款46、如条款1至45中任一项所述的方法,其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得所述样品。

[0683] 条款47、如条款1至45中任一项所述的方法,其中在所述受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

[0684] 条款48、如条款47所述的方法,其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0685] 条款49、如条款1至45中任一项所述的方法,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0686] 条款50、如条款1至49中任一项所述的方法,其中所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室

值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高cTnI水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0687] 条款51、一种用于帮助诊断和评价人类受试者中的轻度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0688] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测心肌肌钙蛋白I (cTnI) 的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0689] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤 (TBI), 其中 (1) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或 (2) 当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0690] 条款52、如条款51所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0691] 条款53、如条款52所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0692] 条款54、如条款53所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0693] 条款55、如条款54所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0694] 条款56、如条款52所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0695] 条款57、如条款56所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0696] 条款58、如条款57所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0697] 条款59、如条款51至58中任一项所述的方法,其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0698] 条款60、如条款51至59中任一项所述的方法,其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约500pg/mL或约550pg/mL。

[0699] 条款61、如条款51至60中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约70pg/mL、约100pg/mL或约150pg/mL。

[0700] 条款62、如条款51至61中任一项所述的方法,其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约85%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;(b) 通过具有至少约87.5%的敏感性和至少约31%的特异性的测定法确定的;(c) 在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间;(d) 在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间;或在至少约1pg/mL至约

1000pg/mL之间。

[0701] 条款63、如条款51至62中任一项所述的方法,其中所述样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。

[0702] 条款64、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法,所述方法包括:

[0703] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测所述样品中cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且

[0704] b) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行CT扫描,并且当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行CT扫描。

[0705] 条款65、如条款64所述的方法,其中所述样品在疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。

[0706] 条款66、如条款64或65所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

[0707] 条款67、如条款66所述的方法,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0708] 条款68、如条款64至67中任一项所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

[0709] 条款69、如条款68所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0710] 条款70、如条款64至69中任一项所述的方法,其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0711] 条款71、如条款64至70中任一项所述的方法,其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约450pg/mL或约550pg/mL。

[0712] 条款72、如条款64至71中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约50pg/mL、约100pg/mL或约150pg/mL。

[0713] 条款73、如条款64至71中任一项所述的方法,其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约65%至100%之间的敏感性和至少约29%至100%之间的特异性的测定法确定的;(b) 通过具有至少约85%的敏感性和至少约33%的特异性的测定法确定的;(c) 在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间;(d) 在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间;或(e) 在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0714] 条款74、一种用于帮助诊断和评价人类受试者中的轻度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0715] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;和

[0716] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度TBI,其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0717] 条款75、如条款74所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0718] 条款76、如条款75所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0719] 条款77、如条款76所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0720] 条款78、如条款77所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0721] 条款79、如条款75所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0722] 条款80、如条款79所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0723] 条款81、如条款30所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0724] 条款82、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法,所述方法包括:

[0725] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测所述样品中心肌肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且

[0726] b) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行CT扫描,并且当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行CT扫描。

[0727] 条款83、如条款82所述的方法,其中所述样品在所述实际或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22

小时内、约23小时内或约24小时内取自所述受试者。

[0728] 条款84、如条款82或83所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

[0729] 条款85、如条款84所述的方法,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0730] 条款86、如条款82至85中任一项所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

[0731] 条款87、如条款86所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0732] 条款88、一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0733] a) 对在实际头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;

[0734] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且

[0735] c) 用创伤性脑损伤治疗治疗评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0736] 条款89、如条款88所述的方法,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0737] 条款90、一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0738] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;

[0739] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且

[0740] c) 用创伤性脑损伤治疗治疗评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0741] 条款91、如条款90所述的方法,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0742] 条款92、如条款51至91中任一项所述的方法,其进一步包括用至少一种心肌保护疗法治疗所述受试者。

[0743] 条款93、如条款92所述的方法,其中所述至少一种心肌保护疗法包含 β 阻断剂、利尿剂、血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂、钙通道阻滞剂、脂质降低疗法、斯达汀、硝酸盐、抗血小板药、抗凝血剂、抗凝剂或其组合。

[0744] 条款94、如条款51至93中任一项所述的方法,其中测量所述cTnI的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0745] 条款95、如条款51至94中任一项所述的方法,其中测量所述cTnI的水平包括:

[0746] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0747] (1) cTnI捕获抗体,其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物,和

[0748] (2) cTnI检测抗体,其包括可检测标记并结合cTnI上不被所述cTnI捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,

[0749] 使得形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,以及

[0750] B. 基于通过所述cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中cTnI的量或浓度。

[0751] 条款96、如条款51至95中任一项所述的方法,其中所述样品选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

[0752] 条款97、如条款51至96中任一项所述的方法,其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得所述样品。

[0753] 条款98、如条款51至97中任一项所述的方法,其中在所述受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

[0754] 条款99、如条款98所述的方法,其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0755] 条款100、如条款51至99中任一项所述的方法,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0756] 条款101、如条款51至100中任一项所述的方法,其中所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高cTnI水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0757] 条款102、如条款51至101中任一项所述的方法,其中所述样品是全血样品。

[0758] 条款103、如条款51至101中任一项所述的方法,其中所述样品是血清样品。

[0759] 条款104、如条款51至101中任一项所述的方法,其中所述样品是血浆样品。

[0760] 条款105、如条款102至104中任一项所述的方法,其中所述测定是免疫测定法。

[0761] 条款106、如条款102至104中任一项所述的方法,其中所述测定是临床化学测定法。

[0762] 条款107、如条款102至104中任一项所述的方法,其中所述测定是单分子检测测定

法。

[0763] 条款108、一种用于评价人类受试者的人类受试者中轻度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0764] a) 对在实际疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测心肌钙蛋白I (cTnI) 的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;和

[0765] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤 (TBI),其中 (1) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或 (2) 当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0766] 条款109、如条款108所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0767] 条款110、如条款109所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0768] 条款111、如条款110所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0769] 条款112、如条款111所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0770] 条款113、如条款108所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0771] 条款114、如条款113所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0772] 条款115、如条款114所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0773] 条款116、如条款108至115中任一项所述的方法,其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0774] 条款117、如条款108至116中任一项所述的方法,其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约500pg/mL或约550pg/mL。

[0775] 条款118、如条款108至117中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约70pg/mL、约100pg/mL或约150pg/mL。

[0776] 条款119、如条款108至118中任一项所述的方法,其中所述参考水平是 (a) 通过具有至少约85%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的; (b) 通过具有至少约87.5%的敏感性和至少约31%的特异性的测定法确定的; (c) 在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间; (d) 在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间;或在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0777] 条款120、如条款108至119中任一项所述的方法,其中所述样品在头部损伤或疑似

头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取得。

[0778] 条款121、一种确定是否对患有实际或疑似头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法,所述方法包括:

[0779] a) 对在头部损伤或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测所述样品中cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且

[0780] b) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行CT扫描并且当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行CT扫描。

[0781] 条款122、如条款121所述的方法,其中所述样品在所述实际头部损伤或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取自所述受试者。

[0782] 条款123、如条款121或122所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过CT扫描。

[0783] 条款124、如条款123所述的方法,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0784] 条款125、如条款121至124中任一项所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。

[0785] 条款126、如条款125所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0786] 条款127、如条款121至126中任一项所述的方法,其中所述cTnI的参考水平为约5pg/mL、约10pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约35pg/mL或约50pg/mL。

[0787] 条款128、如条款121至127中任一项所述的方法,其中UCH-L1的参考水平为约400pg/mL、约450pg/mL或约550pg/mL。

[0788] 条款129、如条款121至128中任一项所述的方法,其中GFAP的参考水平为约50pg/mL、约100pg/mL或约150pg/mL。

[0789] 条款130、如条款121至129中任一项所述的方法,其中所述参考水平是(a)通过具有至少约65%至100%之间的敏感性和至少约29%至100%之间的特异性的测定法确定的;(b)通过具有至少约85%的敏感性和至少约33%的特异性的测定法确定的;(c)在至少约1pg/mL至约100pg/mL之间;(d)在至少约1pg/mL至约500pg/mL之间;或(e)在至少约1pg/mL至约1000pg/mL之间。

[0790] 条款131、一种用于评价人类受试者的人类受试者中轻度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0791] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;并且

[0792] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度TBI,其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤。

[0793] 条款132、如条款131所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过格拉斯哥昏迷量表评分。

[0794] 条款133、如条款132所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤。

[0795] 条款134、如条款133所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0796] 条款135、如条款134所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为3-12相关联。

[0797] 条款136、如条款135所述的方法,其中基于所述格拉斯哥昏迷量表评分,所述受试者疑似患有轻度创伤性脑损伤。

[0798] 条款137、如条款136所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与患有轻度创伤性脑损伤的受试者相关联。

[0799] 条款138、如条款137所述的方法,其中将所述参考水平与格拉斯哥昏迷量表评分为13-15相关联。

[0800] 条款139、一种确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行头部计算机断层(CT)扫描的方法,所述方法包括:

[0801] a) 对在头部损伤或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测所述样品中心肌钙蛋白I(cTnI)的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且早期生物标记物包含泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且

[0802] b) 当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者进行CT扫描,并且当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者进行CT扫描。

[0803] 条款140、如条款139所述的方法,其中所述样品在实际或疑似头部损伤约30分钟内、约1小时内、约2小时内、约3小时内、约4小时内、约5小时内、约6小时内、约7小时内、约8小时内、约9小时内、约10小时内、约11小时内、约12小时内、约13小时内、约14小时内、约15小时内、约16小时内、约17小时内、约18小时内、约19小时内、约20小时内、约21小时内、约22小时内、约23小时内或约24小时内取自所述受试者。

[0804] 条款141、如条款139或140所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之

后接受过CT扫描。

[0805] 条款142、如条款141所述的方法,其中基于所述CT扫描,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0806] 条款143、如条款139至142中任一项所述的方法,其中将所述cTnI和所述早期生物标记物的参考水平与阳性头部计算机断层扫描相关联。条款144、如条款143所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受过头部损伤的对照受试者相关联。

[0807] 条款145、一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0808] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;

[0809] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且

[0810] c) 用创伤性脑损伤治疗治疗评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0811] 条款146、如条款145所述的方法,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0812] 条款147、一种治疗人类受试者中轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的方法,所述方法包括:

[0813] a) 对在实际或疑似头部损伤之后约2小时内获自所述受试者的样品进行测定,以测量或检测cTnI的水平和早期生物标记物的水平,其中所述样品是生物样品并且所述早期生物标记物包含UCH-L1、GFAP或其组合;

[0814] b) 确定所述受试者是否已遭受轻度或中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤(TBI),其中(1)当所述样品中所述cTnI的水平高于cTnI的参考水平并且所述样品中所述早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤,或(2)当所述样品中所述cTnI的水平低于cTnI的参考水平和/或所述样品中所述早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,所述受试者确定为患有轻度创伤性脑损伤;并且

[0815] c) 用创伤性脑损伤治疗治疗评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0816] 条款148、如条款147所述的方法,其进一步包括监测所述评估为患有轻度、中度、重度、或中度至重度创伤性脑损伤的受试者。

[0817] 条款149、如条款108至148中任一项所述的方法,其进一步包括用至少一种心肌保护疗法治疗所述受试者。

[0818] 条款150、如条款149所述的方法,其中所述至少一种心肌保护疗法包含 β 阻断剂、

利尿剂、血管紧张素转换酶 (ACE) 抑制剂、钙通道阻滞剂、脂质降低疗法、斯达、硝酸盐、抗血小板药、抗凝血剂、抗凝剂或其组合。

[0819] 条款151、如条款108至150中任一项所述的方法,其中测量cTnI的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0820] 条款152、如条款108至151中任一项所述的方法,其中测量所述cTnI的水平包括:

[0821] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0822] (1) cTnI捕获抗体,其结合cTnI或cTnI片段上的表位以形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原复合物,和

[0823] (2) cTnI检测抗体,其包括可检测标记并结合cTnI上不被所述cTnI捕获抗体结合的表位,以形成cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,

[0824] 使得形成cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物,以及

[0825] B. 基于通过所述cTnI捕获抗体-cTnI抗原-cTnI检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中cTnI的量或浓度。

[0826] 条款153、如条款108至152中任一项所述的方法,其中所述样品选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

[0827] 条款154、如条款108至153中任一项所述的方法,其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得所述样品。

[0828] 条款155、如条款108至153中任一项所述的方法,其中在所述受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

[0829] 条款156、如条款155所述的方法,其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0830] 条款157、如条款108至156中任一项所述的方法,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0831] 条款158、如条款108至157中任一项所述的方法,其中所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高cTnI水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0832] 条款159、如条款108至158中任一项所述的方法,其中所述样品是全血样品。

[0833] 条款160、如条款108至158中任一项所述的方法,其中所述样品是血清样品。

[0834] 条款161、如条款108至158中任一项所述的方法,其中所述样品是血浆样品。

[0835] 条款162、如条款159至161中任一项所述的方法,其中所述测定是免疫测定法。

[0836] 条款163、如条款159至161中任一项所述的方法,其中所述测定是临床化学测定法。

[0837] 条款164、如条款159至161中任一项所述的方法,其中所述测定是单分子检测测定法。

序列表

- <110> 雅培实验室
- <120> 用心肌肌钙蛋白I和早期生物标记物帮助诊断和评价人受试者中轻度创伤性脑损伤的方法
- <130> ABBTL-36103/WO-1/ORD
- <140> PCT/US2018/035231
<141> 2018-05-30
- <150> US 62/512,688
<151> 2017-05-30
- <150> US 62/512,710
<151> 2017-05-30
- <150> US 62/528,214
<151> 2017-07-03
- <160> 6
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
<211> 210
<212> PRT
<213> 智人
- <400> 1
- Met Ala Asp Gly Ser Ser Asp Ala Ala Arg Glu Pro Arg Pro Ala Pro
1 5 10 15
- Ala Pro Ile Arg Arg Arg Ser Ser Asn Tyr Arg Ala Tyr Ala Thr Glu
20 25 30
- Pro His Ala Lys Lys Lys Ser Lys Ile Ser Ala Ser Arg Lys Leu Gln
35 40 45
- Leu Lys Thr Leu Leu Leu Gln Ile Ala Lys Gln Glu Leu Glu Arg Glu
50 55 60
- Ala Glu Glu Arg Arg Gly Glu Lys Gly Arg Ala Leu Ser Thr Arg Cys
65 70 75 80
- Gln Pro Leu Glu Leu Ala Gly Leu Gly Phe Ala Glu Leu Gln Asp Leu
85 90 95

Cys Arg Gln Leu His Ala Arg Val Asp Lys Val Asp Glu Glu Arg Tyr
100 105 110

Asp Ile Glu Ala Lys Val Thr Lys Asn Ile Thr Glu Ile Ala Asp Leu
115 120 125

Thr Gln Lys Ile Phe Asp Leu Arg Gly Lys Phe Lys Arg Pro Thr Leu
130 135 140

Arg Arg Val Arg Ile Ser Ala Asp Ala Met Met Gln Ala Leu Leu Gly
145 150 155 160

Ala Arg Ala Lys Glu Ser Leu Asp Leu Arg Ala His Leu Lys Gln Val
165 170 175

Lys Lys Glu Asp Thr Glu Lys Glu Asn Arg Glu Val Gly Asp Trp Arg
180 185 190

Lys Asn Ile Asp Ala Leu Ser Gly Met Glu Gly Arg Lys Lys Lys Phe
195 200 205

[0002]

Glu Ser
210

<210> 2

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Gln Leu Lys Pro Met Glu Ile Asn Pro Glu Met Leu Asn Lys Val
1 5 10 15

Leu Ser Arg Leu Gly Val Ala Gly Gln Trp Arg Phe Val Asp Val Leu
20 25 30

Gly Leu Glu Glu Glu Ser Leu Gly Ser Val Pro Ala Pro Ala Cys Ala
35 40 45

Leu Leu Leu Leu Phe Pro Leu Thr Ala Gln His Glu Asn Phe Arg Lys
50 55 60

Lys Gln Ile Glu Glu Leu Lys Gly Gln Glu Val Ser Pro Lys Val Tyr

65	70	75	80
Phe Met Lys Gln Thr Ile Gly Asn Ser Cys Gly Thr Ile Gly Leu Ile 85 90 95			
His Ala Val Ala Asn Asn Gln Asp Lys Leu Gly Phe Glu Asp Gly Ser 100 105 110			
Val Leu Lys Gln Phe Leu Ser Glu Thr Glu Lys Met Ser Pro Glu Asp 115 120 125			
Arg Ala Lys Cys Phe Glu Lys Asn Glu Ala Ile Gln Ala Ala His Asp 130 135 140			
Ala Val Ala Gln Glu Gly Gln Cys Arg Val Asp Asp Lys Val Asn Phe 145 150 155 160			
His Phe Ile Leu Phe Asn Asn Val Asp Gly His Leu Tyr Glu Leu Asp 165 170 175			
[0003] Gly Arg Met Pro Phe Pro Val Asn His Gly Ala Ser Ser Glu Asp Thr 180 185 190			
Leu Leu Lys Asp Ala Ala Lys Val Cys Arg Glu Phe Thr Glu Arg Glu 195 200 205			
Gln Gly Glu Val Arg Phe Ser Ala Val Ala Leu Cys Lys Ala Ala 210 215 220			
<210> 3			
<211> 432			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 3			
Met Glu Arg Arg Arg Ile Thr Ser Ala Ala Arg Arg Ser Tyr Val Ser 1 5 10 15			
Ser Gly Glu Met Met Val Gly Gly Leu Ala Pro Gly Arg Arg Leu Gly 20 25 30			
Pro Gly Thr Arg Leu Ser Leu Ala Arg Met Pro Pro Pro Leu Pro Thr 35 40 45			

Arg Val Asp Phe Ser Leu Ala Gly Ala Leu Asn Ala Gly Phe Lys Glu
50 55 60

Thr Arg Ala Ser Glu Arg Ala Glu Met Met Glu Leu Asn Asp Arg Phe
65 70 75 80

Ala Ser Tyr Ile Glu Lys Val Arg Phe Leu Glu Gln Gln Asn Lys Ala
85 90 95

Leu Ala Ala Glu Leu Asn Gln Leu Arg Ala Lys Glu Pro Thr Lys Leu
100 105 110

Ala Asp Val Tyr Gln Ala Glu Leu Arg Glu Leu Arg Leu Arg Leu Asp
115 120 125

Gln Leu Thr Ala Asn Ser Ala Arg Leu Glu Val Glu Arg Asp Asn Leu
130 135 140

Ala Gln Asp Leu Ala Thr Val Arg Gln Lys Leu Gln Asp Glu Thr Asn
145 150 155 160

[0004]

Leu Arg Leu Glu Ala Glu Asn Asn Leu Ala Ala Tyr Arg Gln Glu Ala
165 170 175

Asp Glu Ala Thr Leu Ala Arg Leu Asp Leu Glu Arg Lys Ile Glu Ser
180 185 190

Leu Glu Glu Glu Ile Arg Phe Leu Arg Lys Ile His Glu Glu Glu Val
195 200 205

Arg Glu Leu Gln Glu Gln Leu Ala Arg Gln Gln Val His Val Glu Leu
210 215 220

Asp Val Ala Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Lys Glu Ile Arg Thr
225 230 235 240

Gln Tyr Glu Ala Met Ala Ser Ser Asn Met His Glu Ala Glu Glu Trp
245 250 255

Tyr Arg Ser Lys Phe Ala Asp Leu Thr Asp Ala Ala Ala Arg Asn Ala
260 265 270

Glu Leu Leu Arg Gln Ala Lys His Glu Ala Asn Asp Tyr Arg Arg Gln
275 280 285

Leu Gln Ser Leu Thr Cys Asp Leu Glu Ser Leu Arg Gly Thr Asn Glu
290 295 300

Ser Leu Glu Arg Gln Met Arg Glu Gln Glu Glu Arg His Val Arg Glu
305 310 315 320

Ala Ala Ser Tyr Gln Glu Ala Leu Ala Arg Leu Glu Glu Glu Gly Gln
325 330 335

Ser Leu Lys Asp Glu Met Ala Arg His Leu Gln Glu Tyr Gln Asp Leu
340 345 350

Leu Asn Val Lys Leu Ala Leu Asp Ile Glu Ile Ala Thr Tyr Arg Lys
355 360 365

[0005] Leu Leu Glu Gly Glu Glu Asn Arg Ile Thr Ile Pro Val Gln Thr Phe
370 375 380

Ser Asn Leu Gln Ile Arg Glu Thr Ser Leu Asp Thr Lys Ser Val Ser
385 390 395 400

Glu Gly His Leu Lys Arg Asn Ile Val Val Lys Thr Val Glu Met Arg
405 410 415

Asp Gly Glu Val Ile Lys Glu Ser Lys Gln Glu His Lys Asp Val Met
420 425 430

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 4

His His His His His His
1 5

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 5

Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

[0006]

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 6

Ala Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

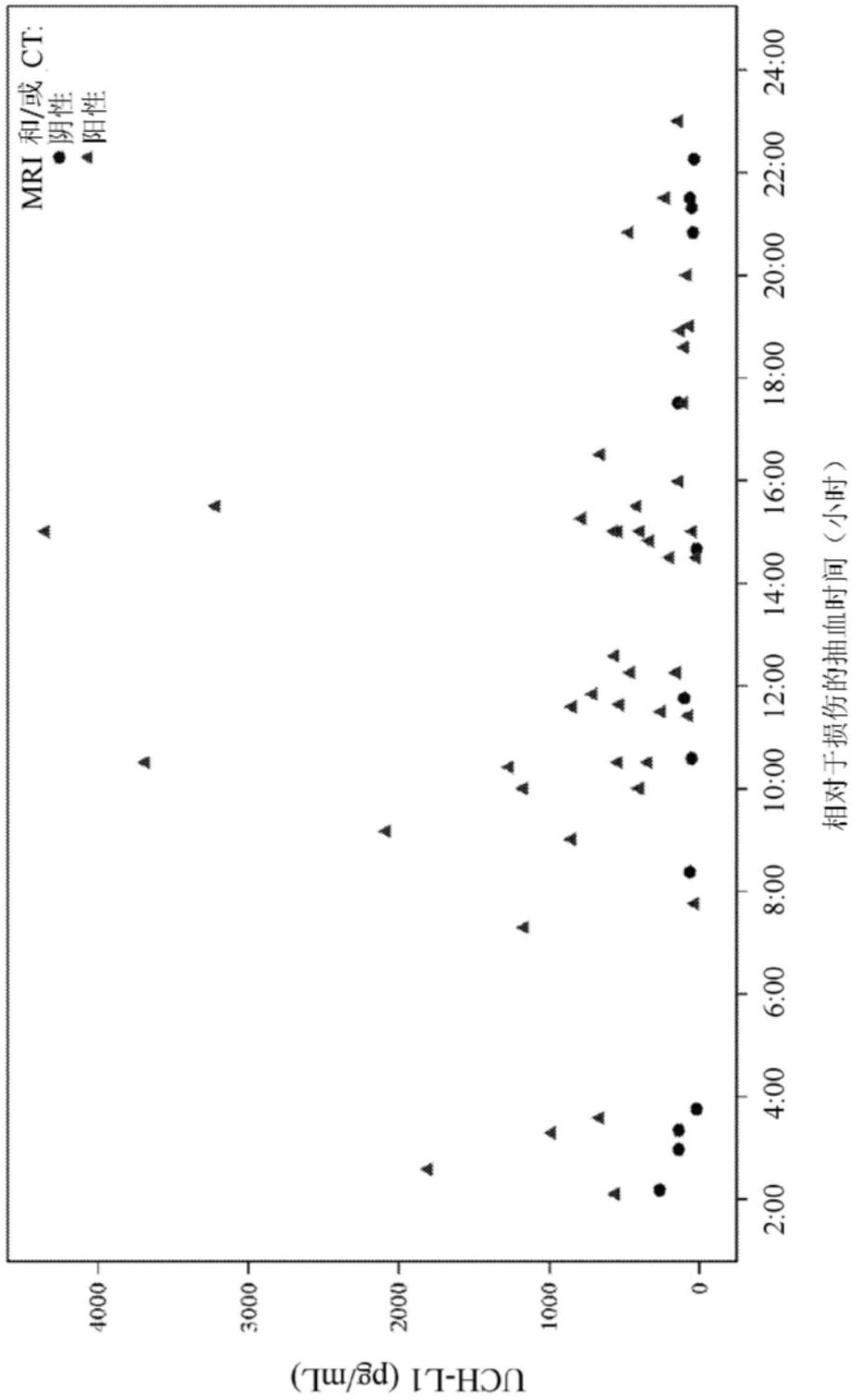


图1

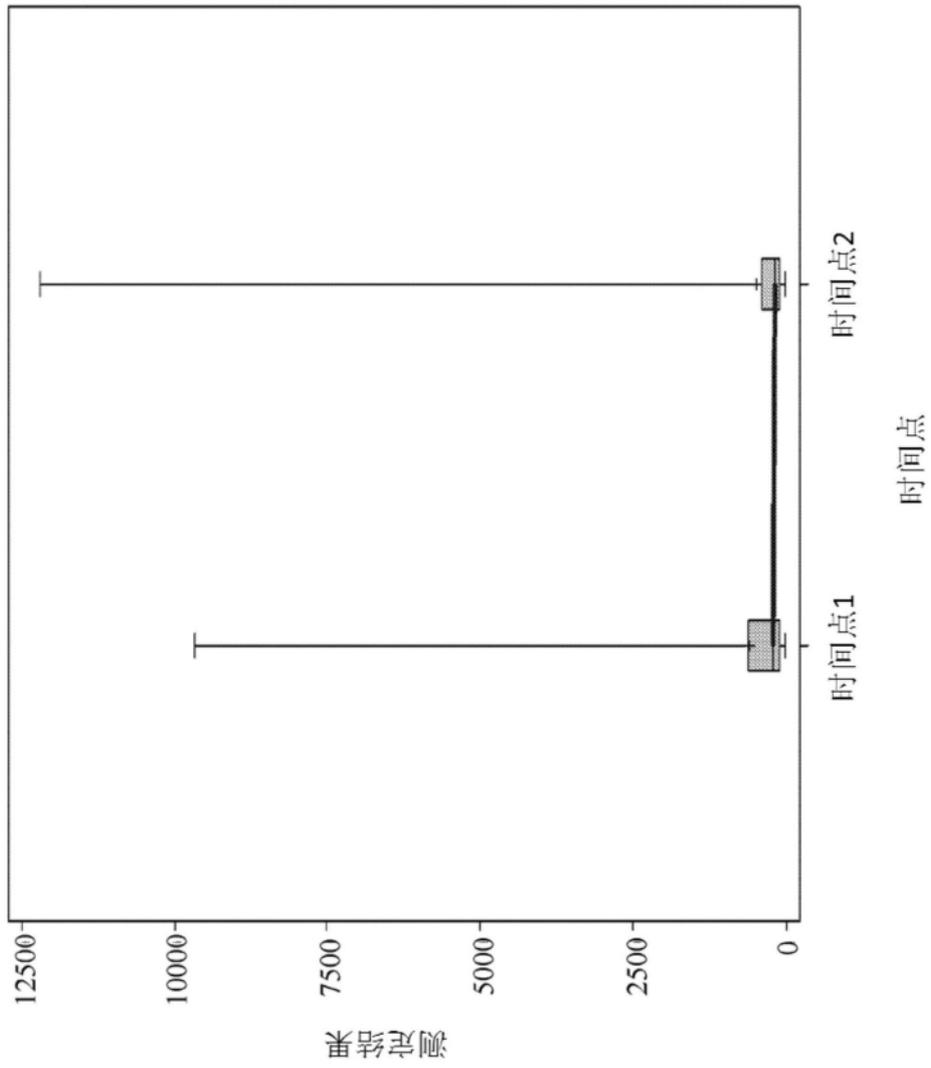


图2

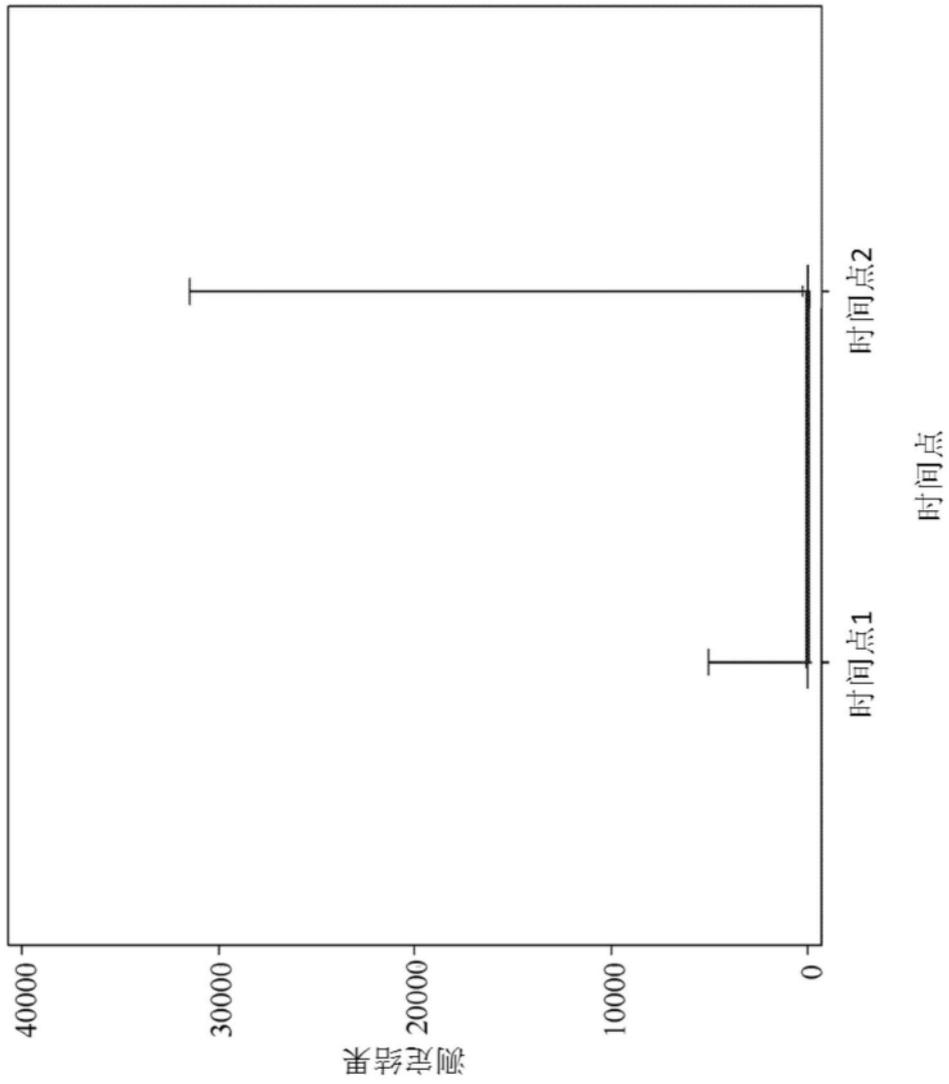


图3

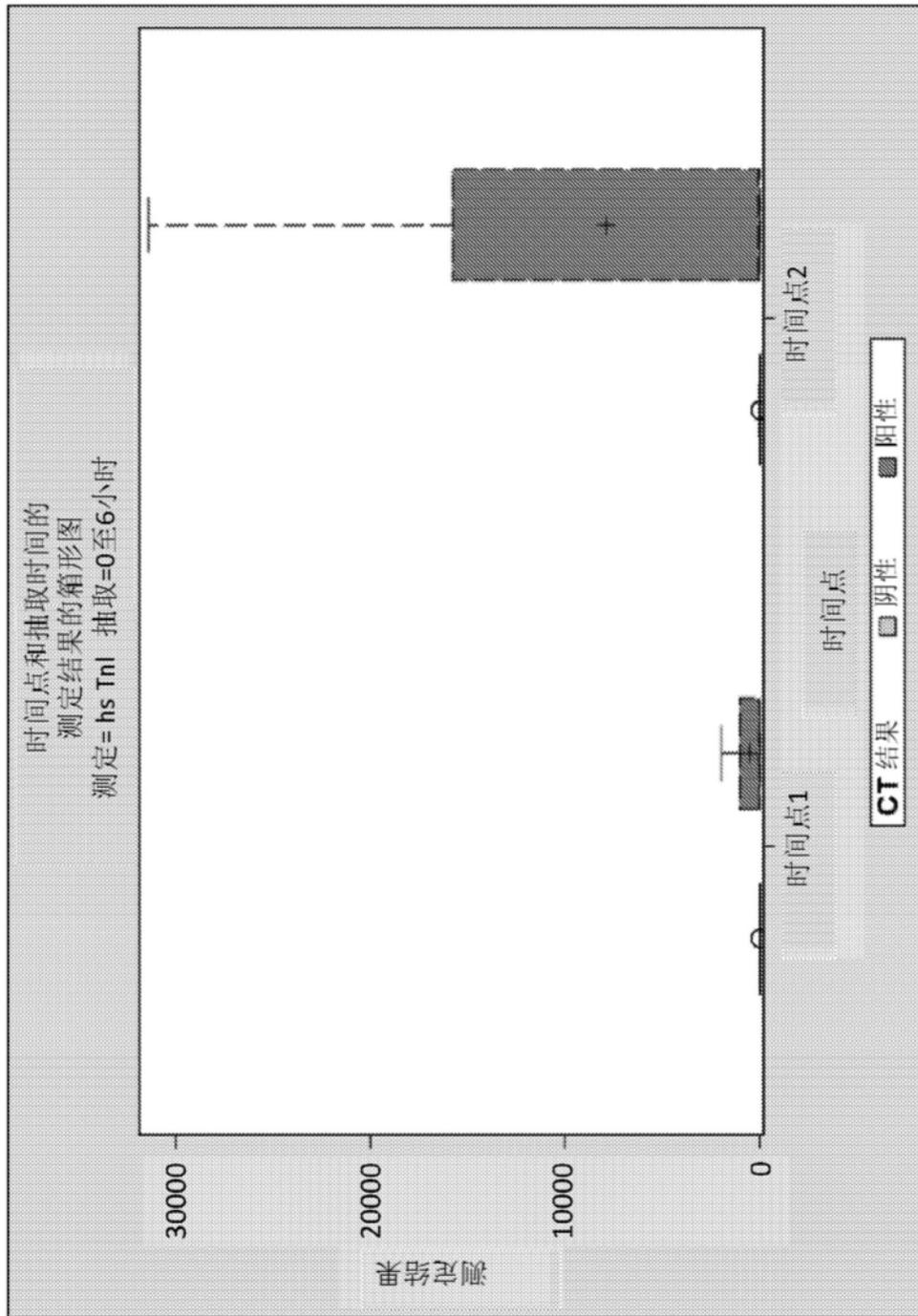


图4

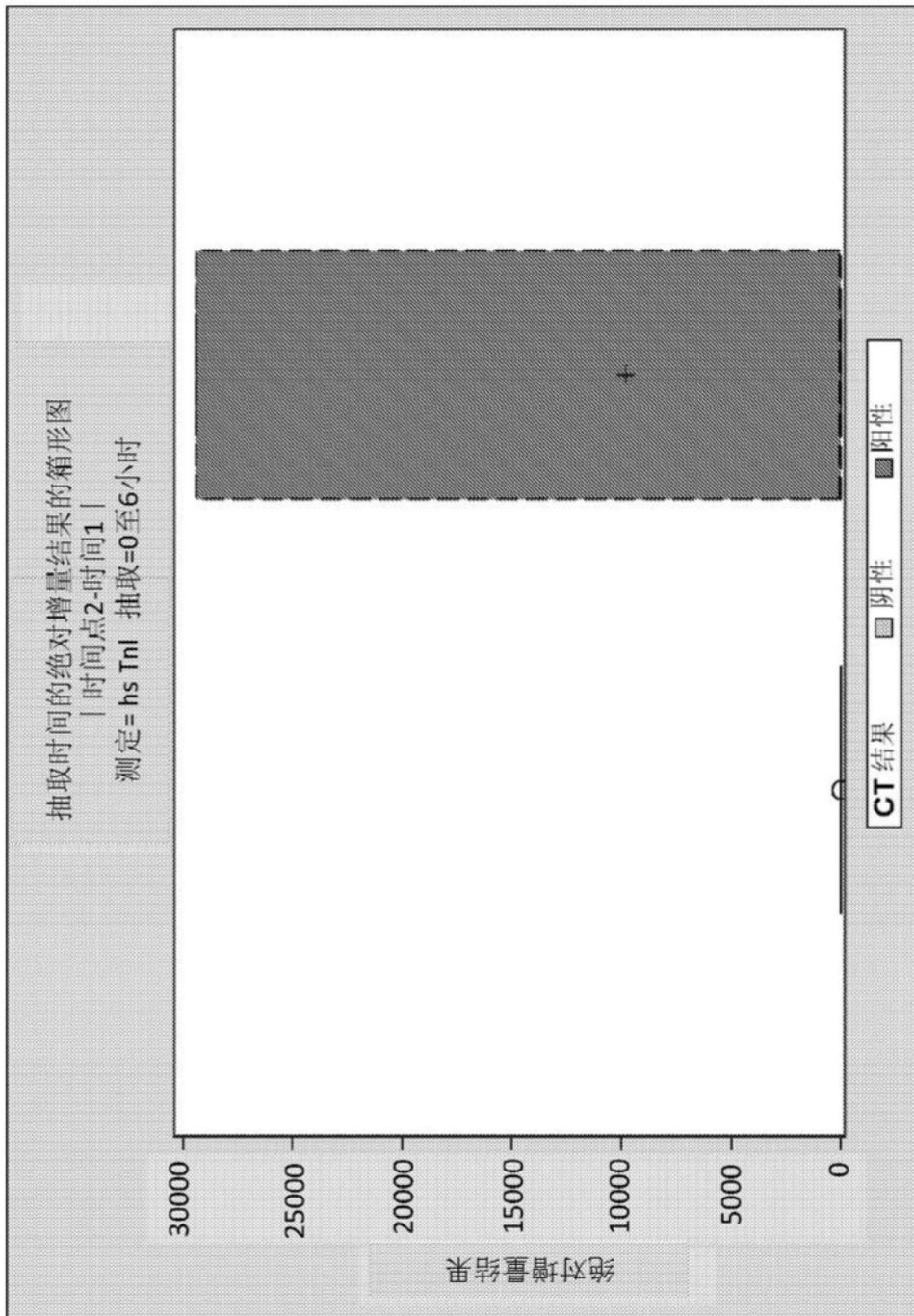


图5

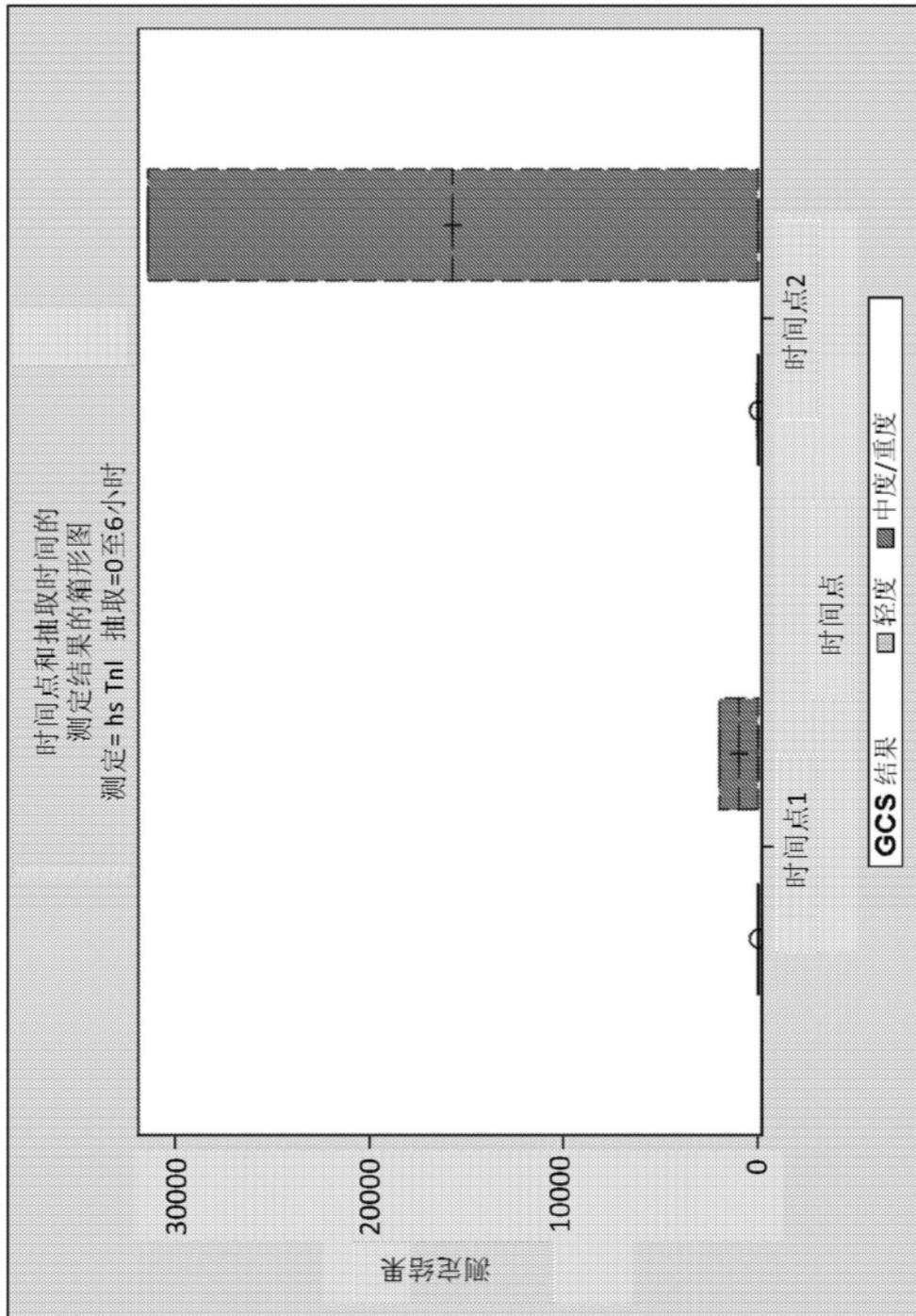


图6

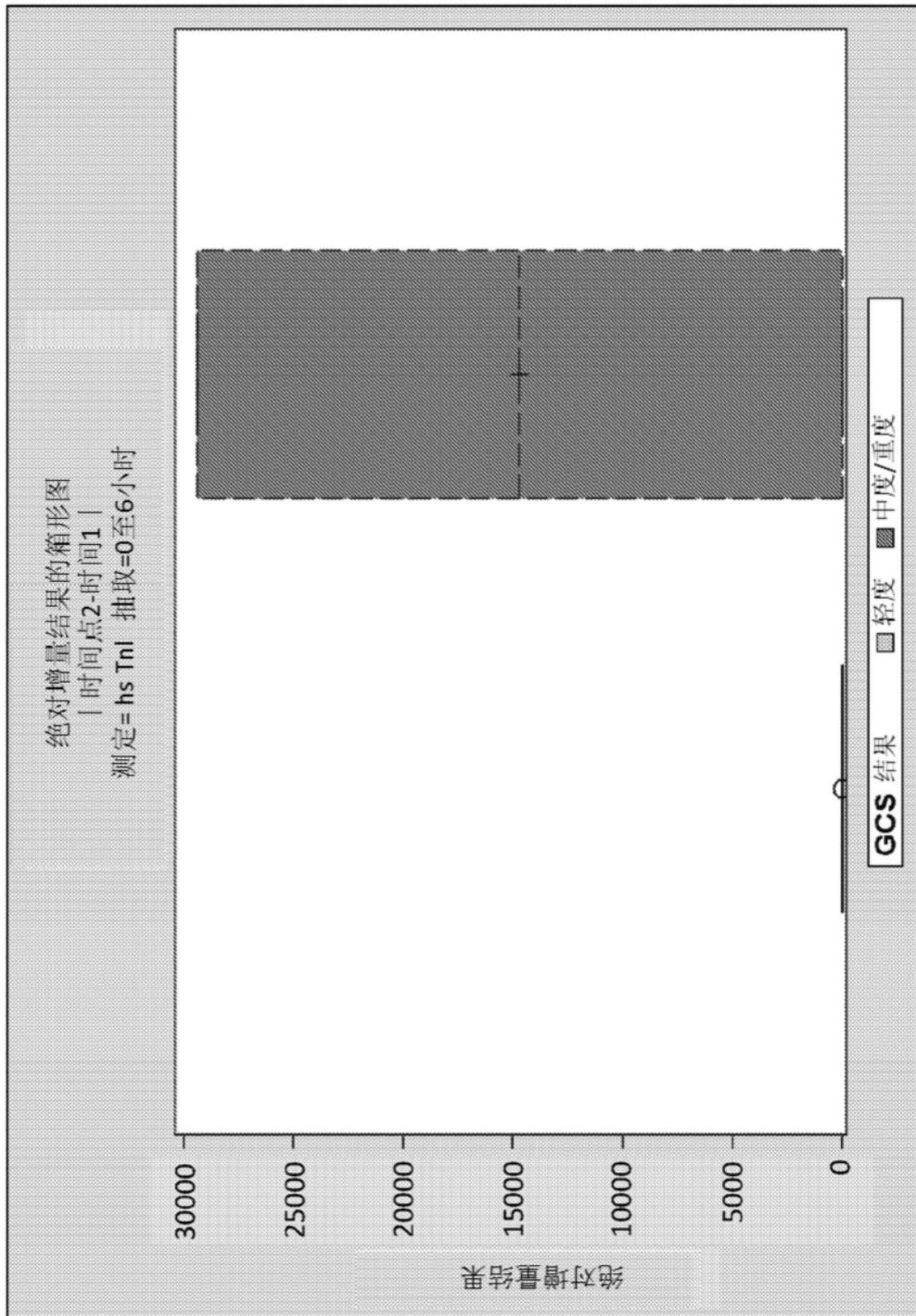


图7

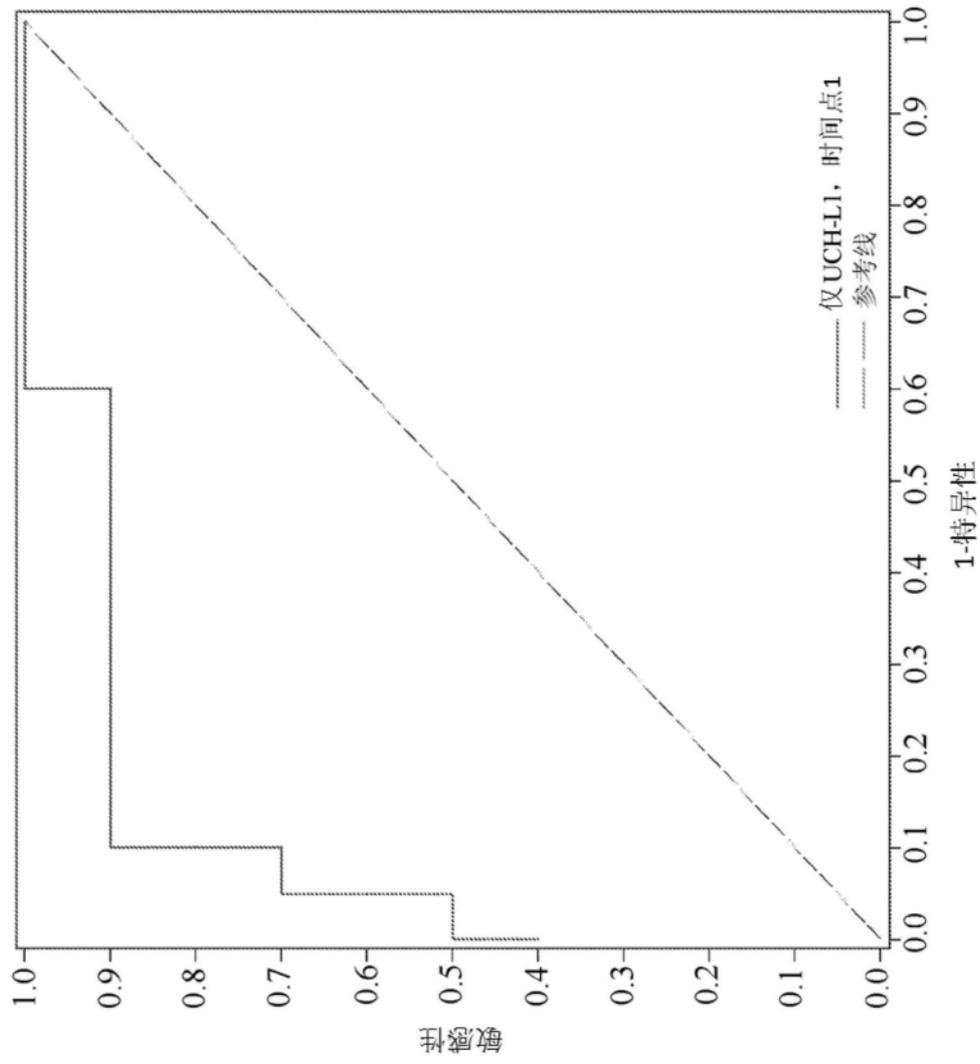


图8

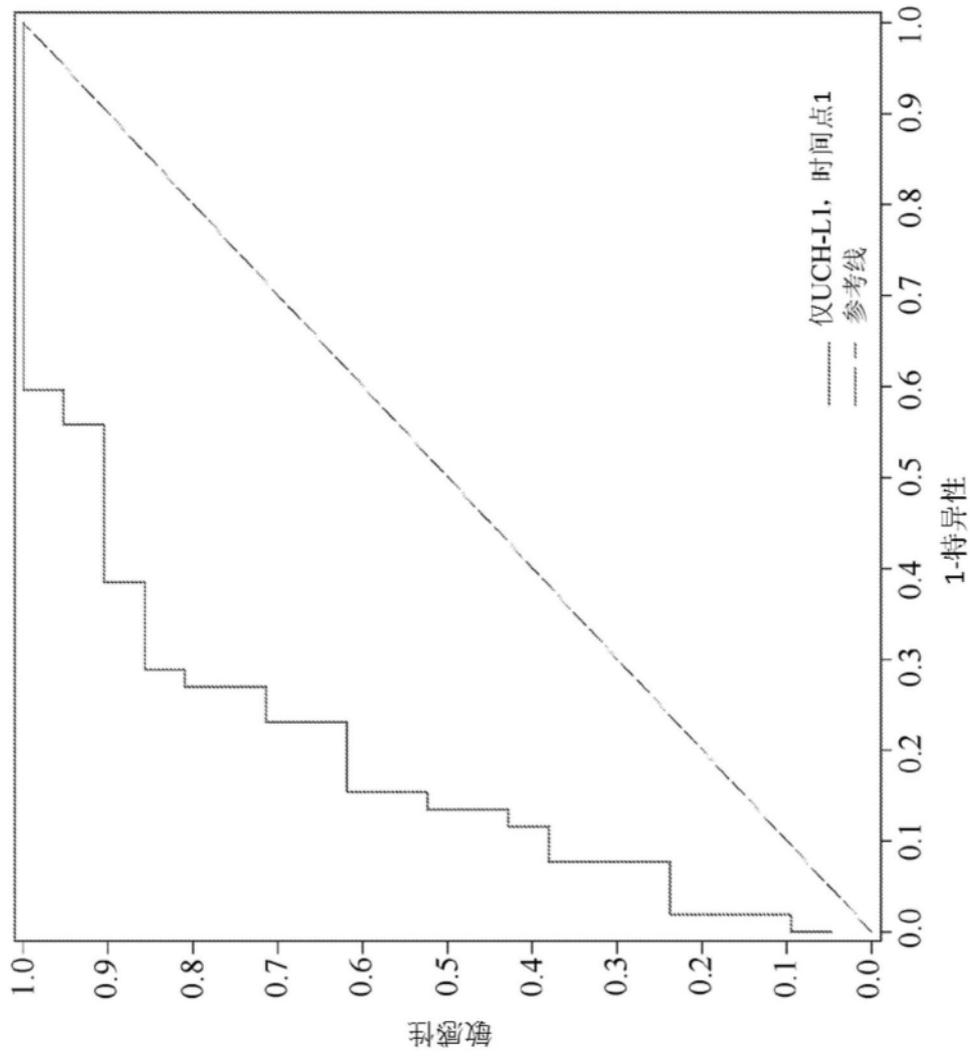


图9

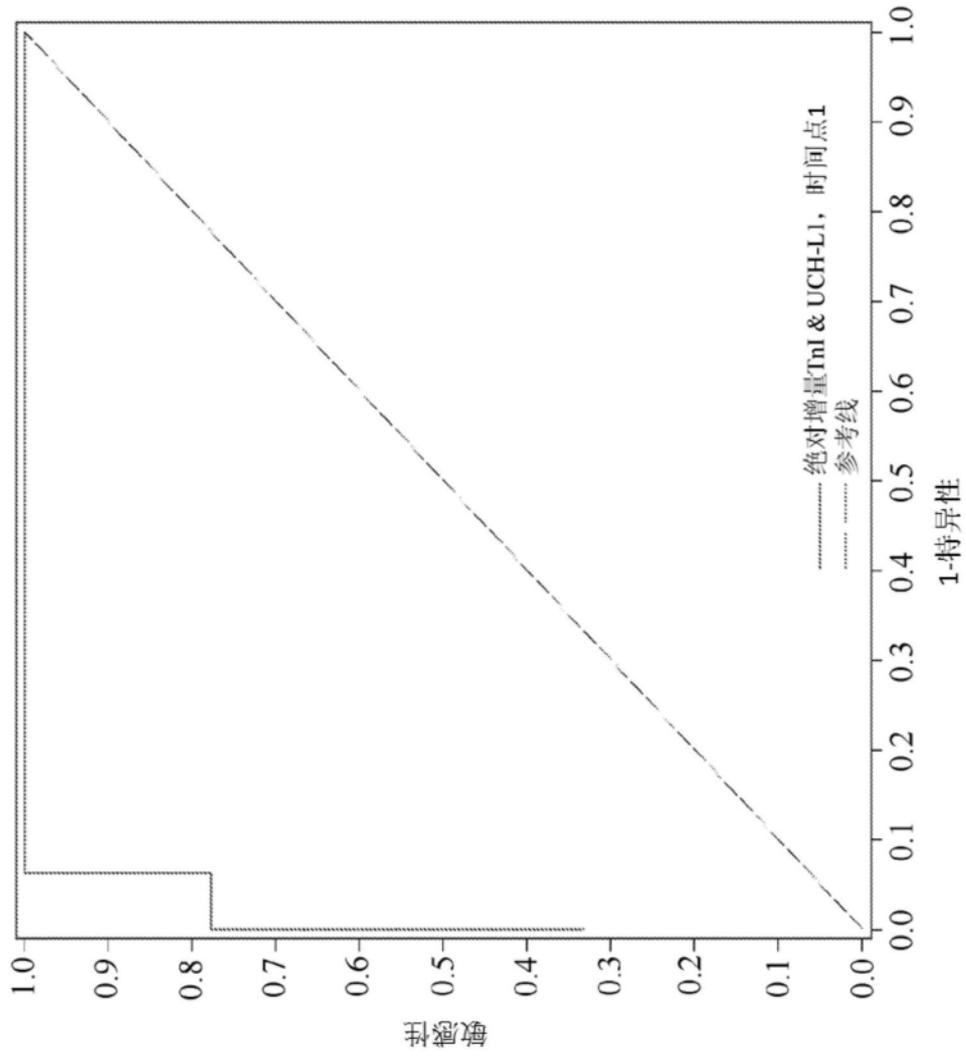


图10

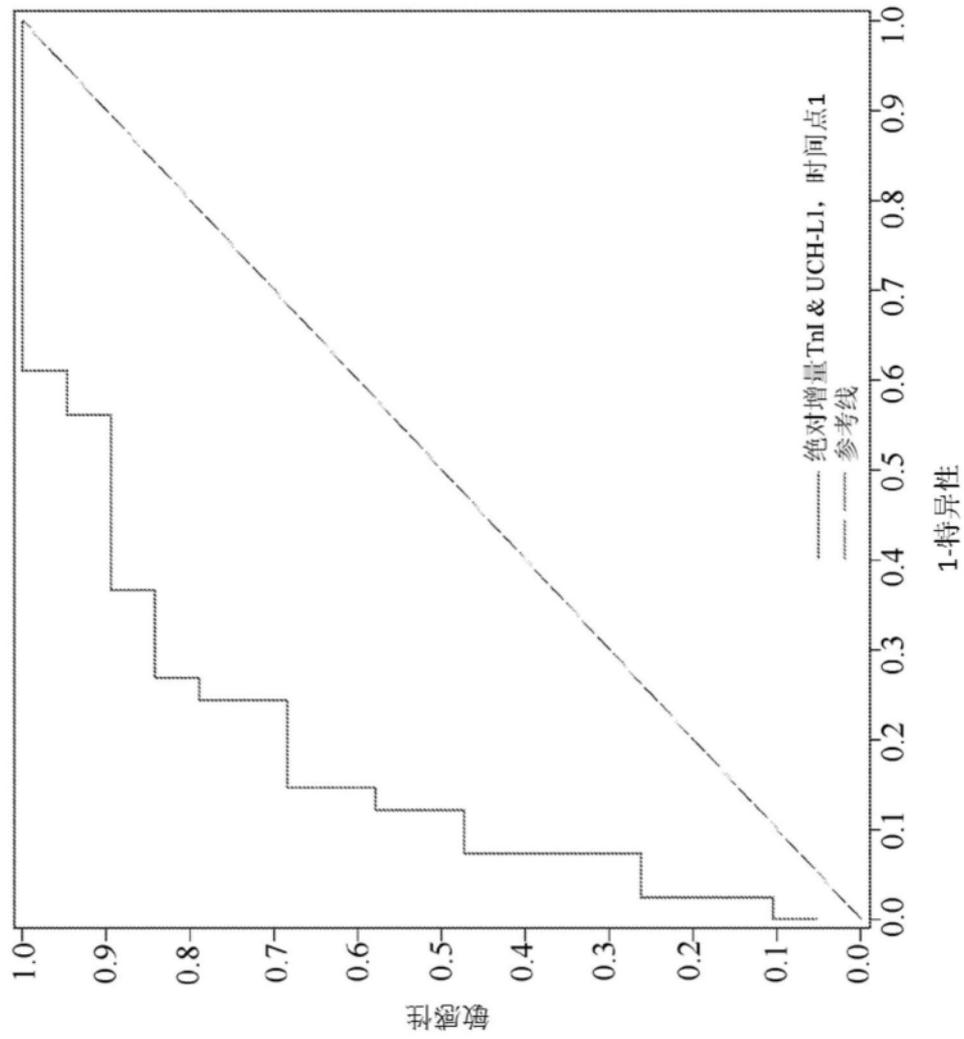


图11

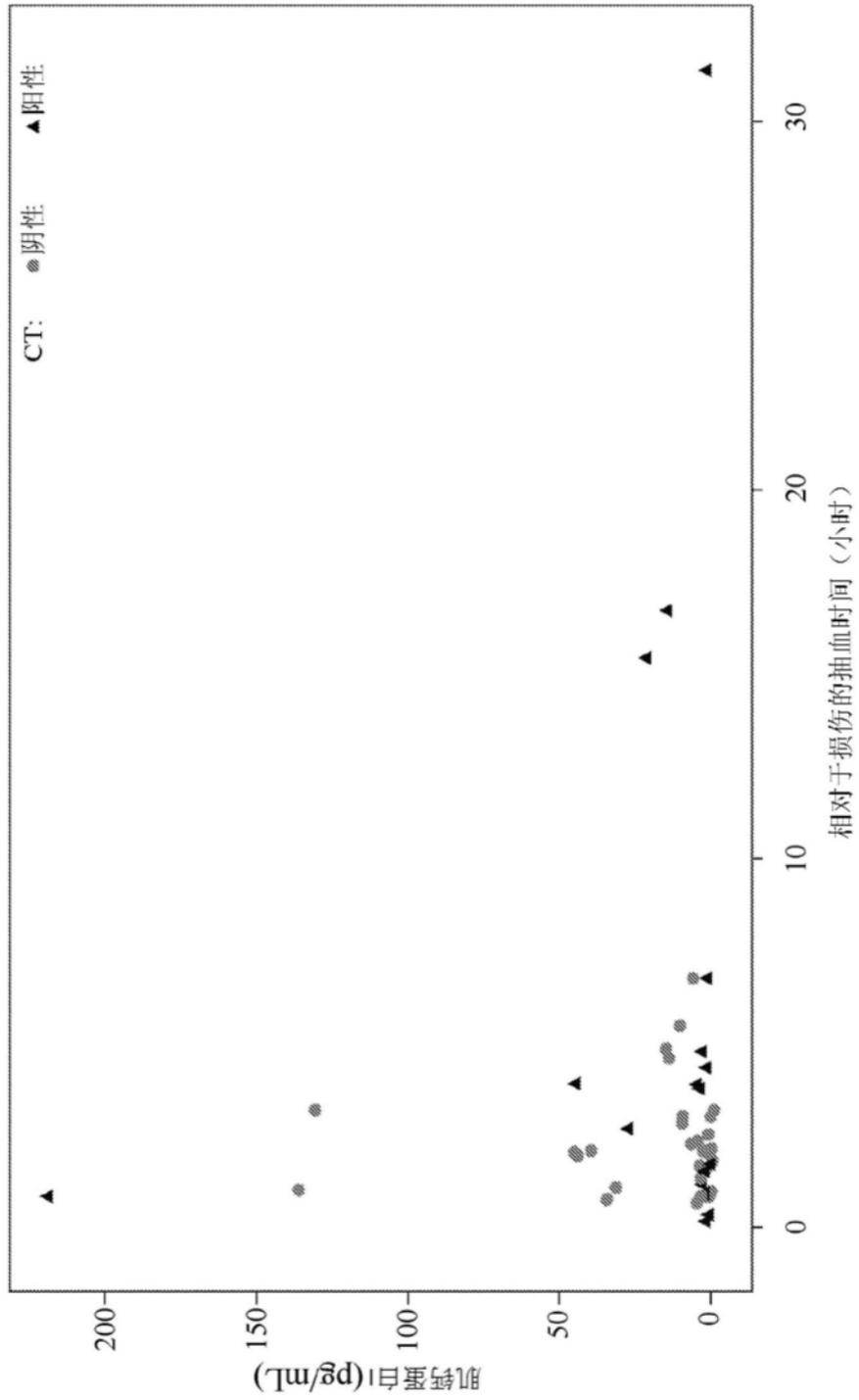


图12

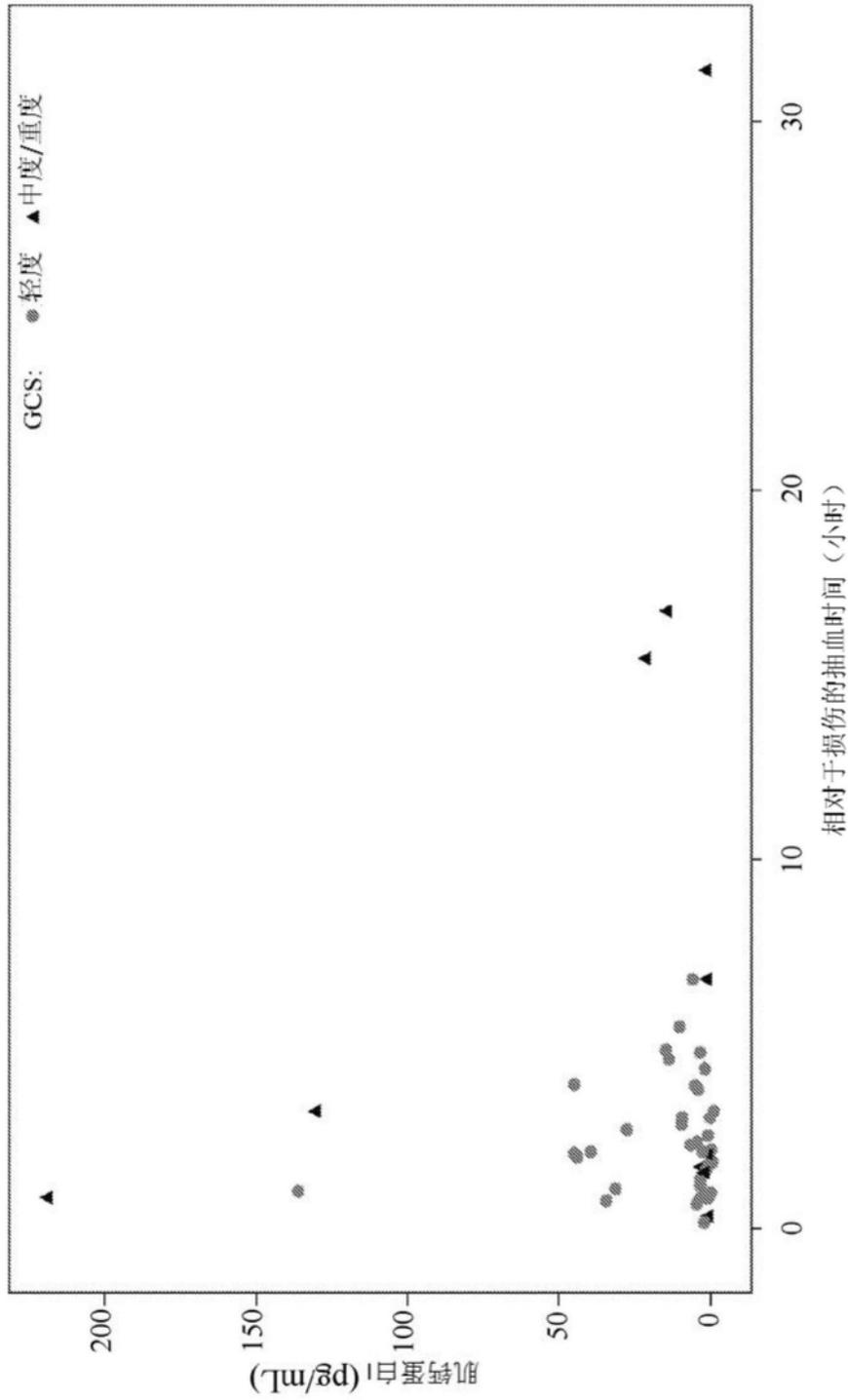


图13

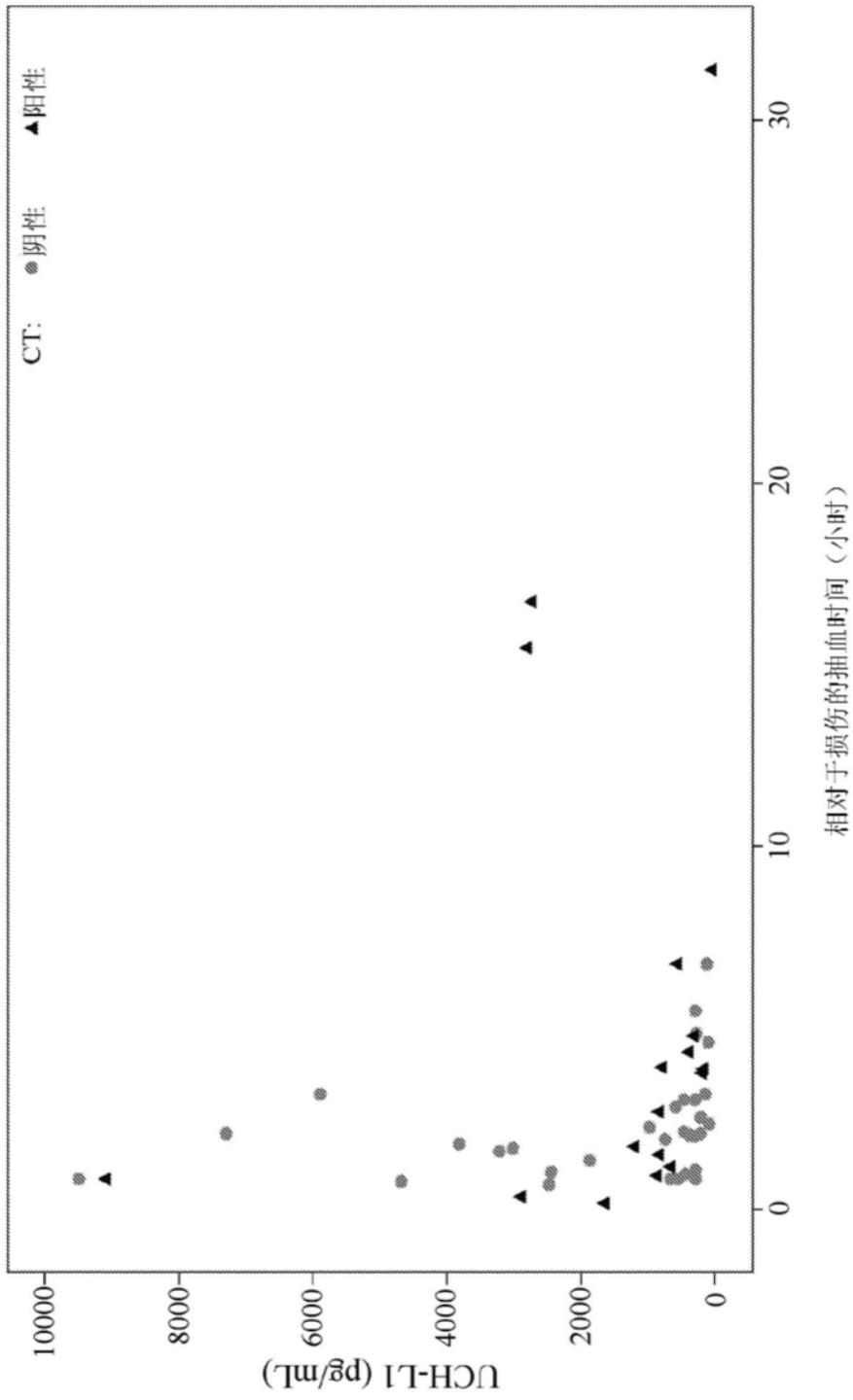


图14

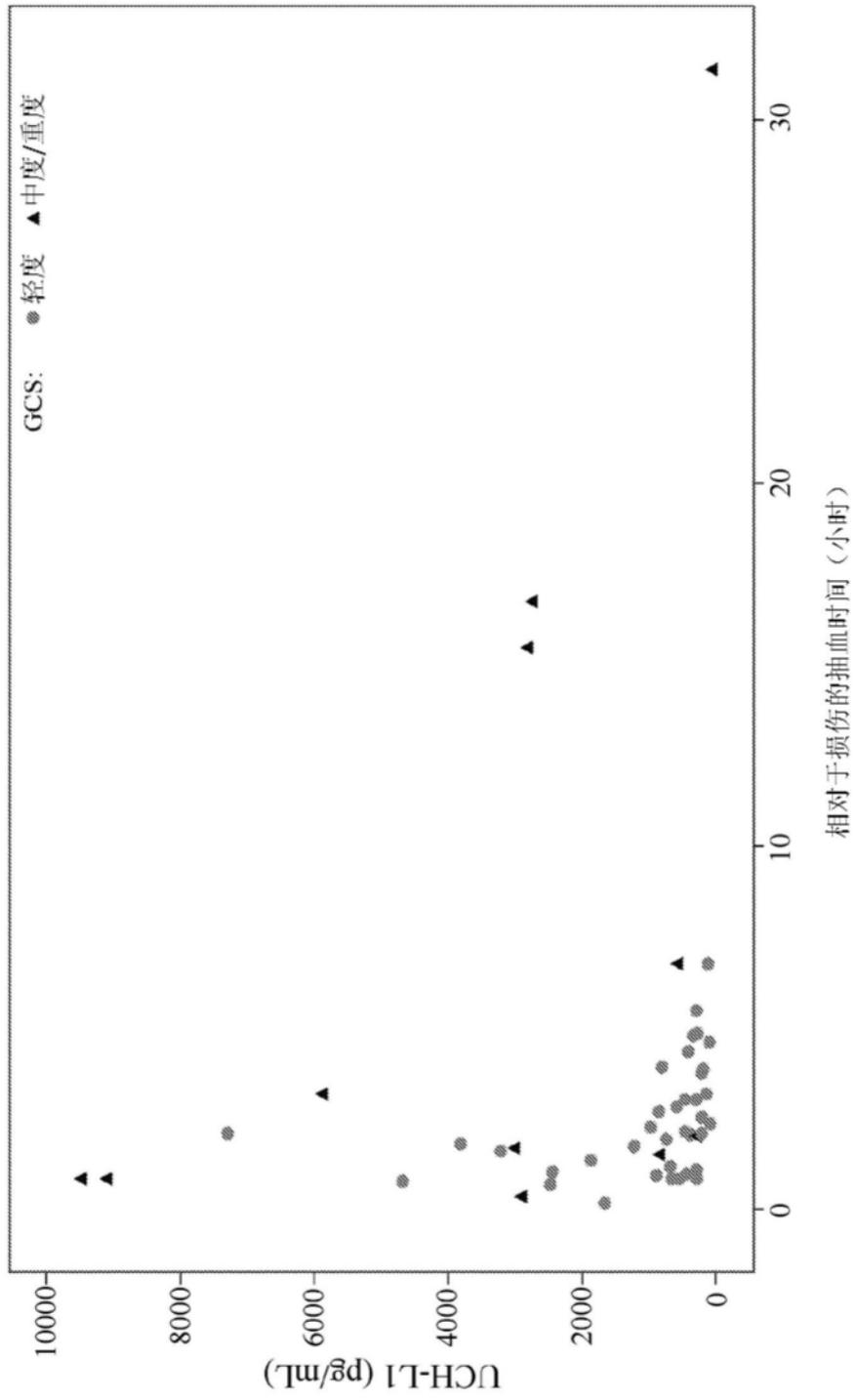


图15

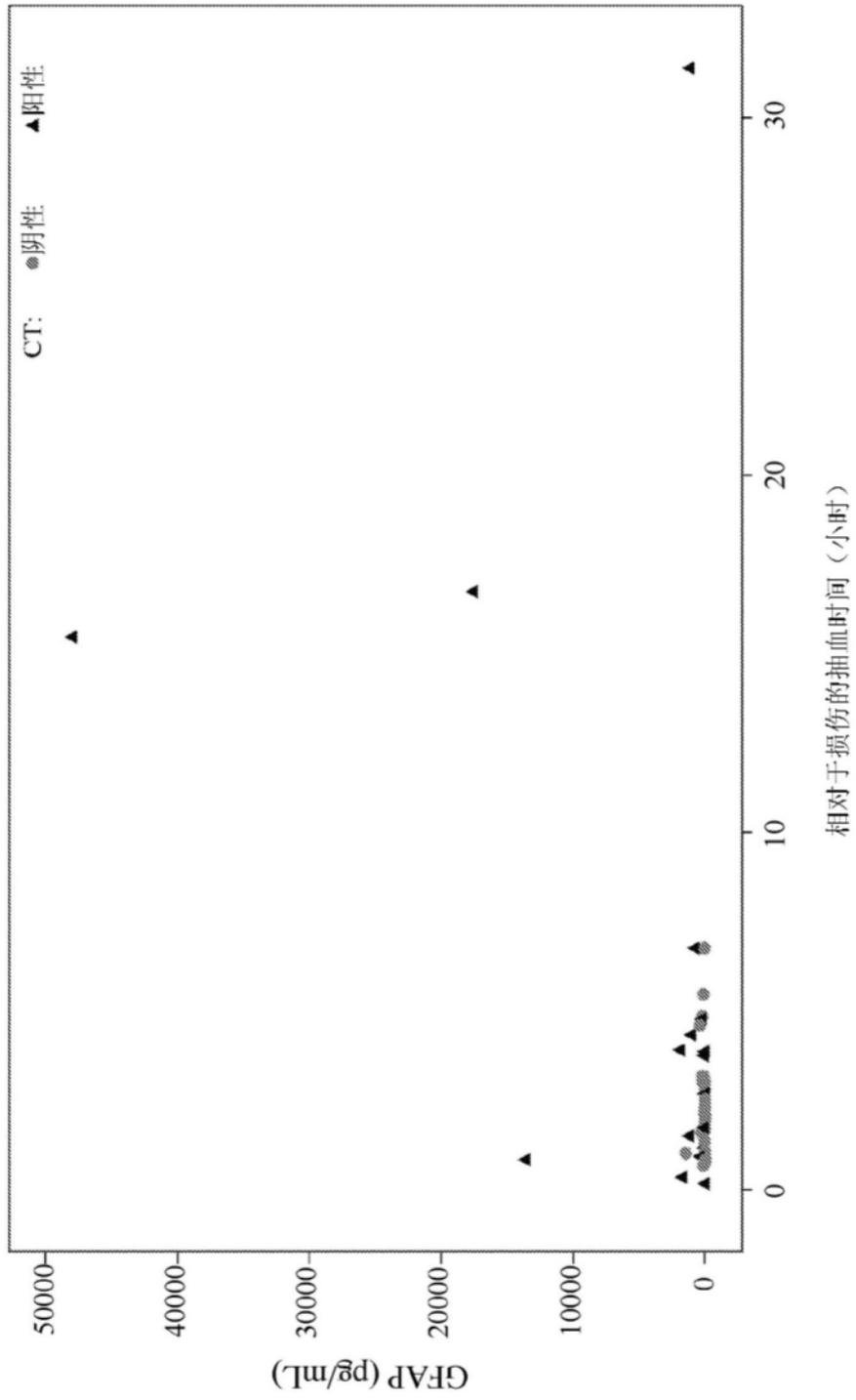
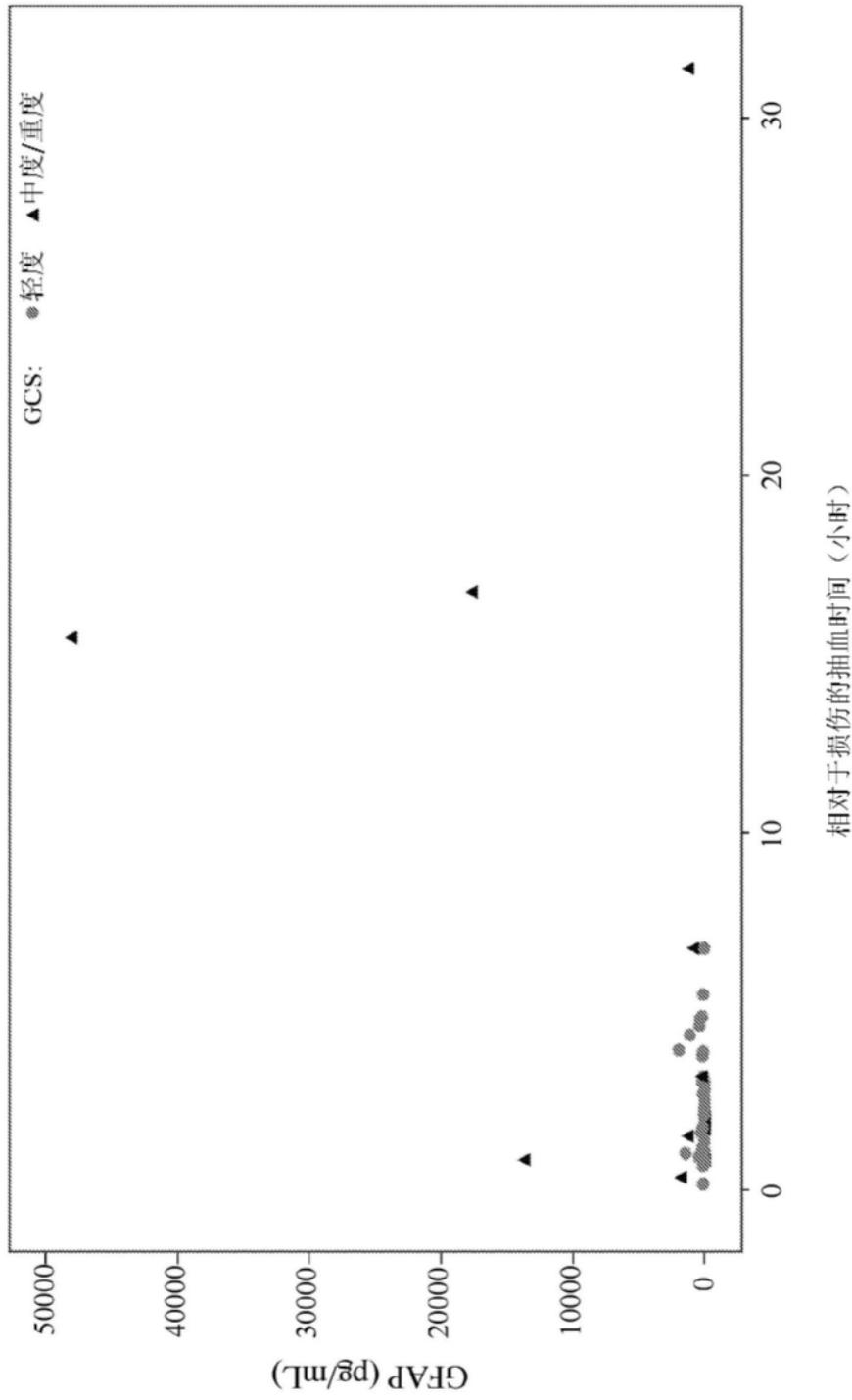


图16



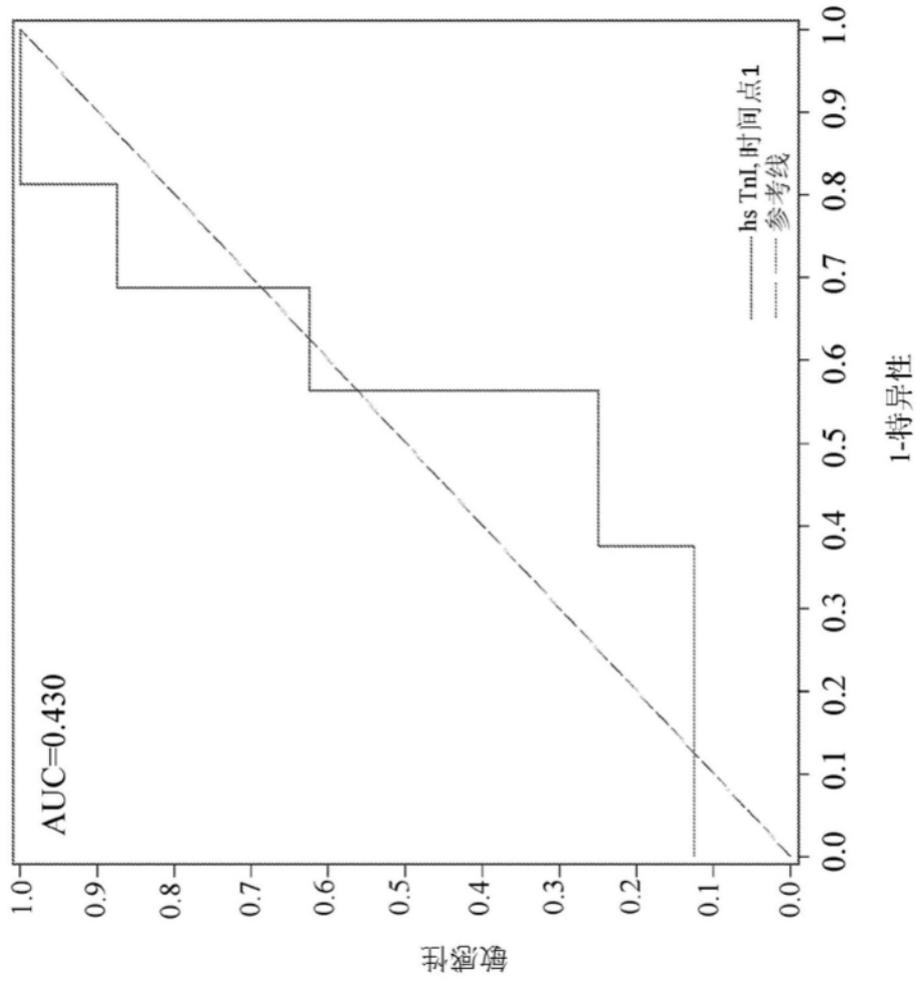


图18

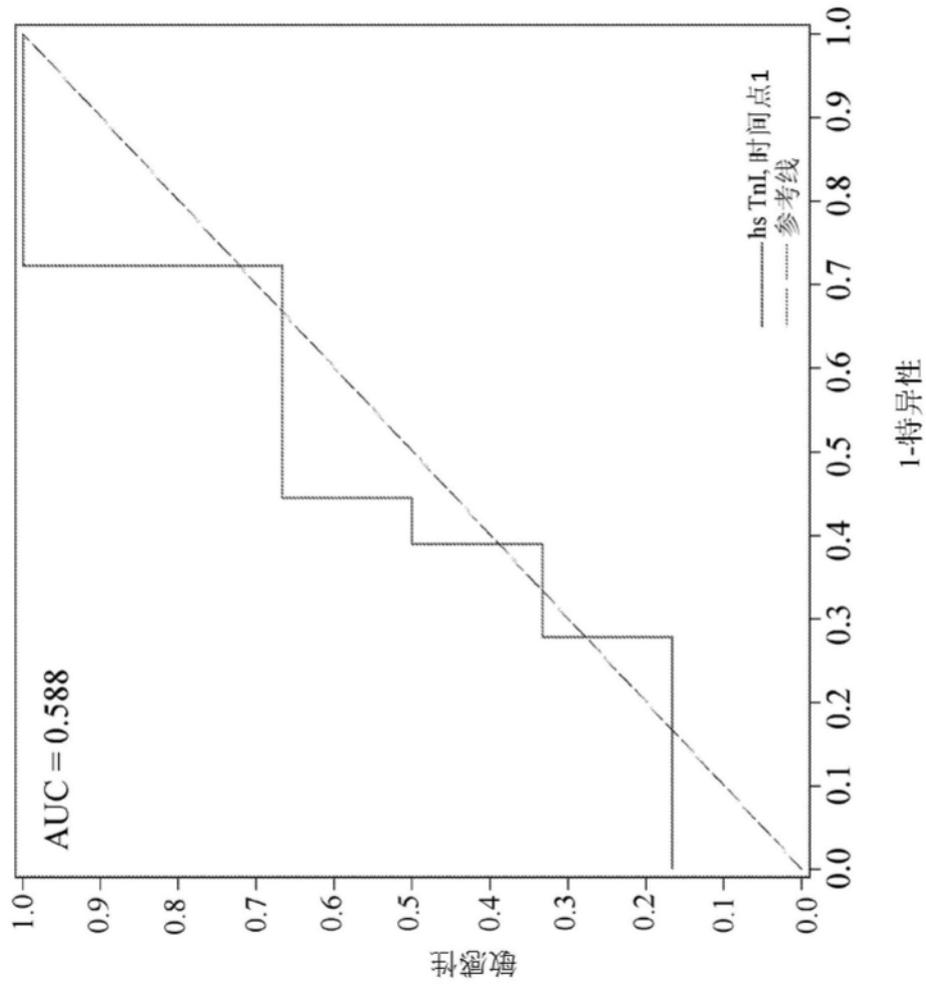


图19

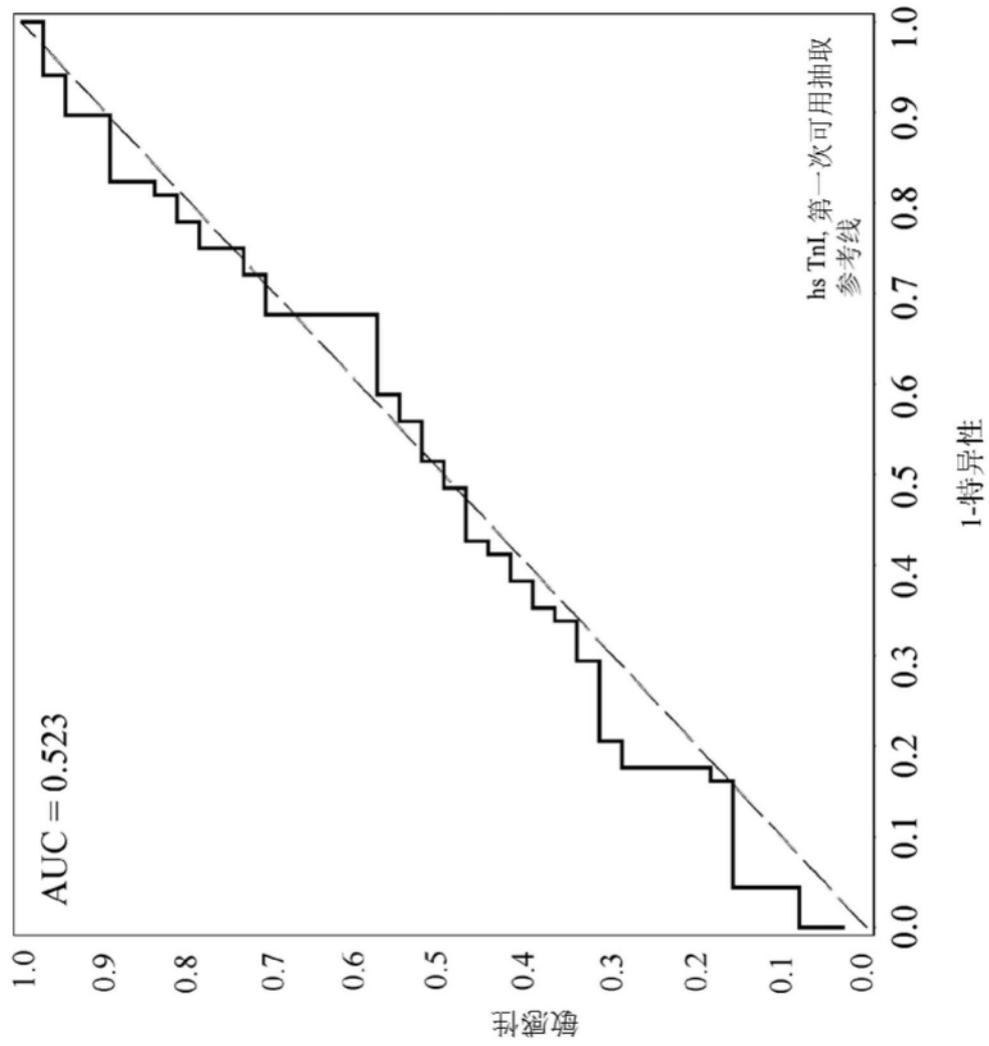


图20

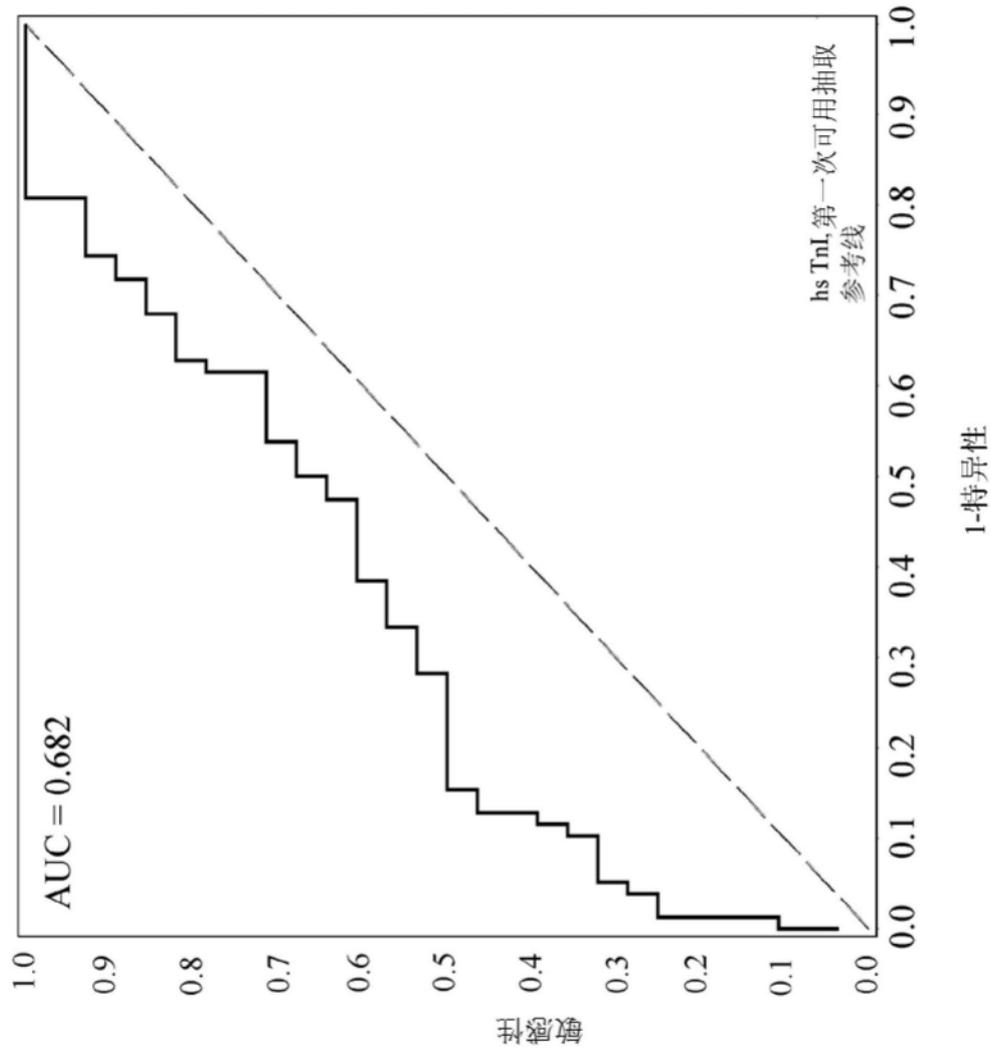


图21

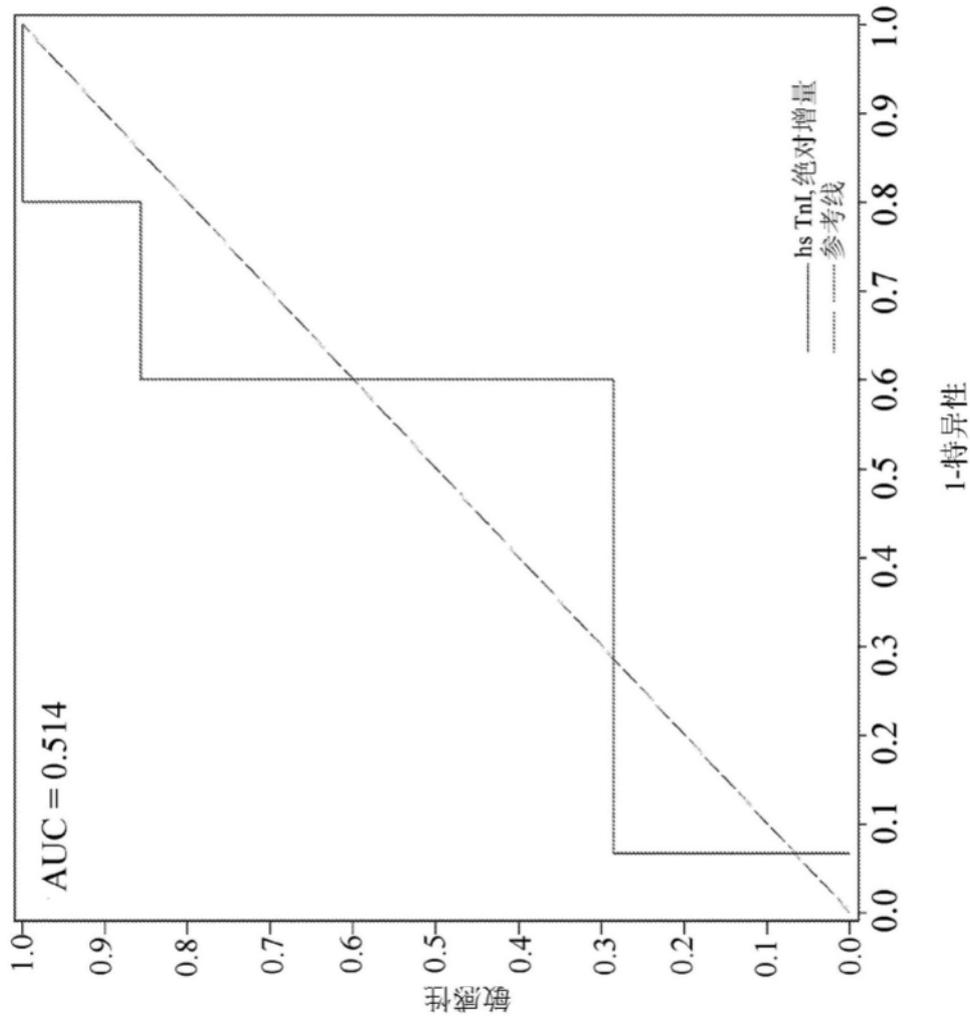


图22

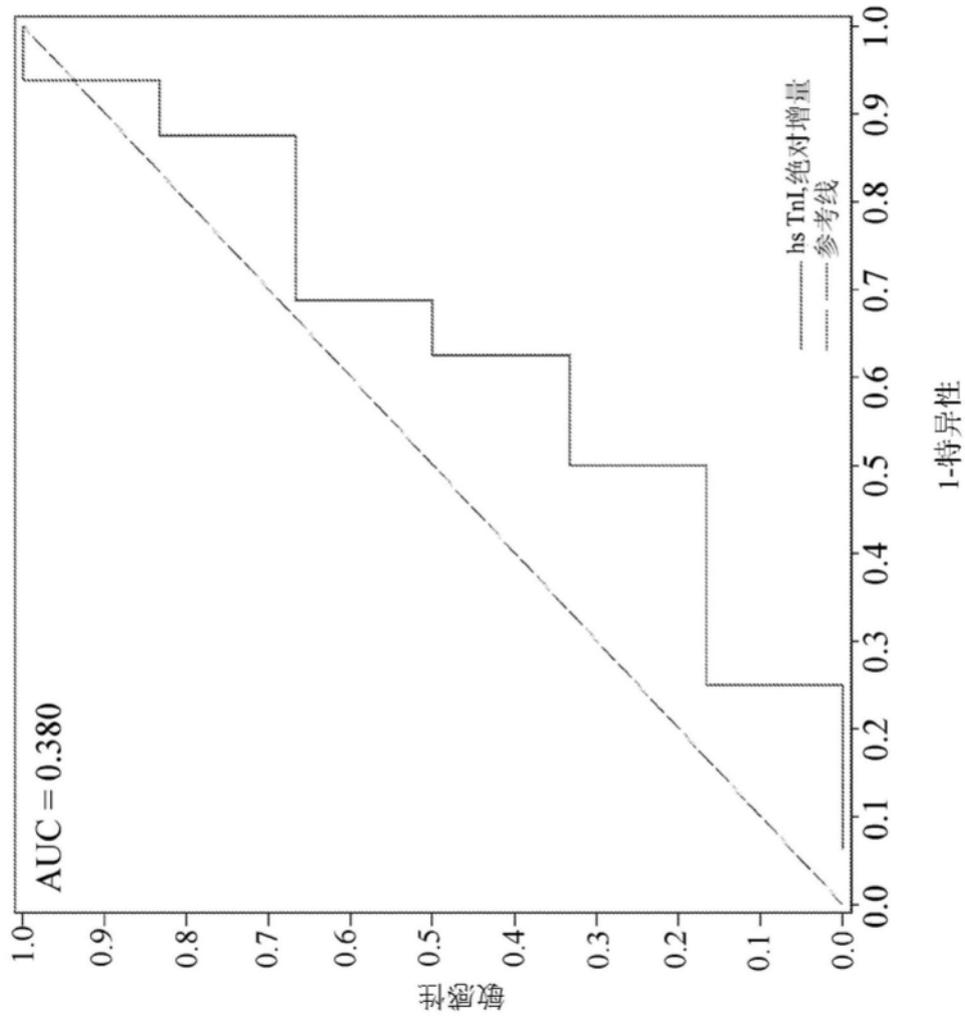


图23

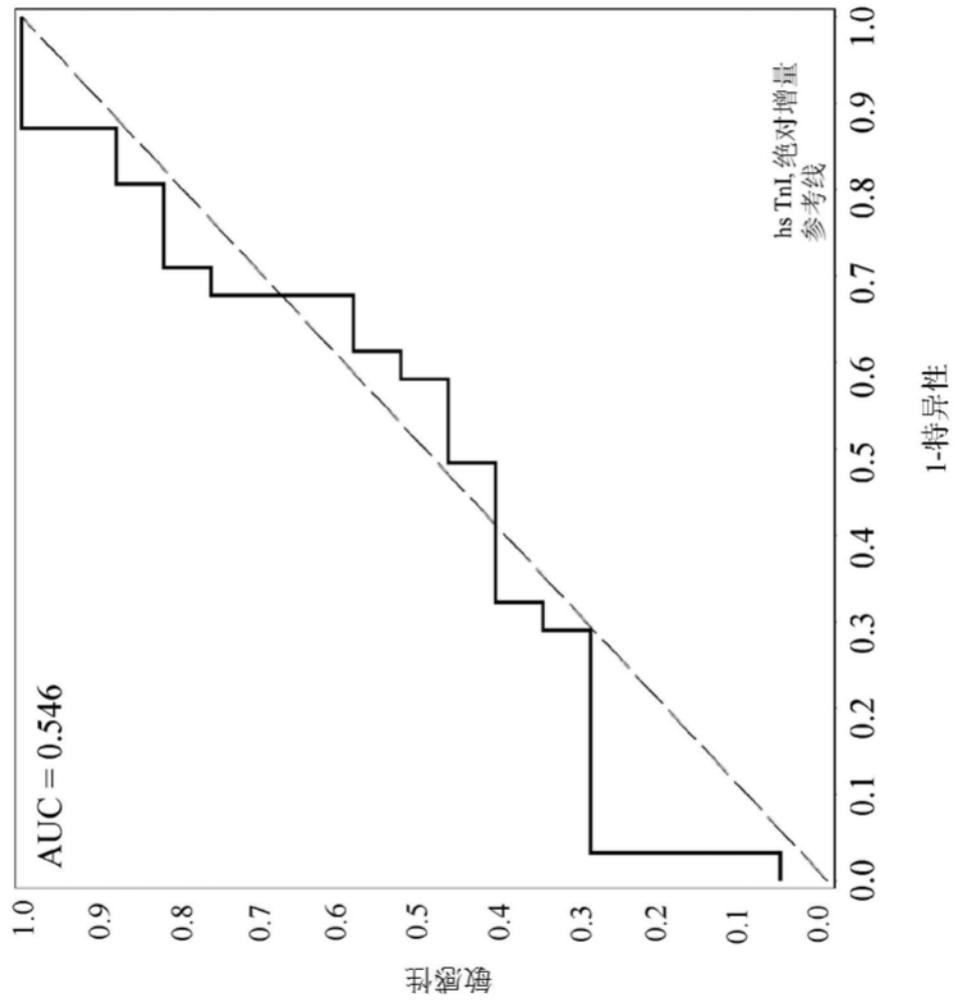


图24

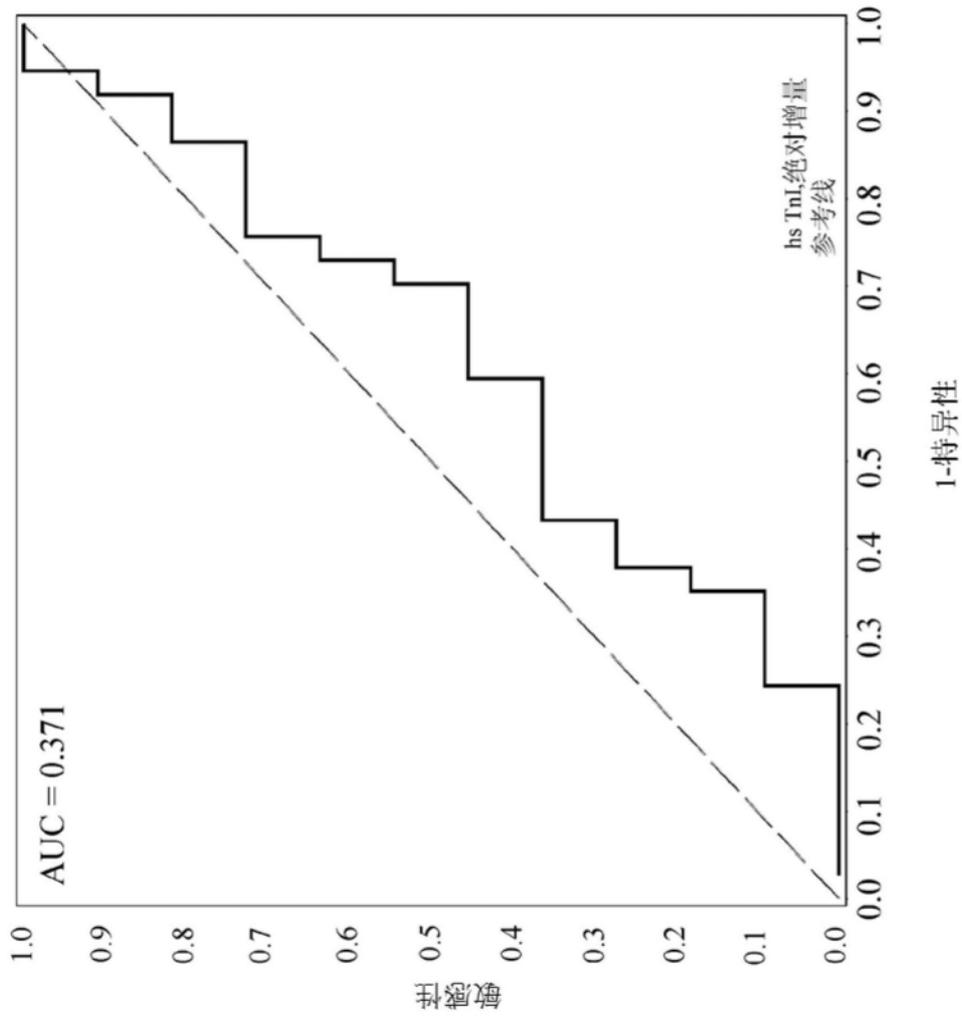


图25

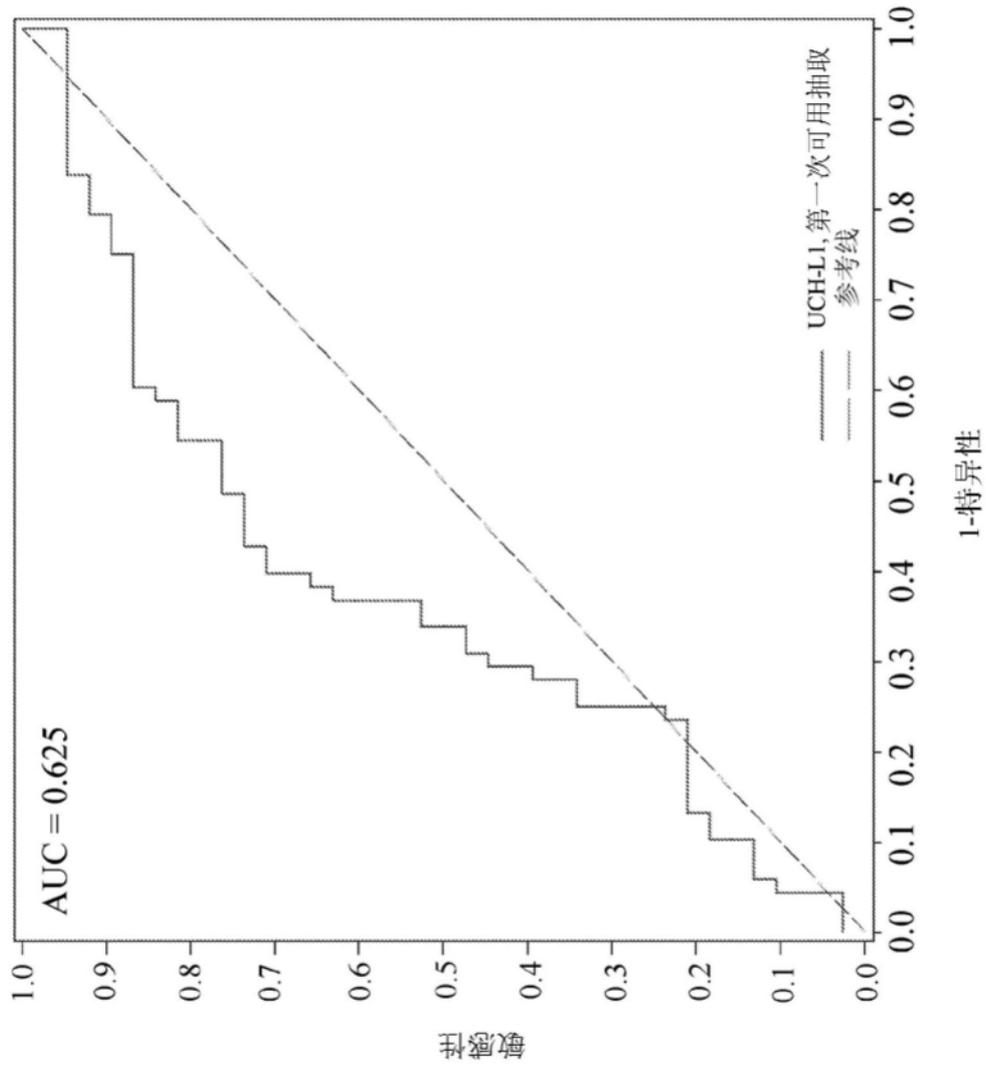


图26

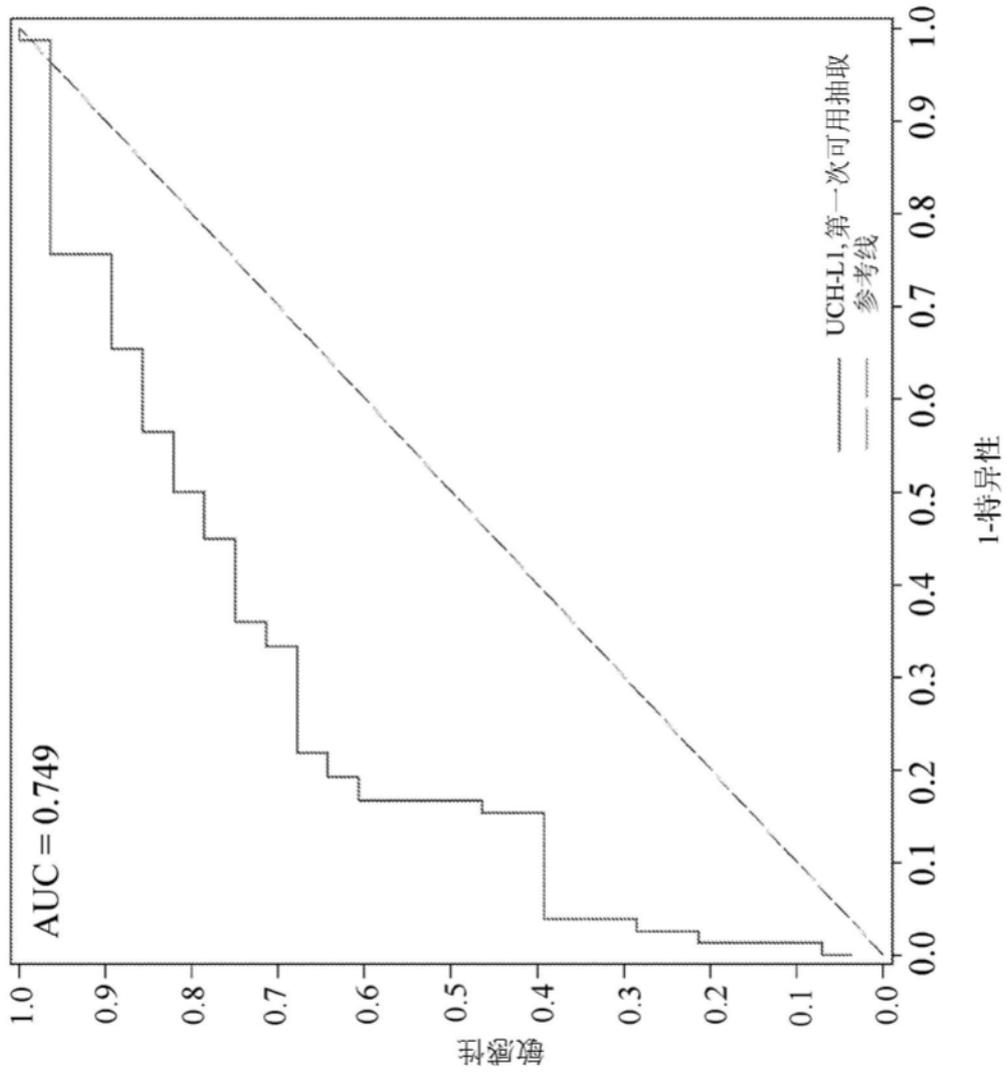


图27

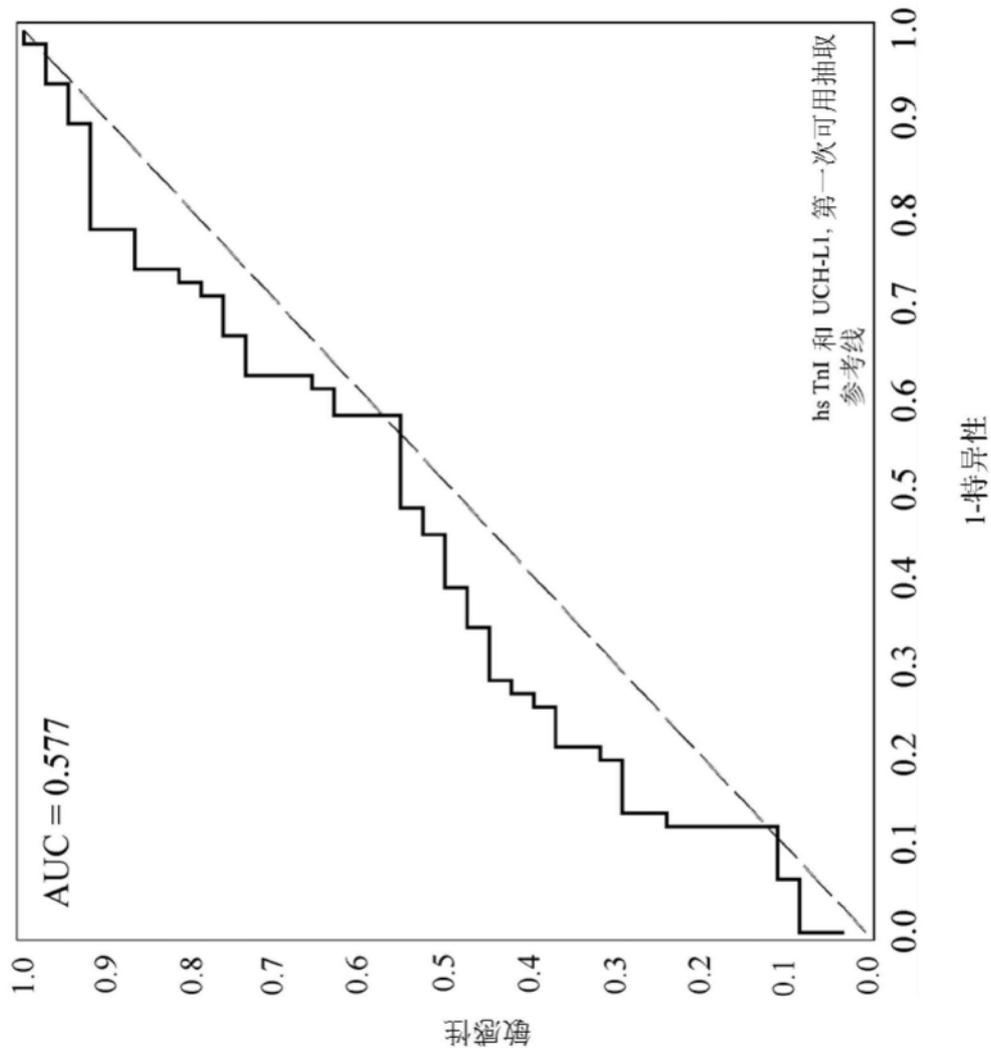


图28

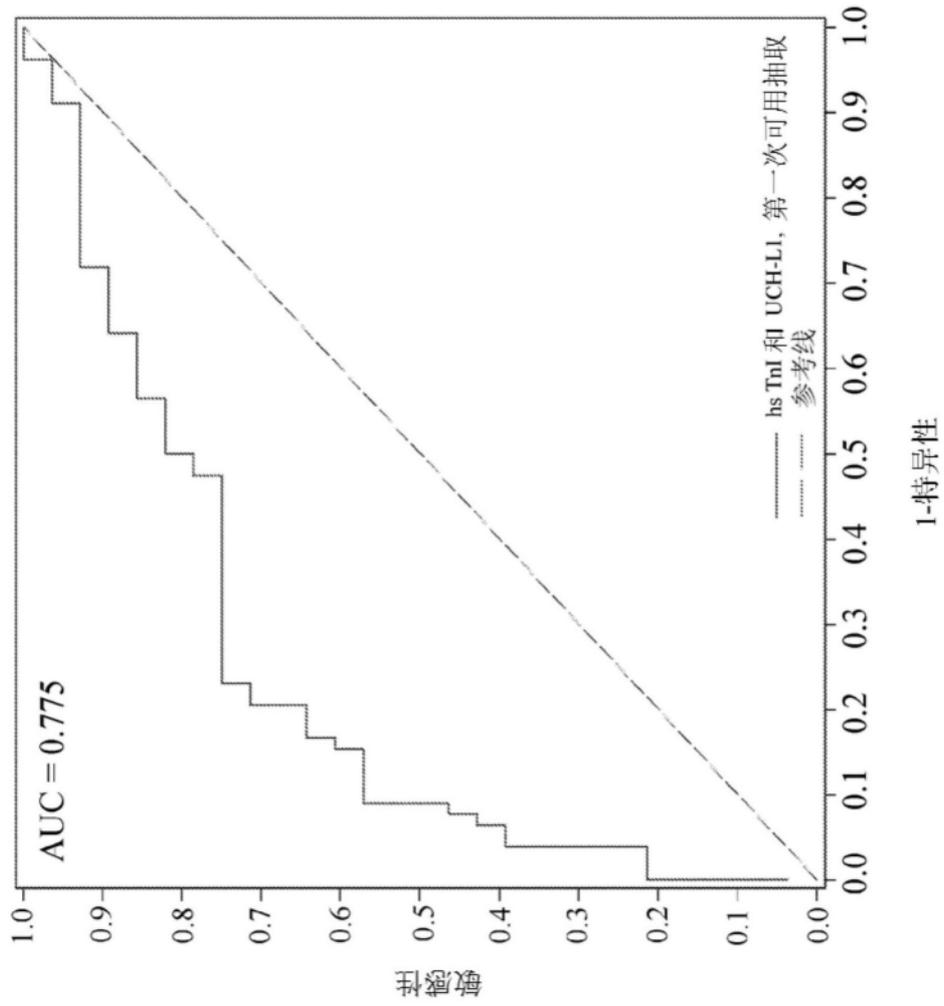


图29

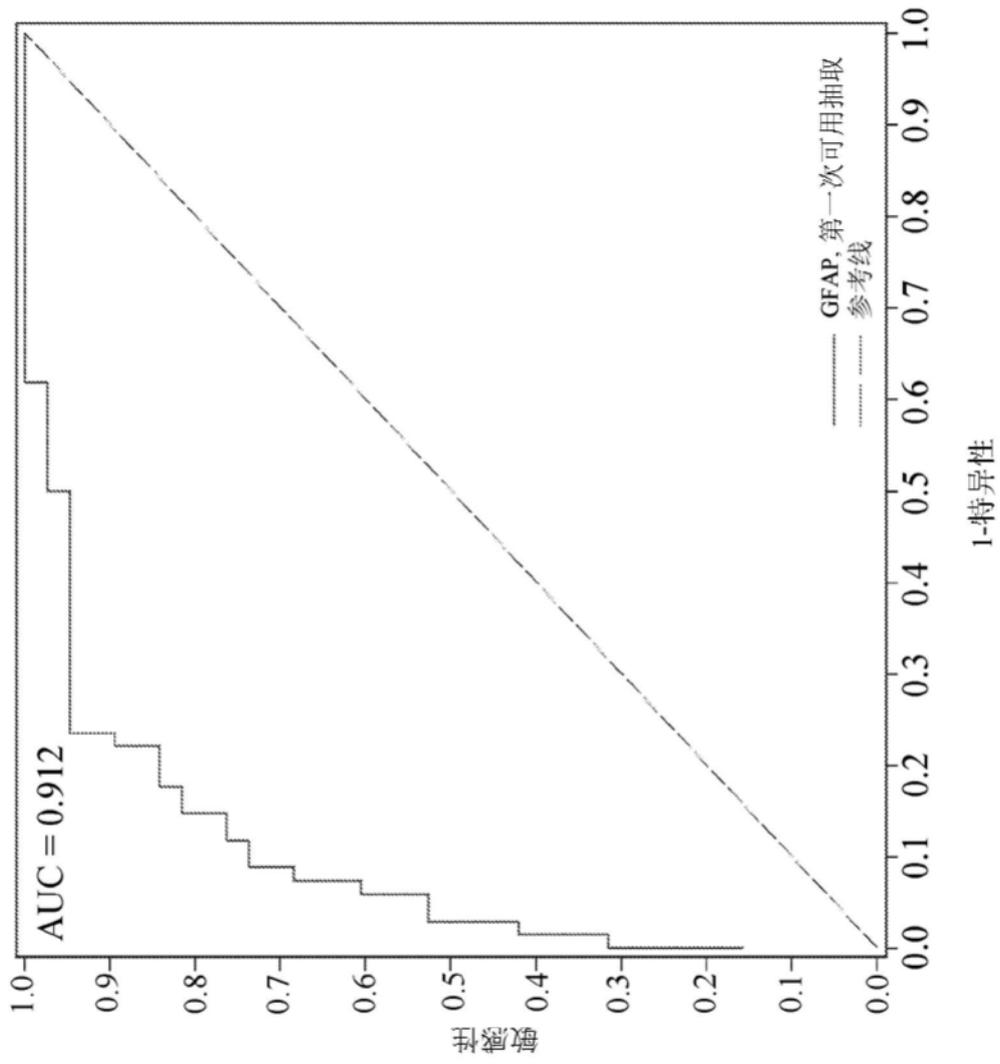


图30

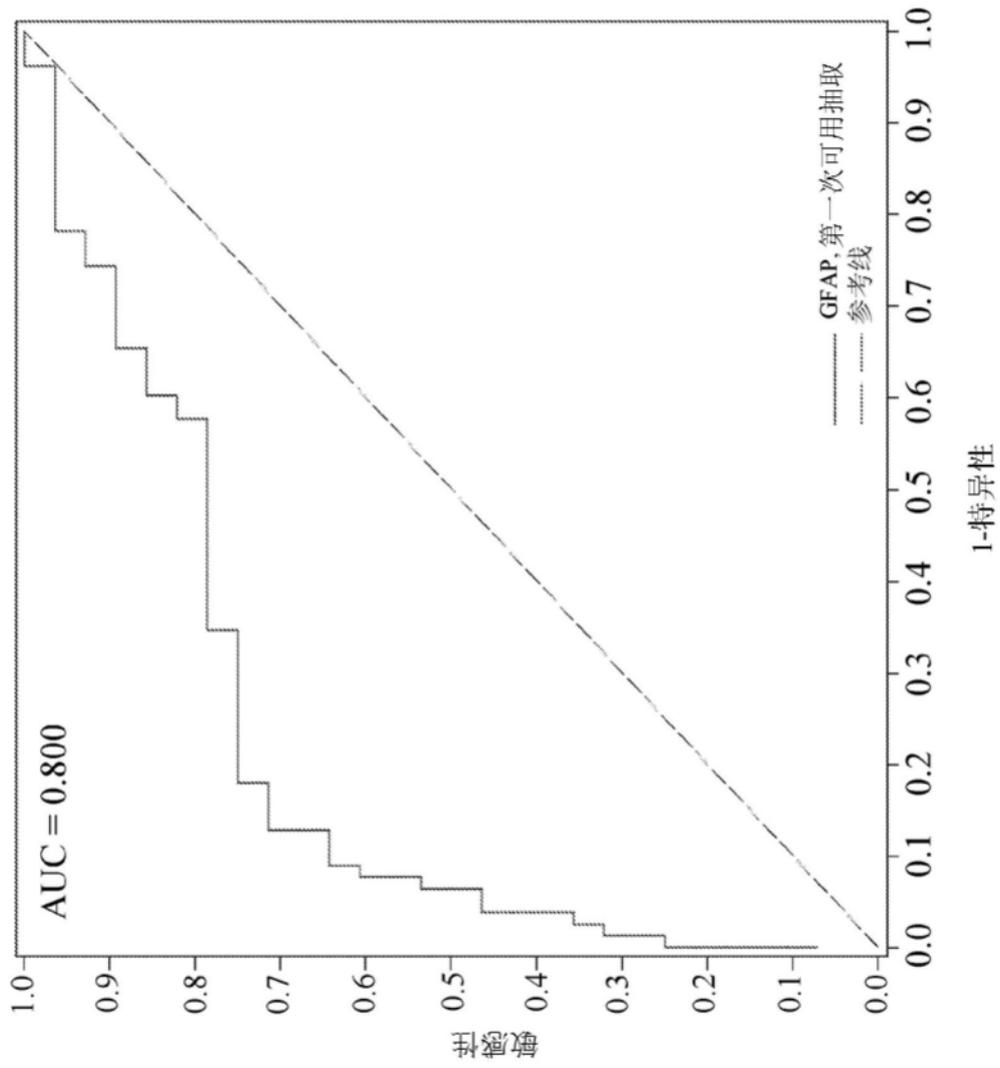


图31

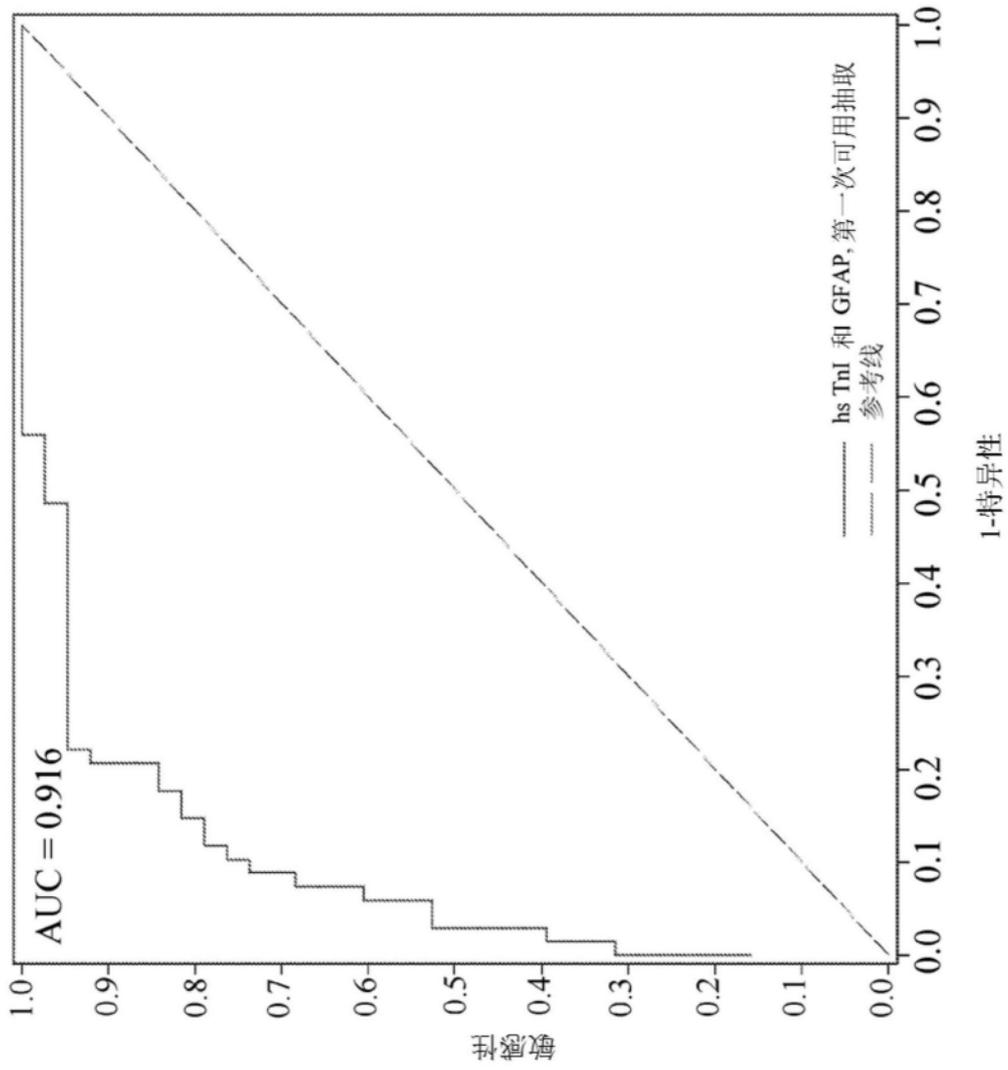


图32

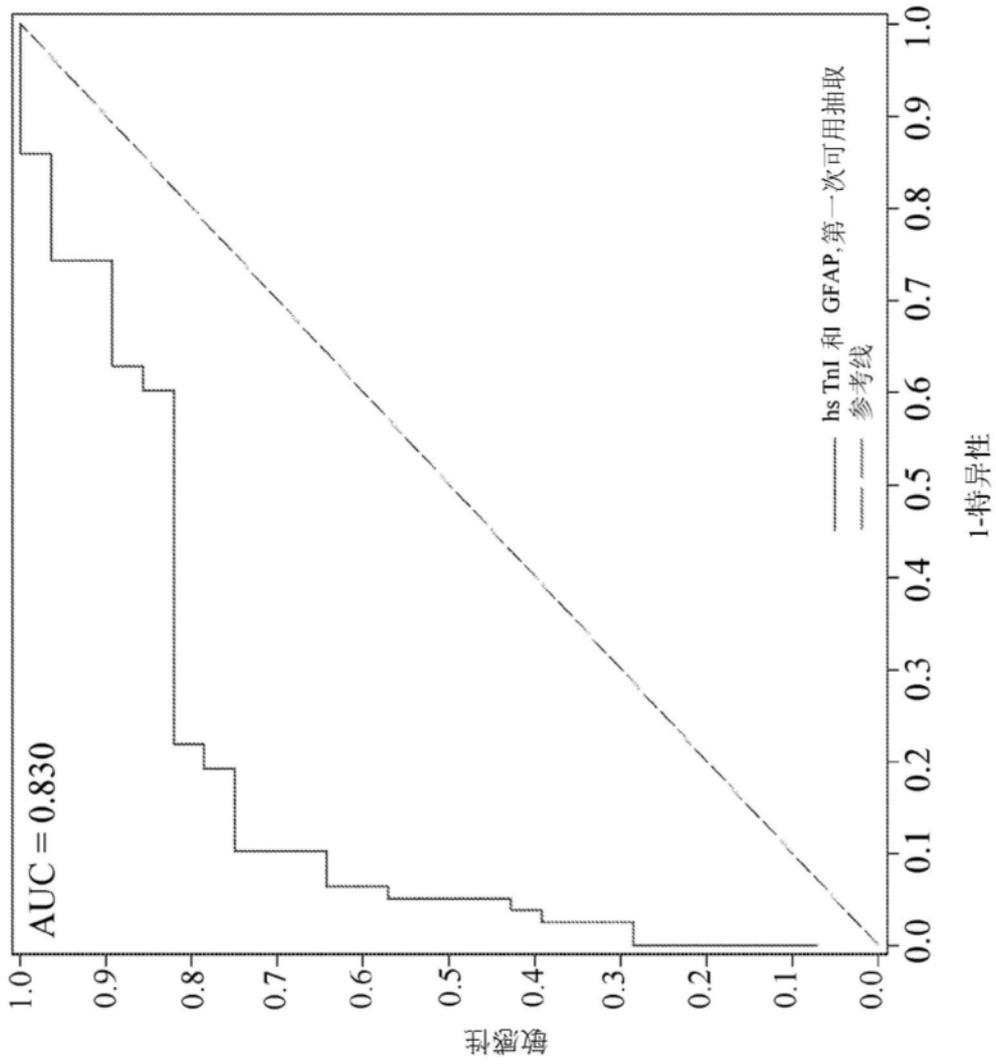


图33

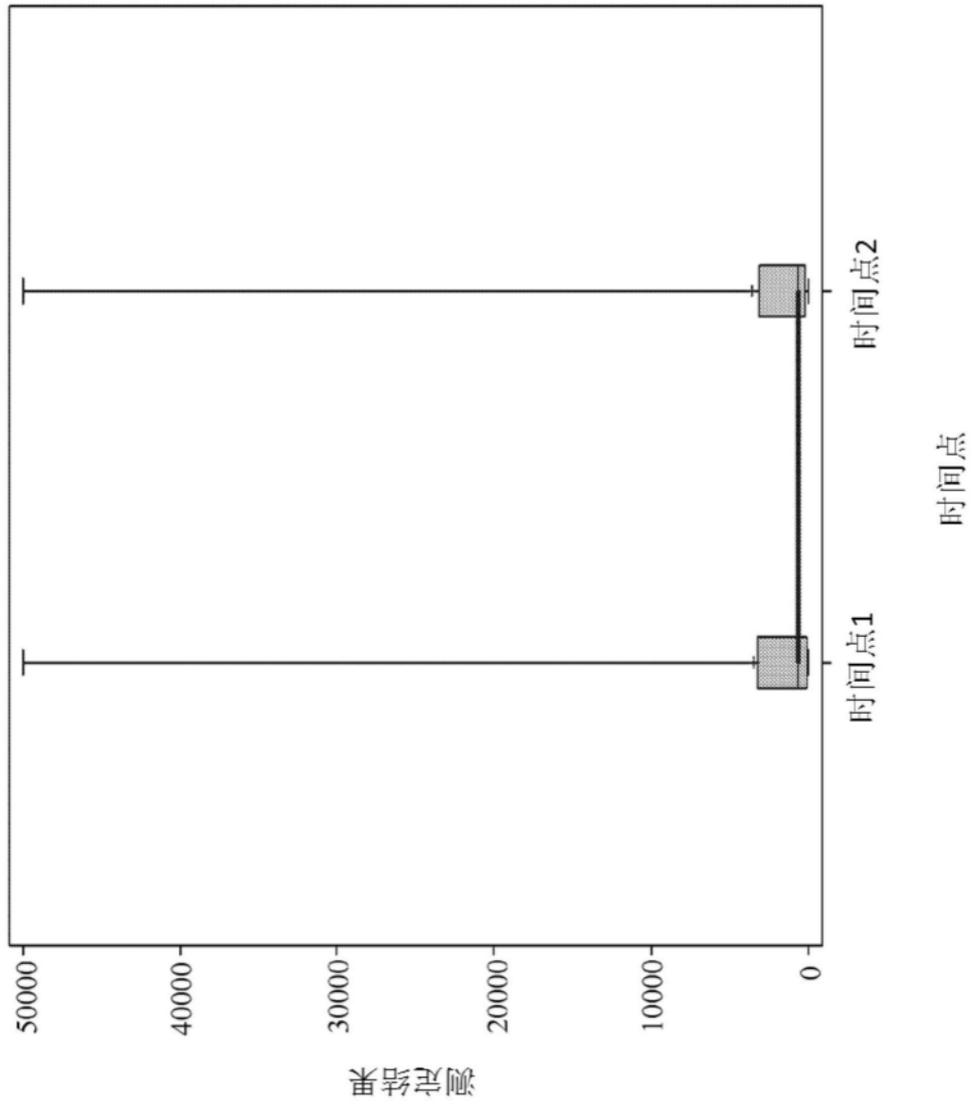


图34