

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7416625号

(P7416625)

(45)発行日 令和6年1月17日(2024.1.17)

(24)登録日 令和6年1月9日(2024.1.9)

(51)国際特許分類

F I

G 0 1 N 33/573(2006.01)

G 0 1 N 33/573

A

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D

A 6 1 B 5/055(2006.01)

A 6 1 B 5/055

3 9 0

A 6 1 B 6/03 (2006.01)

A 6 1 B 6/03

3 7 7

C 0 7 K 14/46 (2006.01)

C 0 7 K 14/46

Z N A

請求項の数 30 (全120頁)

(21)出願番号 特願2019-560171(P2019-560171)

(86)(22)出願日 平成30年5月25日(2018.5.25)

(65)公表番号 特表2020-521951(P2020-521951
A)

(43)公表日 令和2年7月27日(2020.7.27)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/034694

(87)国際公開番号 WO2018/218169

(87)国際公開日 平成30年11月29日(2018.11.29)

審査請求日 令和2年10月29日(2020.10.29)

(31)優先権主張番号 62/511,126

(32)優先日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

前置審査

(73)特許権者 391008788

アボット・ラボラトリーズ

ABBOTT LABORATORIES

アメリカ合衆国 イリノイ州 アボット

パーク アボット パーク ロード 1 0 0

(74)代理人 110001173

弁理士法人川口国際特許事務所

(72)発明者 マクイストン, ベス

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 4

、アボット・パーク、アボット・パーク

・ロード・1 0 0、アボット・ラボラト

リーズ気付

(72)発明者 ロジャーズ, ジャスティン

アメリカ合衆国、イリノイ・6 0 0 6 4

、アボット・パーク、アボット・パーク

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 早期バイオマーカーを使用する、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージングを実施するかどうかの決定の一助となるための方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト対象を査定して、頭部損傷についての磁気共鳴イメージング手順を実施するのかどうかを決定するための一助となる方法であって、

a) 推測される頭部への損傷後 2 4 時間以内に、前記対象から得られた全血、血清、血漿又は脳脊髄液である試料に対するアッセイを実施して、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1)、又は U C H - L 1 とグリア原線維性酸性タンパク質 (G F A P) の組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定するステップを含み、

b) 前記早期バイオマーカーの基準レベルより高い前記早期バイオマーカーの試料中レベルは、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の外傷性脳損傷 (T B I) についての対象の査定の一助とするために、前記対象に対して磁気共鳴イメージング手順を実施すべきであることを示し、前記早期バイオマーカーの基準レベルより低い前記早期バイオマーカーの試料中レベルは、前記対象に対して磁気共鳴イメージング手順を実施すべきではないことを示し、

U C H - L 1 についての前記基準レベルが、 $80\text{ pg/mL} \sim 150\text{ pg/mL}$ の間である方法。

【請求項 2】

前記基準レベルが、(a) 少なくとも 7 0 % の感度及び少なくとも 3 0 % の特異度を有するアッセイにより決定される；又は (b) 少なくとも 8 0 % の感度及び少なくとも 3 0 % の特異度を有するアッセイにより決定される、請求項 1 に記載の方法。

10

20

【請求項 3】

前記対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージング手順を受けている、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記対象が、前記イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

G F A P についての前記基準レベルが、 $20 \text{ pg/mL} \sim 200 \text{ pg/mL}$ の間である、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記試料が、前記推測される頭部への損傷後、0 ～ 12 時間以内に採取される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

ヒト対象を査定して、頭部損傷についての磁気共鳴イメージング手順を実施するのかどうかを決定するための一助となる方法であって、

a) 推測される損傷後、24 時間以内に前記対象から採取された第 1 の試料及び前記第 1 の試料が採取された 3 ～ 6 時間後に前記対象から採取された第 2 の試料である、前記対象から得られた全血、血清、血漿又は脳脊髄液である少なくとも 2 つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；並びに

b) 前記少なくとも 2 つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ 1 (UCH-L1)、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) 又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップを含み；

c) 前記早期バイオマーカーのレベルにおける前記第 1 の試料から前記第 2 の試料への絶対量の低下又は上昇は、前記対象に対して磁気共鳴イメージング手順を実施すべきであることを示し、前記早期バイオマーカーのレベルにおける前記第 1 の試料から前記第 2 の試料への絶対量の低下又は上昇が見られないことは、前記対象に対して磁気共鳴イメージング手順を実施すべきではないことを示す、方法。

【請求項 8】

前記対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージング手順を受けている、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記対象が、前記イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記絶対量が、少なくとも 70 % ～ 100 % の間の感度及び少なくとも 30 % ～ 100 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】

前記絶対量が、(a) 少なくとも 80 % の感度及び少なくとも 30 % の特異度又は (b) 少なくとも 75 % の感度及び少なくとも 40 % の特異度を有するアッセイにより決定される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 12】

前記絶対量が、少なくとも $10 \text{ pg/mL} \sim 150 \text{ pg/mL}$ の間である、請求項 7 ～ 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

前記早期バイオマーカーが UCH-L1 であり、前記絶対量が少なくとも $30 \text{ pg/mL} \sim 100 \text{ pg/mL}$ の間であるか、前記早期バイオマーカーが GFAP であり、前記絶対量が少なくとも $10 \text{ pg/mL} \sim 150 \text{ pg/mL}$ の間であるか、又はこれらの組合せである、請求項 7 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

前記第 1 の試料が、前記推測される頭部への損傷後、0 ～ 12 時間以内に採取される、

10

20

30

40

50

請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記第2の試料が、前記第1の試料が採取された後、3時間～6時間の間に、前記対象から採取される、請求項 7 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

UCH-L1のレベルを測定するステップが、

A. 前記試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) UCH-L1上又はUCH-L1断片上のエピトープに結合してUCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原複合体を形成するUCH-L1捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、前記UCH-L1捕捉抗体が結合していないUCH-L1上のエピトープに結合してUCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体を形成するUCH-L1検出抗体

と接触させて、UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体を形成すること、並びに

B. UCH-L1の、前記試料中量又は前記試料中濃度を、前記UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体内の前記検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定すること

を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

GFA Pのレベルを測定するステップが、

A. 前記試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) GFA P上又はGFA P断片上のエピトープに結合してGFA P捕捉抗体-GFA P抗原複合体を形成するGFA P捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、前記GFA P捕捉抗体が結合していないGFA P上のエピトープに結合してGFA P抗原-GFA P検出抗体複合体を形成するGFA P検出抗体と接触させて、GFA P捕捉抗体-GFA P抗原-GFA P検出抗体複合体を形成すること、並びに

B. GFA Pの、前記試料中量又は前記試料中濃度を、前記GFA P捕捉抗体-GFA P抗原-GFA P検出抗体複合体内の前記検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定すること

を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、1回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃又は他の種類の鈍力外傷により引き起こされた頭部への損傷を負った後において、前記試料が得られる、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

前記試料が、前記対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取したか、又はこれらへと曝露された後において得られる、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

前記化学物質又は毒素が、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの1つ以上の組合せである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記試料が、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られる、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

前記対象の臨床状態、前記対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の外傷

10

20

30

40

50

性脳損傷の罹患についての前記対象の分類、前記対象による低レベル又は高レベルの UCH-L1 の呈示、及び前記対象が頭部への損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意の対象に対して実行されうる、請求項 1 ~ 2.1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.3】

前記対象をモニタリングするステップをさらに含む、請求項 1 ~ 2.2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.4】

前記試料が、全血試料である、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.5】

前記試料が、血清試料である、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.6】

前記試料が、血漿試料である、請求項 1 ~ 2.3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.7】

前記アッセイが、免疫アッセイである、請求項 1 ~ 2.6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.8】

前記アッセイが、臨床化学アッセイである、請求項 1 ~ 2.6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2.9】

前記アッセイが、単一分子検出アッセイである、請求項 1 ~ 2.6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3.0】

前記アッセイが、ポイントオブケアデバイスを使用して実施される、請求項 1 ~ 2.6 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その内容が、参照により本明細書に組み込まれた、2017年5月25日に
出願された、米国特許出願第 62 / 511,126 号に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明は、対象が、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象から、24時間後以内の時点において採取された試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L1 (UCH-L1)、グリア原線維性酸性タンパク質 (GFAP) 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルの変化を検出することによる、頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、磁気共鳴イメージング (MRI) 又は頭部コンピュータ断層撮影 (CT) スキャンのようなイメージングを実施するのかどうかの決定の一助となる方法に関する。

【背景技術】

【0003】

米国におけるだけで、毎年 500 万例を超える軽度外傷性脳損傷 (TBI) が生じている。現在のところ、患者評価の一助とするのに利用可能である、簡単かつ客観的で、正確な測定法は存在しない。実際、TBI の査定及び診断の多くは、主観的データに基づく。残念ながら、頭部 CT 及び GCS (Glasgow Coma Score) のような客観的測定法は、軽度 TBI の査定において、それほど総合的又は高感度ではない。さらに、頭部 CT は、軽度 TBI について、ほとんどの場合何も明らかにせず、高価であり、患者を、不要な放射線へと曝露する。加えて、陰性の頭部 CT は、患者が、脳振盪を有さないことが明確になったこと意味するわけではなく、手術のような、ある特定の介入が正当ではないことを意味するに過ぎない。医師及び患者は、この状態を正確に査定して、適切なトリアージ及び回復を促進するために、客観的かつ信頼できる情報を必要とする。今日、急性ケア状況において、患者の査定及び管理の一助となる、UCH-L1 及び GFAP の

10

20

30

40

50

使用に利用可能なデータは、限定的である。

【 0 0 0 4 】

軽度 T B I 又は脳振盪は、客観的に検出することがはるかに困難であり、世界中の救急治療室において、毎日難題を提示している。脳振盪は、通例、出血及び脳に対する従来のコンピュータ断層撮影スキャンにおける異常のような、肉眼的病態を引き起こさないが、数日間～数週間かけて、自発的に消失する、急速発症型の神経機能不全を引き起こす。軽度 T B I 患者のうちの約 1 5 % は、遷延性の認知機能不全を患う。救急治療室及び診療所、スポーツ領域及び軍事活動（例えば、戦闘）の現場における軽度 T B I の犠牲者にとって、満たされていない需要が存在する。

【 0 0 0 5 】

脳損傷の重症度を評価するための、現行のアルゴリズムは、G C S (G l a s g o w C o m a S c a l e) スコア及び他の尺度を含む。これらの尺度は、時に、急性重症度を関連づけるのに十分でありうるが、遷延性の欠損を結果としてもたらしうる、微細な病態について、感度が不十分である。G C S 及び他の尺度はまた、損傷の種類間の区別も可能とせず、十分ではない場合がある。したがって、臨床試験に参加するときに、単一の G C S レベルとして分類患者は、損傷の重症度及び種類が、大幅にばらつきうる。したがって、転帰もまた変動するため、不適切な分類は、臨床試験の完全性を損なう。損傷の分類の改善は、臨床試験における T B I 患者のために、疾患の重症度及び種類の、より正確な画定を可能とする。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

加えて、現行の脳損傷試験は、全体的な現象を捕捉するが、転帰の微細な差について評価できない、G O S E (G l a s g o w O u t c o m e S c a l e E x t e n d e d) のような転帰尺度に依拠する。したがって、脳損傷の治療法についての試験が、3 0 回連続して失敗している。治療法及び予防法について調べるため、患者が、脳損傷から、どの程度十分に回復したのかを決定するために、高感度の転帰尺度が必要とされている。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

(発明の要旨)

一態様において、本開示は、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法を対象とする。本方法は、推測される頭部への損傷後約 2 4 時間以内に対象から採取された試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1) 、グリア原線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定又は検出するステップ；及び早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対するイメージング手順を実施し (イメージング手順の実施「を組み入れ」) 、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しない (イメージング手順の実施「を除外する」) ステップを含む。基準レベルは、(a) 少なくとも約 7 0 % ~ 約 1 0 0 % の間の感度及び少なくとも約 3 0 % ~ 約 1 0 0 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される；又は (b) 少なくとも約 2 0 p g / m L ~ 約 2 0 0 p g / m L の間である。

【 0 0 0 8 】

別の態様において、本開示は、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法を対象とする。本方法は、推測される損傷後 2 4 時間以内に対象から採取された第 1 の試料及び第 1 の試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に対象から採取された第 2 の試料である、対象から得られた少なくとも 2 つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；少なくとも 2 つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1) 、

10

20

30

40

50

グリア細胞線維性酸性タンパク質（GFAP）又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ；並びに早期バイオマーカーのレベルが第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し（イメージング手順の実施「を組み入れ」）、早期バイオマーカーのレベルの第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、イメージング手順を実施しない（イメージング手順の実施「を除外する」）ステップを含む。

【0009】

なおさらなる態様において、本開示は、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法に関する。本方法は、

a) 推測される頭部への損傷後約24時間以内に対象から採取された試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1（UCH-L1）、グリア原線維性酸性タンパク質（GFAP）又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定又は検出するステップ；及び

b) 対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーの試料中レベルが早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーの試料中レベルが早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む、

この場合、基準レベルが、(a) 少なくとも約70%～約100%の間の感度及び少なくとも約30%～約100%の間の特異度を有するアッセイにより決定される；又は(b) 少なくとも約20 pg/mL～約200 pg/mLの間である。早期バイオマーカーレベルが、基準レベルと等しい場合、結果は、陰性であると考えられることから、イメージングは、実施されないことを意味する。

【0010】

上記された方法において、基準レベルは、少なくとも約80%の感度及び少なくとも約30%の特異度を有するアッセイにより決定される。一部の実施形態において、基準レベルは、少なくとも約80 pg/mL～約150 pg/mLの間である。より特定すると、一部の実施形態において、GFAPについての基準レベルは、約20 pg/mL～約200 pg/mLの間である。他の実施形態において、UCH-L1についての基準レベルは、約80 pg/mL～約150 pg/mLの間である。

【0011】

イメージングを実施するかどうかを決定又は査定するための、上記された方法において、対象は、例えば、実施されている、又は既に実施された（アッセイが実施される前を意味する）MRIスキャン又はCTスキャンなどのイメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象の医学的状態（患者が意識不明である場合など）に応じて、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）は、対象が、救急治療室、外傷センター又は他の施設に到着した直後に対象がTBIを有するのかどうかを評価及び/若しくは査定するために、行われうる。このようなイメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）は、対象が、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIを有するのかどうかを確認及び決定するように、アッセイが実施される前に実施されうる。アッセイが実施された後に、医師による（又は他の医療従事者による）TBIの管理（例えば、手術による介入及び/又は薬理的介入が要求されうるのかどうかを決定するためなど）の一部としてのアッセイの結果に基づき、1回以上の、後続のイメージング手順（1回以上のMRIスキャン又はCTスキャンなど）が実施されうる。

【0012】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、対象は、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象は、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）に基づ

10

20

30

40

50

き、軽度 T B I を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（M R I スキャン又は C T スキャンなど）に基づき、中等度 T B I を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（M R I スキャン又は C T スキャンなど）に基づき、重度 T B I を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（M R I スキャン又は C T スキャンなど）に基づき、中等度～重度の T B I を有することが推測されうる。なおさらに、対象は、M R I に基づき、T B I を有さないことが推測されうる。

【 0 0 1 3 】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、使用された基準レベルは、陽性の M R I と相関するか、又はこれに対応する。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、陽性の頭部 C T スキャンと相関するか、又はこれに対応する。なおさらなる実施形態において、基準レベルは、頭蓋内病変と相関するか、又はこれに対応する。例えば、基準レベルは、M R I が陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。代替的に、基準レベルは、頭部 C T スキャンが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。なおさらに、基準レベルは、頭蓋内病変を有する対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、T B I を患っていない対照の対象と相関するか、又はこれに対応する。

【 0 0 1 4 】

上記された方法において、試料は、推測される頭部への損傷後、約 0 ～ 約 1 2 時間以内に採取されうる。例えば、試料は、推測される頭部への損傷後、約 5 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約 1 0 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約 1 2 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 1 5 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約 2 0 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 3 0 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 6 0 分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 1 . 5 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 2 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 3 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 4 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 5 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 6 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 7 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 8 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 9 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 1 0 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 1 1 時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から 1 2 時間以内に採取されうる。

【 0 0 1 5 】

一実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、軽度 T B I を有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度 T B I を有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、重度 T B I を有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度～重度の T B I を有すると評価又は査定される。なおさらなる実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、T B I を有しないと評価又は査定される。

【 0 0 1 6 】

上記された方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の T B I を有すると評価又は査定されたヒト対象を、T B I のための処置（例えば、手術による処置、治療処置又はこれらの組合せ）により処置するステップをさらに含む。当技術分野で公知であり、本

10

20

30

40

50

明細書においてさらに記載された、任意のこのような処置は使用されうる。さらに、さらなる実施形態において、TBIのために処置される、任意の対象はまた、任意選択的に、任意の処置コース中に、かつ、この後において、モニタリングもされうる。代替的に、前記方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIを有すると評価された対象（まだ今のところ、処置を受けていない可能性がある対象など）をモニタリングするステップをさらに含むうる。

【0017】

上記された方法において、試料は、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選択されうる。一部の実施形態において、試料は、全血試料である。一部の実施形態において、試料は、血漿試料である。さらに他の実施形態において、試料は、血清試料である。このような試料は、様々な方式により得られうる。例えば、試料は、対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、1回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部損傷又は他の種類の鈍力外傷を負った後において得られうる。代替的に、試料は、対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後又はこれらへと曝露された後において得られうる。化学物質又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの1つ以上の組合せである。なおさらに、試料は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られうる。

【0018】

上記された方法のうちのいずれかは、ヒト対象の臨床状態、ヒト対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIの罹患についてのヒト対象の分類、ヒト対象による、低レベル又は高レベルのUCH-L1、GFAP並びに又はUCH-L1及びGFAPの呈示並びにヒト対象が、頭部損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意のヒト対象に対して実行されうる。

【0019】

上記された方法において、アッセイは、イムノアッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、全血である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血清である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血漿である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血漿である。

【0020】

さらに別の態様において、本発明は、ヒト対象を査定して、頭部損傷についてのイメージング手順を実施するのかどうかを決定する方法に関する。本方法は、

a) 推測される頭部への損傷後約24時間以内に、対象から得られた試料に対するアッセイを実施して、早期バイオマーカーの試料中レベルを測定するステップであって、早期バイオマーカーが、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1 (UCH-L

10

20

30

40

50

1)、グリア原線維性酸性タンパク質 (GFAP) 又はこれらの組合せを含むステップ及び
b) 対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しないステップ

を含み、

この場合、基準レベルが、(a) 少なくとも約 70% ~ 約 100% の間の感度及び少なくとも約 30% ~ 約 100% の間の特異度を有するアッセイにより決定される；又は (b) 少なくとも約 20 pg/mL ~ 約 200 pg/mL の間である。早期バイオマーカーレベルが、基準レベルと等しい場合、結果は、陰性であると考えられることから、イメージングは、実施されないことを意味する。

【0021】

上記された方法において、基準レベルは、少なくとも約 80% の感度及び少なくとも約 30% の特異度を有するアッセイにより決定される。一部の実施形態において、基準レベルは、少なくとも約 80 pg/mL ~ 約 150 pg/mL の間である。より特定すると、一部の実施形態において、GFAP についての基準レベルは、約 20 pg/mL ~ 約 200 pg/mL の間である。他の実施形態において、UCH-L1 についての基準レベルは、約 80 pg/mL ~ 約 150 pg/mL の間である。

【0022】

イメージングを実施するかどうかを決定又は査定するための、上記された方法において、対象は、例えば、実施されているか又は既に実施された (アッセイが実施される前を意味する)、MRI スキャン又は CT スキャンなどのイメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象の医学的状態 (患者が意識不明である場合など) に応じて、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) は、対象が、救急治療室、外傷センター又は他の施設に到着した直後に対象が TBI を有するかどうかを評価及び / 若しくは査定するために、行われうる。このようなイメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) は、対象が、軽度、中等度、重度又は中等度 ~ 重度の TBI を有するかどうかを確認及び決定するように、アッセイが実施される前に実施されうる。アッセイが実施された後に、医師による (又は他の医療従事者による) TBI の管理 (例えば、手術による介入及び / 又は薬理学的介入が要求されうるかどうかを決定するためなど) の一部としてのアッセイの結果に基づき、1 回以上の、後続のイメージング手順 (1 回以上の MRI スキャン又は CT スキャンなど) が実施されうる。

【0023】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、対象は、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象は、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) に基づき、軽度 TBI を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) に基づき、中等度 TBI を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) に基づき、重度 TBI を有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順 (MRI スキャン又は CT スキャンなど) に基づき、中等度 ~ 重度の TBI を有することが推測されうる。なおさらに、対象は、MRI に基づき、TBI を有さないことが推測されうる。

【0024】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、使用された基準レベルは、陽性の MRI と相関するか、又はこれに対応する。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、陽性の頭部 CT スキャンと相関するか、又はこれに対応する。なおさらなる実施形態において、基準レベルは、頭蓋内病変と相関するか、又はこれに対応する。例えば、基準レベルは、MRI が陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応し

10

20

30

40

50

うる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。代替的に、基準レベルは、頭部ＣＴスキャンが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。なおさらに、基準レベルは、頭蓋内病変を有する対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するなど）。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、ＴＢＩを患っていない、対照の対象と相関するか、又はこれに対応する。

【００２５】

上記された方法において、試料は、推測される頭部への損傷後、約０～約１２時間以内に採取されうる。例えば、試料は、推測される頭部への損傷後、約５分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約１０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約１２分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１５分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約２０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から３０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から６０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１．５時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から２時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から３時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から４時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から５時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から６時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から７時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から８時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から９時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１０時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１１時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１２時間以内に採取されうる。

【００２６】

一実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、軽度ＴＢＩを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度ＴＢＩを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、重度ＴＢＩを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度～重度のＴＢＩを有すると評価又は査定される。なおさらなる実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、ＴＢＩを有しないと評価又は査定される。

【００２７】

上記された方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のＴＢＩを有すると評価又は査定されたヒト対象を、ＴＢＩのための処置（例えば、手術による処置、治療処置又はこれらの組合せ）により処置するステップをさらに含む。当技術分野で公知であり、本明細書においてさらに記載された、任意のこのような処置は使用されうる。さらに、さらなる実施形態において、ＴＢＩのために処置される、任意の対象はまた、任意選択的に、任意の処置コース中に、かつ、この後において、モニタリングもされうる。代替的に、前記方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のＴＢＩを有すると評価された対象（まだ今のところ、処置を受けていない可能性がある対象など）をモニタリングするステップをさらに含む。

【００２８】

上記された方法において、試料は、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選択されうる。一部の実施形態において、試料は、全血試料である。一部の実施形態において、試料は、血漿試料である。さらに他の実施形態において、試料は、血清試料である。このような試料は、様々な方式により得られうる。例えば、試料は、対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、１回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭

部損傷又は他の種類の鈍力外傷を負った後において得られうる。代替的に、試料は、対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後又はこれらへと曝露された後において得られうる。化学物質又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの1つ以上の組合せである。なおさらに、試料は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られうる。

【0029】

上記された方法は、ヒト対象の臨床状態、ヒト対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIの罹患についてのヒト対象の分類、ヒト対象による、低レベル又は高レベルのUCH-L1、GFAP並びに又はUCH-L1及びGFAPの呈示、並びに

10

【0030】

上記された方法において、アッセイは、イムノアッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、全血である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血清である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血漿である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血漿である。

20

30

【0031】

なおさらなる態様において、本開示は、頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法に関する。本方法は、

a) 推測される損傷後24時間以内に対象から採取された第1の試料及び第1の試料が採取された約3～約6時間後に対象から採取された第2の試料である、対象から得られた少なくとも2つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；

b) 少なくとも2つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1 (UCH-L1)、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (GFAP) 又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ；並びに

40

c) 対象に対して、イメージング手順を実施するのかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーのレベルが第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む。

【0032】

上記された方法において、絶対量は、少なくとも約70%の感度及び少なくとも約100%の特異度並びに少なくとも約30%～約100%の間の感度を有するアッセイにより

50

決定される。一部の実施形態において、絶対量は、少なくとも約 10 pg/mL ~ 約 150 pg/mL の間である。より特定すると、一部の実施形態において、GFAP についての絶対量は、約 30 pg/mL ~ 約 100 pg/mL の間である。他の実施形態において、UCH-L1 についての絶対量は、約 10 pg/mL ~ 約 150 pg/mL の間である。

【0033】

上記された方法において、UCH-L1 のレベルの測定は、

A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) UCH-L1 上又はUCH-L1 断片上のエピトープに結合してUCH-L1 捕捉抗体 - UCH-L1 抗原複合体を形成するUCH-L1 捕捉抗体及び

(2) 検出可能な標識を含み、UCH-L1 捕捉抗体が結合していないUCH-L1 上のエピトープに結合してUCH-L1 抗原 - UCH-L1 検出抗体複合体を形成するUCH-L1 検出抗体

と接触させて、UCH-L1 捕捉抗体 - UCH-L1 抗原 - UCH-L1 検出抗体複合体を形成するステップ並びに

B . UCH-L1 の、試料中量又は試料中濃度を、UCH-L1 捕捉抗体 - UCH-L1 抗原 - UCH-L1 検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定するステップを含む。

【0034】

代替的に、上記された方法において、GFAP のレベルの測定は、

A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) GFAP 上又はGFAP 断片上のエピトープに結合してGFAP 捕捉抗体 - GFAP 抗原複合体を形成するGFAP 捕捉抗体及び

(2) 検出可能な標識を含み、GFAP 捕捉抗体が結合していないGFAP 上のエピトープに結合してGFAP 抗原 - GFAP 検出抗体複合体を形成するGFAP 検出抗体と接触させて、GFAP 捕捉抗体 - GFAP 抗原 - GFAP 検出抗体複合体を形成するステップ並びに

B . GFAP の、試料中量又は試料中濃度を、GFAP 捕捉抗体 - GFAP 抗原 - GFAP 検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定するステップを含む。

【0035】

イメージングを実施するのかどうかを決定又は査定するための、上記された方法において、対象は、例えば、実施されているか、又は既に実施された（アッセイが実施される前を意味する）、MRI スキャン又はCT スキャンなどのイメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象の医学的状態（患者が意識不明である場合など）に応じて、イメージング手順（MRI スキャン又はCT スキャンなど）は、対象が、救急治療室、外傷センター又は他の施設に到着した直後に対象がTBIを有するのかどうかを評価及び/若しくは査定するために、行われうる。このようなイメージング手順（MRI スキャン又はCT スキャンなど）は、対象が、軽度、中等度、重度又は中等度 ~ 重度のTBIを有するのかどうかを確認及び決定するように、アッセイが実施される前に実施されうる。アッセイが実施された後に、医師による（又は他の医療従事者による）TBIの管理（例えば、手術による介入及び/又は薬理学的介入が要求されうるのかどうかを決定するためなど）の一部としてのアッセイの結果に基づき、1 回以上の、後続のイメージング手順（1 回以上のMRI スキャン又はCT スキャンなど）が実施されうる。

【0036】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、対象は、イメージング手順（MRI スキャン又はCT スキャンなど）に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象は、イメージング手順（MRI スキャン又はCT スキャンなど）に基づき、軽度TBIを有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（MRI スキャン又はCT スキャンなど）に基づき、中等度TBIを有することが推測されう

10

20

30

40

50

る。代替的に、対象は、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）に基づき、重度TBIを有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）に基づき、中等度～重度のTBIを有することが推測されうる。なおさらに、対象は、MRIに基づき、TBIを有さないことが推測されうる。

【0037】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、使用された基準レベルは、陽性のMRIと相関するか、又はこれに対応する。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、陽性の頭部CTスキャンと相関するか、又はこれに対応する。なおさらなる実施形態において、基準レベルは、頭蓋内病変と相関するか、又はこれに対応する。例えば、基準レベルは、MRIが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。代替的に、基準レベルは、頭部CTスキャンが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。なおさらに、基準レベルは、頭蓋内病変を有する対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、TBIを患っていない、対照の対象と相関するか、又はこれに対応する。

10

【0038】

上記された方法において、試料は、推測される頭部への損傷後、約0～約12時間以内に採取されうる。例えば、試料は、推測される頭部への損傷後、約5分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約10分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約12分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から15分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約20分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から30分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から60分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から1.5時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から2時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から3時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から4時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から5時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から6時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から7時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から8時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から9時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から10時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から11時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から12時間以内に採取されうる。

20

30

【0039】

一実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、軽度TBIを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度TBIを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、重度TBIを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度～重度のTBIを有すると評価又は査定される。なおさらなる実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、TBIを有しないと評価又は査定される。

40

【0040】

上記された方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIを有すると評価又は査定されたヒト対象を、TBIのための処置（例えば、手術による処置、治療処置又はこれらの組合せ）により処置するステップをさらに含む。当技術分野で公知であり、本明細書においてさらに記載された、任意のこのような処置は使用されうる。さらに、さらなる実施形態において、TBIのために処置される、任意の対象はまた、任意選択的に、

50

任意の処置コース中に、かつ、この後において、モニタリングもされうる。代替的に、前記方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のＴＢＩを有すると評価された対象（まだ今のところ、処置を受けていない可能性がある対象など）をモニタリングするステップをさらに含む。

【００４１】

上記された方法において、試料は、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選択されうる。一部の実施形態において、試料は、全血試料である。一部の実施形態において、試料は、血漿試料である。さらに他の実施形態において、試料は、血清試料である。このような試料は、様々な方式により得られうる。例えば、試料は、対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、１回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部損傷又は他の種類の鈍力外傷を負った後において得られうる。代替的に、試料は、対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後又はこれらへと曝露された後において得られうる。化学物質又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの１つ以上の組合せである。なおさらに、試料は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られうる。

10

【００４２】

上記された方法は、ヒト対象の臨床状態、ヒト対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のＴＢＩの罹患についてのヒト対象の分類、ヒト対象による低レベル又は高レベルのＵＣＨ－Ｌ１、ＧＦＡＰ並びに／又はＵＣＨ－Ｌ１及びＧＦＡＰの呈示並びにヒト対象が頭部損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意のヒト対象に対して実行されうる。

20

【００４３】

上記された方法において、アッセイは、イムノアッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、全血である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血清である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血漿である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血漿である。

30

40

【００４４】

なおさらなる態様において、本開示は、ヒト対象を査定して、頭部損傷についてのイメージング手順を実施するのかどうかを決定する方法に関する。本方法は、

a) 推測される損傷後、２４時間以内に対象から採取された第１の試料及び第１の試料が採取された約３～約６時間後に対象から採取された第２の試料である、対象から得られた少なくとも２つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；

b) 少なくとも２つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼＬ１（ＵＣＨ－Ｌ１）、グリア細胞線維性酸性タンパク質（ＧＦＡＰ）又はこれらの組合せを含

50

む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ；並びに

c) 対象に対して、イメージング手順を実施するのかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーのレベルが第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの第1の試料から第2の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む。

【0045】

上記された方法において、絶対量は、少なくとも約70%の感度及び少なくとも約100%の特異度並びに少なくとも約30%～約100%の間の感度を有するアッセイにより決定される。一部の実施形態において、絶対量は、少なくとも約10 pg/mL～約150 pg/mLの間である。より特定すると、一部の実施形態において、GFAPについての絶対量は、約30 pg/mL～約100 pg/mLの間である。他の実施形態において、UCH-L1についての絶対量は、約10 pg/mL～約150 pg/mLの間である。

【0046】

上記された方法において、UCH-L1のレベルの測定は、

A. 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) UCH-L1上又はUCH-L1断片上のエピトープに結合してUCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原複合体を形成するUCH-L1捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、UCH-L1捕捉抗体が結合していないUCH-L1上のエピトープに結合してUCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体を形成するUCH-L1検出抗体

と接触させて、UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体を形成するステップ並びに

B. UCH-L1の、試料中量又は試料中濃度を、UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定するステップ

を含む。

【0047】

代替的に、上記された方法において、GFAPのレベルの測定は、

A. 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) GFAP上又はGFAP断片上のエピトープに結合してGFAP捕捉抗体-GFAP抗原複合体を形成するGFAP捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、GFAP捕捉抗体が結合していないGFAP上のエピトープに結合してGFAP抗原-GFAP検出抗体複合体を形成するGFAP検出抗体と接触させて、GFAP捕捉抗体-GFAP抗原-GFAP検出抗体複合体を形成するステップ並びに

B. GFAPの、試料中量又は試料中濃度を、GFAP捕捉抗体-GFAP抗原-GFAP検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定するステップを含む。

【0048】

イメージングを実施するのかどうかを決定又は査定するための、上記された方法において、対象は、例えば、実施されている、又は既に実施された（アッセイが実施される前を意味する）、MRIスキャン又はCTスキャンなどのイメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象の医学的状態（患者が意識不明である場合など）に応じて、イメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）は、対象が、救急治療室、外傷センター又は他の施設に到着した直後に対象がTBIを有するのかどうかを評価及び/若しくは査定するために、行われうる。このようなイメージング手順（MRIスキャン又はCTスキャンなど）は、対象が、軽度、中等度、重度又は中等度～重度のTBIを有するのかどうかを確認及び決定するように、アッセイが実施される前

10

20

30

40

50

に実施されうる。アッセイが実施された後に、医師による（又は他の医療従事者による）ＴＢＩの管理（例えば、手術による介入及び／又は薬理学的介入が要求されうるのかどうかを決定するためなど）の一部としてのアッセイの結果に基づき、１回以上の、後続のイメージング手順（１回以上のＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）が実施されうる。

【００４９】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、対象は、イメージング手順（ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）に基づき、外傷性脳損傷を有することが推測されうる。例えば、対象は、イメージング手順（ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）に基づき、軽度ＴＢＩを有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）に基づき、中等度ＴＢＩを有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）に基づき、重度ＴＢＩを有することが推測されうる。代替的に、対象は、イメージング手順（ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンなど）に基づき、中等度～重度のＴＢＩを有することが推測されうる。なおさらに、対象は、ＭＲＩに基づき、ＴＢＩを有さないことが推測されうる。

10

【００５０】

上記の方法についての、ある特定の実施形態において、使用された基準レベルは、陽性のＭＲＩと相関するか、又はこれに対応する。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、陽性の頭部ＣＴスキャンと相関するか、又はこれに対応する。なおさらなる実施形態において、基準レベルは、頭蓋内病変と相関するか、又はこれに対応する。例えば、基準レベルは、ＭＲＩが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。代替的に、基準レベルは、頭部ＣＴスキャンが陽性である対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。なおさらに、基準レベルは、頭蓋内病変を有する対象と相関しうるか、又はこれに対応しうる（基準レベルの上昇又は低下を介するように）。上記の方法についての、他の実施形態において、基準レベルは、ＴＢＩを患っていない、対照の対象と相関する、又はこれに対応する。

20

【００５１】

上記された方法において、試料は、推測される頭部への損傷後、約０～約１２時間以内に採取されうる。例えば、試料は、推測される頭部への損傷後、約５分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約１０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約１２分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１５分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から約２０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から３０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から６０分以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１．５時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から２時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から３時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から４時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から５時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から６時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から７時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から８時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から９時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１０時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１１時間以内に採取されうる。代替的に、試料は、推測される頭部への損傷から１２時間以内に採取されうる。

30

40

【００５２】

一実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、軽度ＴＢＩを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度ＴＢＩを有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して

50

、対象は、重度 T B I を有すると評価又は査定される。別の実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、中等度～重度の T B I を有すると評価又は査定される。なおさらなる実施形態において、上記された方法を使用して、対象は、T B I を有しないと評価又は査定される。

【 0 0 5 3 】

上記された方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の T B I を有すると評価又は査定されたヒト対象を、T B I のための処置（例えば、手術による処置、治療処置又はこれらの組合せ）により処置するステップをさらに含む。当技術分野で公知であり、本明細書においてさらに記載された、任意のこのような処置は使用される。さらに、さらなる実施形態において、T B I のために処置される、任意の対象はまた、任意選択的に、任意の処置コース中に、かつ、この後において、モニタリングもされる。代替的に、前記方法は、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の T B I を有すると評価された対象（まだ今のところ、処置を受けていない可能性がある対象など）をモニタリングするステップをさらに含む。

10

【 0 0 5 4 】

上記された方法において、試料は、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選択される。一部の実施形態において、試料は、全血試料である。一部の実施形態において、試料は、血漿試料である。さらに他の実施形態において、試料は、血清試料である。このような試料は、様々な方式により得られる。例えば、試料は、対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、1 回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部損傷又は他の種類の鈍的外傷を負った後において得られる。代替的に、試料は、対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後又はこれらへと曝露された後において得られる。化学物質又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの 1 つ以上の組合せである。なおさらに、試料は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られる。

20

【 0 0 5 5 】

上記された方法は、ヒト対象の臨床状態、ヒト対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度～重度の T B I の罹患についてのヒト対象の分類、ヒト対象による低レベル又は高レベルの U C H - L 1、G F A P 並びに / 又は U C H - L 1 及び G F A P の呈示、並びにヒト対象が頭部損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意のヒト対象に対して実行される。

30

【 0 0 5 6 】

上記された方法において、アッセイは、イムノアッセイである。一部の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイである。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、全血である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、全血である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、ポイントオブケアアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血清である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血清である。さらに他の実施形態において、アッセイは、イムノアッセイであり、対象は、ヒトであり、試料は、血漿である。さらに他の実施形態において、ア

40

50

ッセイは、臨床化学アッセイであり、試料は、血漿である。なおさらなる実施形態において、アッセイは、単一分子検出アッセイであり、試料は、血漿である。

【図面の簡単な説明】

【0057】

【図1A】例示的な対象のサブセットによる、損傷からの時間と対比した、バイオマーカーであるUCH-L1の結果を示す図である。

【図1B】例示的な対象のサブセットによる、損傷からの時間と対比した、バイオマーカーであるGFAPの結果を示す図である。

【図2A】時点でのMRIを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベル(図2A)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。試料は、頭部損傷から24時間以内に採取される。

10

【図2B】時点でのMRIを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベル(図2B)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。試料は、頭部損傷から24時間以内に採取される。

【図3A】MRIを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、時点2におけるUCH-L1レベルと、時点1におけるUCH-L1レベルとの絶対差違)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。

20

【図3B】MRIを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、時点2におけるGFAPレベルと、時点1におけるGFAPレベルとの絶対差違)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。

【図4A】時点による、CTスキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベル(図4A)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。試料は、頭部損傷から24時間以内に採取される。

30

【図4B】時点による、CTスキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベル(図4B)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。試料は、頭部損傷から24時間以内に採取される。

【図5A】CTスキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、時点2におけるUCH-L1レベルと、時点1におけるUCH-L1レベルとの絶対差違)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。

40

【図5B】CTスキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、時点2におけるGFAPレベルと、時点1におけるGFAPレベルとの絶対差違)についての、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す図である。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。

【図6A】時点による、MRIスキャン又はCTスキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベル(図6A)についての、ROC(re

50

ceiver operating characteristic) 解析を示す図である。
。試料は、頭部損傷から 24 時間以内に採取される。

【図 6 B】時点による、MRI スキャン又は CT スキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAP レベル (図 6 B) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。試料は、頭部損傷から 24 時間以内に採取される。

【図 7 A】MRI スキャン又は CT スキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH - L1 レベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点 2 における UCH - L1 レベルと、時点 1 における UCH - L1 レベルとの絶対差違) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。時点 1 における試料が、頭部損傷から 24 時間以内に採取されるのに対し、時点 2 における試料は、時点 1 試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に採取される。

10

【図 7 B】MRI スキャン又は CT スキャンを使用する、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAP レベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点 2 における GFAP レベルと、時点 1 における GFAP レベルとの絶対差違) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。時点 1 における試料が、頭部損傷から 24 時間以内に採取されるのに対し、時点 2 における試料は、時点 1 試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に採取される。

【図 8 A】時点での MRI を使用するが、CT スキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、UCH - L1 レベル (図 8 A) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。試料は、頭部損傷から 24 時間以内に採取される。

20

【図 8 B】時点での MRI を使用するが、CT スキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、GFAP レベル (図 8 B) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。試料は、頭部損傷から 24 時間以内に採取される。

【図 9 A】MRI を使用するが、CT スキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、UCH - L1 レベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点 2 における UCH - L1 レベルと、時点 1 における UCH - L1 レベルとの絶対差違) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。時点 1 における試料が、頭部損傷から 24 時間以内に採取されるのに対し、時点 2 における試料は、時点 1 試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に採取される。

30

【図 9 B】MRI を使用するが、CT スキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、GFAP レベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点 2 における GFAP レベルと、時点 1 における GFAP レベルとの絶対差違) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す図である。時点 1 における試料が、頭部損傷から 24 時間以内に採取されるのに対し、時点 2 における試料は、時点 1 試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に採取される。

【発明を実施するための形態】

【0058】

40

本開示は、頭部への損傷を負ったヒト対象又は負った可能性があるヒト対象が、UCH - L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルに基づく、磁気共鳴イメージング (MRI) 又は頭部コンピュータ断層撮影 (CT) スキャンのようなイメージング手順から利益を得、それにより、イメージング手順を受けるのかどうかについて決定する一助となる方法に関する。これらの方法は、頭部への損傷又は推測される頭部への損傷から約 24 時間以内、例えば、0 ~ 約 12 時間の時点においてヒト対象から採取された 1 つ以上の試料中の、UCH - L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルを検出するステップを伴う。頭部への損傷後又は推測される損傷後最初の約 24 時間以内における、UCH - L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルであって、早期バイオマーカーの基準レベルより高いレベル

50

の検出は、ヒト対象が、イメージング手順を受ける、すなわち、イメージング手順「を組み入れる」べきであるのかどうかについての決定の一助を提供する。例えば、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルであって、早期バイオマーカーの基準レベルより高いレベルを有するヒト対象もまた、頭部CTスキャンが陽性となる、又はMRIが陽性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在する（したがって、例えば、潜在的なTBIを指し示す）可能性が高く、したがって、頭部CTスキャン又はMRIを施されることから利益を得る対象として同定されうる。代替的に、早期バイオマーカーの、ある特定のレベルは、イメージング手順に対する必要「を除外する」のに使用されうる。例えば、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルであって、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルより低いレベルを有するヒト対象は、頭部CTスキャンが陰性となる、又はMRIが陰性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在しない可能性が高く、したがって、頭部CTスキャン又はMRIが必要とされない、又は実施されない対象として同定されうる。

10

【0059】

本発明は、頭部への損傷又は推測される頭部への損傷から24時間以内の、異なる時点においてヒト対象から採取された、1つ以上の試料中のUCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルを検出するステップを伴う方法に関する。頭部への損傷後又は推測される損傷後、最初の約24時間以内の、その後の早期バイオマーカーのレベルの低下が後続しうる、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルの上昇（increase）又は上昇（elevated）の検出は、ヒト対象が、MRI又は頭部CTスキャンなどのイメージング手順を受けるべきであるのかどうかを決定する一助を提供する。例えば、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの、ある絶対量だけの、少なくとも上昇又は低下を有するヒト対象もまた、頭部CTスキャンが陽性となる、又はMRIが陽性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在する（したがって、例えば、潜在的なTBIを指し示す）可能性が高く、したがって、頭部CTスキャン又はMRIを施される、すなわち、イメージング手順「を組み入れる」ことから利益を得る対象として同定されうる。

20

【0060】

代替的に、早期バイオマーカーの、少なくともある絶対量による、低下又は上昇が見られないことは、イメージング手順に対する必要「を除外する」のに使用されうる。例えば、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルの変化であって、ある絶対量より小さな変化を有するヒト対象は、頭部CTスキャンが陰性となる、又はMRIが陰性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在しない可能性が高く、したがって、頭部CTスキャン又はMRIが必要とされない、又は実施されない対象として同定されうる。

30

【0061】

いかなる疑義も回避するために、約24時間以内の時点において、ヒト対象から採取された1つ以上の試料とは、試料が、前記24時間以内に得られ、アッセイが実施されるという事実を指す。

40

【0062】

本明細書の本節及び全開示において使用された節の小見出しは、構成上の目的だけのものであり、限定的であることを意図するものではない。

【0063】

1. 定義

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書において使用された、全ての技術用語及び科学用語は、当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。齟齬が生じる場合は、定義を含む本文献に従う。本発明の実施又は試験において、本明細書において記載された方法及び材料と同様又は同等な方法及び材料も使用されうるが、下記において、好ましい方法及び材料について記載される。本明細書において言及された、全ての

50

刊行物、特許出願、特許及び他の参考文献は、参照によりそれらの全体において組み込まれる。本明細書において開示された材料、方法及び例は、例示的なものであるに過ぎず、限定を意図するものではない。

【0064】

本明細書において使用された「～を含む (comprise(s))」、「～を含む (include(s))」、「～を有すること」、「～を有する」、「～でありうる」、「～を含有する」という用語は、さらなる行為又は構造の可能性を除外しない、オープンエンドな移行句、移行用語又は移行語である。単数形の「ある」及び「その」は、文脈によりそうでないことが明らかに指示されない限りにおいて、複数の指示対象を含む。本開示はまた、明示されているのであれ、そうでないのであれ、本明細書において提示された実施形態又は要素「を含み」、これら「からなり」、これら「から本質的になる」、他の実施形態も想定する。

10

【0065】

本明細書において、数値範囲を列挙するために、それらの間に介在する、同じ精度を伴う各数が明示的に想定される。例えば、6～9の範囲について、6及び9に加えて、7及び8の数も想定され、6.0～7.0の範囲について、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9及び7.0の数が、明示的に想定される。

【0066】

本明細書において「アフィニティー成熟抗体」とは、標的抗原に対する抗体のアフィニティー（すなわち、 K_D 、 k_d 又は k_a ）の変更を有さない親抗体と比較した改善を結果としてもたらす、1つ以上のCDR内の、1カ所以上の変更を伴う抗体を指すように使用される。例示的なアフィニティー成熟抗体は、標的抗原に対する、ナノモル単位なお又はピコモル単位のアフィニティーを有する。BioDisplay法を使用して調製されたコンビナトリアル抗体ライブラリーのスクリーニングを含め、アフィニティー成熟抗体を作製するための様々な手順が当技術分野において公知である。例えば、Marksら、Biotechnology、10:779～783(1992)は、VHとVLとのドメインシャッフリングによるアフィニティー成熟について記載している。CDR残基及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発については、Barbasら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、91:3809～3813(1994)；Schierら、Gene、169:147～155(1995)；Yeltonら、J. Immunol.、155:1994～2004(1995)；Jacksonら、J. Immunol.、154(7):3310～3319(1995)及びHawkinsら、J. Mol. Biol.、226:889～896(1992)により記載されている。選択的突然変異誘発位置及び活性増強アミノ酸残基を伴う接触位置はたは超変異位置における選択的突然変異については、米国特許第6,914,128B1号において記載されている。

20

30

【0067】

本明細書において使用された「抗体 (antibody)」及び「抗体 (antibodies)」とは、モノクローナル抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体（完全ヒト化抗体又は部分的ヒト化抗体）、鳥類（例えば、アヒル又はガチョウ）抗体、サメ抗体、クジラ抗体及び非霊長動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット、マウスなど）抗体又は非ヒト霊長動物（例えば、サル、チンパンジーなど）抗体を含む哺乳動物抗体のようであるがこれらに限定されない動物抗体、組換え抗体、キメラ抗体、単鎖Fv（「scFv」）、単鎖抗体、単ドメイン抗体、Fab断片、F(ab')断片、F(ab')₂断片、ジスルフィド連結型Fv（「sdFv」）及び抗イディオタイプ（「抗Id」）抗体、二重ドメイン抗体、二重可変ドメイン（DVD）又は三重可変ドメイン（TVD）抗体（二重可変ドメイン免疫グロブリン及びそれらを作り出すための方法について、各々の内容が参照により本明細書に組み込まれる、Wu, C.ら、Nature Biotechnology

40

50

、25(11):1290~1297(2007)及びPCT国際出願第2001/058956号において記載されている)並びに上記のうちのいずれかの、機能的に活性なエピトープ結合性断片を指す。特に、抗体は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫活性断片、すなわち、解析物結合性部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、任意の種類(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2)又はサブクラスの分子でありうる。簡潔さのために、本明細書において、解析物に対する抗体は、「抗解析物抗体」又は、単に、「解析物抗体」(例えば、抗UCH-L1抗体又はUCH-L1抗体)と称されることが多い。

【0068】

本明細書において使用された「抗体断片」とは、抗原結合性部位又は可変領域を含む、無傷抗体の部分の部分を指す。部分は、無傷抗体のFc領域の重鎖定常ドメイン(すなわち、抗体アイソタイプに応じて、CH2、CH3又はCH4)を含まない。抗体断片の例は、Fab断片、Fab'断片、Fab'-SH断片、F(ab)₂断片、Fd断片、Fv断片、ダイアボディー、単鎖Fv(scFv)分子、1つだけの軽鎖可変ドメインを含有する単鎖ポリペプチド、軽鎖可変ドメインの3つのCDRを含有する単鎖ポリペプチド、1つだけの重鎖可変領域を含有する単鎖ポリペプチド及び重鎖可変領域の3つのCDRを含有する単鎖ポリペプチドを含むがこれらに限定されない。

【0069】

「曲線下面積」又は「AUC」とは、ROC曲線下面積を指す。ROC曲線下AUCとは、精度についての尺度である。AUCが1であることが、完全な検査を表すのに対し、AUCが0.5であることは、非有意な検査を表す。好ましいAUCは、少なくとも約0.700、少なくとも約0.750、少なくとも約0.800、少なくとも約0.850、少なくとも約0.900、少なくとも約0.910、少なくとも約0.920、少なくとも約0.930、少なくとも約0.940、少なくとも約0.950、少なくとも約0.960、少なくとも約0.970、少なくとも約0.980、少なくとも約0.990又は少なくとも約0.995でありうる。

【0070】

本明細書において、「ビーズ」と「粒子」とは、互換的に使用され、実質的に球形の固体支持体を指す。ビーズ又は粒子の一例は、マイクロ粒子である。本明細書において使用されるマイクロ粒子は、当技術分野において公知である、任意の種類でありうる。例えば、ビーズ又は粒子は、磁気ビーズ又は磁気粒子でありうる。磁気ビーズ/粒子は、強磁性、フェリ磁性、常磁性、超常磁性又は磁性流体でありうる。例示的な強磁性材料は、Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO及びNiO/Feを含む。フェリ磁性材料の例は、NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄(又はFeO・Fe₂O₃)を含む。ビーズは、磁性であり、1つ以上の非磁性層により取り囲まれた、固体コア部分を有しうる。代替的に、磁性部分は、非磁性コアの周囲の層でありうる。マイクロ粒子は、本明細書において記載された方法において働く、任意のサイズ、例えば、約0.75~約5nm又は約1~約5nm又は約1~約3nmでありうる。

【0071】

本明細書において、「結合性タンパク質」とは、例えば、ポリペプチド、抗原、化合物若しくは他の分子、又は任意の種類の基質のような、結合パートナーに結合し、これと共に複合体を形成する、単量体又は多量体のタンパク質を指すように使用される。結合性タンパク質は、結合パートナーに特異的に結合する。結合性タンパク質は、抗体のほか、当技術分野において公知であり、本明細書の下記において記載される、これらの抗原結合性断片及びこれらの他の多様な形態及び誘導体並びに抗原分子又は抗原分子上の特定の部位(エピトープ)に結合する、1つ以上の抗原結合性ドメインを含む他の分子を含む。したがって、結合性タンパク質は、四量体の免疫グロブリンである抗体、IgG分子、IgG1分子、モノクローナル抗体、キメラ抗体、CDRグラフト抗体、ヒト化抗体、アフニティー成熟抗体及び抗原に結合する能力を保持する、任意のこのような抗体の断片を含む

10

20

30

40

50

がこれらに限定されない。

【0072】

本明細書において、「二特異性抗体」とは、それらのうちの1つだけが機能的な二特異性抗体である複数の異なる免疫グロブリン分子種を結果としてもたらす形で、クアドローマ技術(Milsteinら、Nature、305(5934):537~540(1983))を参照されたい)、2つの異なるモノクローナル抗体の化学的コンジュゲーション(Staerzら、Nature、314(6012):628~631(1985))を参照されたい)、又はFc領域内の突然変異を導入するKIH(knob-hole)法若しくは同様の手法(Holligerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90(14):6444~6448(1993))を参照されたい)により作出された全長抗体を指すように使用される。二特異性抗体は、その2つの結合性アーム(HC/LCの1つの対)のうちの1つにおける、1つの抗原(又はエピトープ)に結合し、その第2のアーム(HC/LCの異なる対)における、異なる抗原(又はエピトープ)に結合する。この定義により、二特異性抗体は、2つの顕著に異なる抗原結合性アーム(特異性配列及びCDR配列の両方)を有し、それが結合する各抗原について一価である。

10

【0073】

本明細書において、「CDR」とは、抗体の可変配列内の「相補性決定領域」を指すように使用される。重鎖及び軽鎖の可変領域の各々において、3つずつのCDRが存在する。重鎖又は軽鎖のN末端から順に、これらの領域は、可変領域の各々について、「CDR1」、「CDR2」及び「CDR3」と表記されている。本明細書において使用された「CDRセット」という用語は、単一の可変領域において生じる、3つのCDRの群であって、抗原に結合するCDRの群を指す。したがって、抗原結合性部位は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の各々に由来するCDRセットを含む、6つのCDRを含みうる。単一のCDR(例えば、CDR1、CDR2又はCDR3)を含むポリペプチドは、「分子認識単位」と称されうる。抗原-抗体複合体についての結晶構造解析は、CDRのアミノ酸残基が、結合した抗原との、広範な接触部を形成し、この場合、最も広範な抗原の接触部は、重鎖CDR3との接触部であることを裏付けている。したがって、分子認識単位は、主に、抗原結合性部位の特異性の一因となりうる。一般に、CDR残基は、抗原への結合に対する影響に、直接、かつ、極めて実質的に関与する。

20

30

【0074】

これらのCDRの正確な境界は、異なるシステムに従い、異なる形で規定されている。Kabata(Kabataら、「Sequences of Proteins of Immunological Interest」(National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987)及び(1991))により記載されているシステムは、抗体の任意の可変領域へと適用可能である、明確な残基番号付けシステムを提示するだけでなく、また、3つのCDRを規定する、正確な残基の境界も提示している。これらのCDRは、「Kabata CDR」と称されうる。Chothia及び同僚(Chothia及びLesk, J. Mol. Biol., 196:901~917(1987);並びにChothiaら、Nature、342:877~883(1989))は、Kabata CDR内の、ある特定の下部部分(sub-portion)が、アミノ酸配列のレベルにおいて、大きな多様性を有するにもかかわらず、ほぼ同一なペプチド骨格のコンフォメーションを取ることを見出した。これらの下部部分は、「L」及び「H」が、それぞれ、軽鎖領域及び重鎖領域を名指す、「L1」、「L2」及び「L3」、又は「H1」、「H2」及び「H3」と名指された。これらの領域は、「Chothia CDR」と称される場合があり、これらは、Kabata CDRと重複する境界を有する。Kabata CDRと重複するCDRを規定する他の境界について、Padlan、FASEB J., 9:133~139(1995);及びMacCallum、J. Mol. Biol., 262(5):732~745(1996)により記載されている。さらに他のCDRの境界の定義は、本明細書のシステムの定義に厳密に従

40

50

わない場合もあり、特定の残基若しくは残基群なお又は全 C D R が、抗原への結合に、著明な影響を及ぼさないという予測又は実験による知見に照らして、短くなる場合もあり、長くなる場合もあるが、それでも、K a b a t C D R と重複する。本明細書において使用された方法は、これらのシステムのうちのいずれに従い規定された C D R も用いるが、ある特定の実施形態は、K a b a t より規定された C D R 又は C h o t h i a により規定された C D R を使用する。

【 0 0 7 5 】

「構成要素 (c o m p o n e n t)」、「構成要素 (c o m p o n e n t s)」又は「少なくとも 1 つの構成要素」とは、一般に、本明細書において記載された方法及び当技術分野において公知である他の方法に従う、患者の尿試料、全血試料、血清試料又は血漿試料のような被験試料についてのアッセイのためのキット内に含まれうる捕捉抗体、検出試薬又は検出コンジュゲート、校正物質、対照、感度パネル、容器、緩衝液、希釈剤、塩、酵素、酵素に対する補因子、検出試薬、前処理試薬 / 溶液、基質 (例えば、溶液としての)、停止溶液などを指す。一部の構成要素は、溶液でありうる、又はアッセイにおける使用のための復元のために、凍結乾燥させられうる。

【 0 0 7 6 】

本明細書において使用された「～と関連させた」とは、「～と比較した」を指す。

【 0 0 7 7 】

本明細書において使用された「C T スキャン」とは、コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンを指す。C T スキャンは、異なる角度から得られた、一連の X 線画像を組み合わせ、コンピュータ処理を使用して、体内の骨、血管及び軟部組織についての断面画像又は切片を創出する。C T スキャンは、X 線 C T、ポジトロン放射断層撮影 (P E T)、単一光子放射コンピュータ断層撮影 (S P E C T)、コンピュータ軸方向断層撮影 (C A T スキャン) 又はコンピュータ支援断層撮影を使用しうる。C T スキャンは、従来の C T スキャン又は渦巻き状 / らせん状 C T スキャンでありうる。従来の C T スキャンにおいて、スキャンは、切片ごとに得られ、各切片のスキャンの後、停止及び次の切片への移動、例えば、腹部の上方から、骨盤への移動がなされる。従来の C T スキャンは、動きによるアーチファクトを回避するために、患者が息を止めることを要求する。渦巻き状 / らせん状 C T スキャンは、連続スキャンであり、渦巻き状に得られ、スキャンされた画像が連続的であるので、工程がはるかに迅速である。

【 0 0 7 8 】

本明細書において「アッセイにより決定された」とは、任意の適切なアッセイによる、基準レベルの決定を指すように使用される。一部の実施形態において、基準レベルの決定は、対象に由来する試料へと適用されるアッセイと同じ種類のアッセイにより (例えば、イムノアッセイ、臨床化学アッセイ、単一分子検出アッセイ、タンパク質免疫沈降、免疫電気泳動、化学分析、S D S - P A G E 及びウェスタンブロット解析又はタンパク質免疫染色、電気泳動解析、タンパク質アッセイ、競合的結合アッセイ、機能的タンパク質アッセイ又は高速液体クロマトグラフィー (H P L C) 若しくは液体クロマトグラフィー - 質量分析 (L C / M S) のような、クロマトグラフィー法若しくは分光法により) 達成されうる。一部の実施形態において、基準レベルの決定は、対象に由来する試料へと適用されるアッセイと同じ種類のアッセイにより、同じアッセイ条件下において達成されうる。本明細書において言及される通り、本開示は、例示的な基準レベルを提示する (例えば、異なる時点における基準レベルを比較することにより計算される)。本明細書における本開示を、他のアッセイに適合させて、本開示により提示された記載に基づき、これらの他のアッセイについて、アッセイ特異的な基準レベルを得ることは、十分に、当業者の技術の範囲内にある。例えば、頭部への損傷を負ったことが既知のヒト対象から得られた試料 (そして、より特定すると、(i) 軽度 T B I 及び / 又は (i i) 中等度、重度又は中等度 ~ 重度の T B I を負ったことが既知のヒト対象から得られた試料) 及び頭部への損傷を負っていないことが既知のヒト対象から得られた試料を含むトレーニング試料のセットは、アッセイ特異的な基準レベルを得るのに使用されうる。本明細書において、「アッセイに

10

20

30

40

50

より決定され」、列挙されたレベルの「感度」及び／又は「特異度」を有する、基準レベルは、前記基準レベルが、本発明の方法において採用された場合に、列挙された感度及び／又は特異度についての方法をもたらすことが決定された、基準レベルを指すように使用されることが理解される。例えば、複数の異なる可能な基準レベルを使用する、アッセイデータについての統計学的解析の反復により、本発明の方法において与えられた基準レベルと関連する感度及び特異度を決定することは、十分に、当業者の技術の範囲内にある。

【 0 0 7 9 】

実質的に、外傷性脳損傷を有する対象と、外傷性脳損傷を有さない対象とを識別するか、又は軽度外傷性脳損傷を有する対象を、中等度、重度又は中等度～重度の外傷性脳損傷と対比して識別する場合、当業者は、感度及び特異度に対するカットオフを上昇させることの効果を、秤にかける。カットオフを上昇又は下落させることは、十分に規定され、予測可能な影響を、感度及び特異度並びに他の標準的な統計学的尺度に対して及ぼす。カットオフを上昇させることは、特異度を改善するが、感度（疾患を伴う対象の、検査陽性となる比率）を悪化させることが周知である。これに対し、カットオフを下落させることは、感度を改善するが、特異度（疾患を伴わない対象の、検査陰性となる比率）を悪化させる。外傷性脳損傷を検出するか、又は中等度、重度若しくは中等度～重度の外傷性脳損傷と対比した、軽度外傷性脳損傷を決定するための分岐点は、当業者にたやすく明らかである。対象が、外傷性脳損傷又は中等度、重度又は中等度～重度の外傷性脳損傷と対比した、軽度外傷性脳損傷を有するのか、有さないのかの識別においてカットオフが上昇するほど、より多くの真陰性（すなわち、外傷性脳損傷を有さない、軽度外傷性脳損傷を有さない、中等度外傷性脳損傷を有さない、重度外傷性脳損傷を有さない、又は中等度～重度の外傷性脳損傷を有さない対象）が、外傷性脳損傷、軽度外傷性脳損傷、中等度外傷性脳損傷、重度外傷性脳損傷又は中等度～重度の外傷性脳損傷を有する対象から区別されるので、特異度が改善される。しかし、同時に、カットオフを上昇させることは、陽性として同定された症例の数の全体並びに真陽性の数を減少させるので、感度は低下するはずである。逆に、カットオフが下落するほど、より多くの真陽性（すなわち、外傷性脳損傷を有する、軽度外傷性脳損傷を有する、中等度外傷性脳損傷を有する、重度外傷性脳損傷を有するか、又は中等度～重度の外傷性脳損傷を有する対象）が、外傷性脳損傷、軽度外傷性脳損傷、中等度外傷性脳損傷、重度外傷性脳損傷又は中等度～重度の外傷性脳損傷を有さない対象から区別されるので、感度が改善される。しかし、同時に、カットオフを下落させることは、陽性として同定された症例の数の全体並びに偽陽性の数を増大させるので、特異度は低下するはずである。

【 0 0 8 0 】

一般に、高感度値は、当業者が、疾患又は状態（外傷性脳損傷、軽度外傷性脳損傷、中等度外傷性脳損傷、重度外傷性脳損傷又は中等度～重度の外傷性脳損傷など）を除外する一助となり、高特異度値は、当業者が、疾患又は状態を組み入れる一助となる。当業者が、疾患を除外するのか、これを組み入れるのかは、エラーの種類それぞれについて、どのような帰結が患者のためになるのかに依存する。したがって、値がどのようにして選択されたのかについての基本情報の完全な開示がなされなければ、検査カットオフを導出するのに利用される正確なバランスを、知ること又は予測することができない。特異度に対する感度のバランス及び他の因子は、症例ごとに異なる。このために、医師又は医療従事者が選択しうるように、代替的なカットオフ（例えば、基準）値を提示することが、しばしば好ましい。

【 0 0 8 1 】

本明細書において使用された、抗体の「誘導体」とは、純正抗体又は親抗体と比較した場合、そのアミノ酸配列に対する、1つ以上の修飾を有する抗体を指す場合があり、修飾ドメイン構造を呈しうる。誘導体は、標的（抗原）に特異的に結合することが可能なアミノ酸配列を採用するだけでなく、天然抗体内で見出された、典型的なドメイン構成を採用することもさらに可能でありうる。抗体誘導体の典型的な例は、他のポリペプチドへとカップリングさせた抗体、再配列された抗体ドメイン又は抗体の断片である。誘導体はまた

、少なくとも1つのさらなる化合物、例えば、タンパク質ドメインも含むことが可能であり、前記タンパク質ドメインは、共有結合又は非共有結合により連結されている。連結は、当技術分野で公知の方法に従う遺伝子融合に基づきうる。抗体を含む融合タンパク質内に存在するさらなるドメインは、ペプチドリンカーであると有利な、可動性リンカーにより連結されることが好ましい場合があり、この場合、前記ペプチドリンカーは、さらなるタンパク質ドメインのC末端及び抗体のN末端又はこの逆の間の距離にわたるのに十分な長さである、複数の、親水性で、ペプチド結合されたアミノ酸を含む。抗体は、生物学的活性に適するコンフォメーションを有するか、又は、例えば、固体支持体、生物学的活性物質（例えば、サイトカイン又は成長ホルモン）、化学的薬剤、ペプチド、タンパク質若しくは薬物に選択的に結合する、エフェクター分子へと連結されうる。

10

【0082】

本明細書において「乱用薬物」とは、非医学的理由（例えば、気晴らし効果及び/又は気分を変える効果など）のために服用される、1つ以上の添加物質（薬物など）を指すように使用される。このような乱用薬物への、過剰な耽溺、これらの使用又はこれらへの依存は、「物質乱用」と称されることが多い。乱用薬物の例は、アルコール、バルビツレート、ベンゾジアゼピン、カナビス、コカイン、幻覚剤（ケタミン、メスカリン（ペヨーテ）、PCP、シロシピン、DMT及び/又はLSDなど）、メタカロン、オピオイド、アンフェタミン（メタンフェタミンを含む）、同化ステロイド、吸入剤（すなわち、例えば、ニトレート、スプレー塗料、洗浄液、マーカー、糊などのような、向精神特性を含有する揮発性物質を含有する物質）及びこれらの組合せを含む。

20

【0083】

本明細書において、「二重特異性抗体」とは、その2つの結合性アーム（HC/LCの対）の各々において、2つの異なる抗原（又はエピトープ）に結合しうる全長抗体（PCT公開第02/02773号を参照されたい）を指すように使用される。したがって、二重特異性結合タンパク質は、同一な特異性及び同一なCDR配列を伴う、2つの同一な抗原結合性アームを有し、それが結合する各抗原について二価である。

【0084】

本明細書において、「二重可変ドメイン」とは、二価結合性タンパク質（2つの抗原結合性部位）、四価結合性タンパク質（4つの抗原結合性部位）、又は多価結合性タンパク質でありうる結合性タンパク質上の、2つ以上の抗原結合性部位を指すように使用される。DVDは、単一特異性、すなわち、1つの抗原（又は1つの特異性エピトープ）に結合することが可能な場合もあり、多特異性、すなわち、2つ以上の抗原（すなわち、同じ標的抗原分子の2つ以上のエピトープ又は異なる標的抗原2つ以上のエピトープ）に結合することが可能な場合もある。好ましいDVD結合性タンパク質は、2つの重鎖DVDポリペプチド及び2つの軽鎖DVDポリペプチドを含み、「DVD免疫グロブリン」又は「DVD-Ig」と称される。したがって、このようなDVD-Ig結合性タンパク質は、四量体であり、IgG分子と類似するが、IgG分子より多くの抗原結合性部位をもたらす。したがって、四量体DVD-Ig分子の各半分は、IgG分子の半分と類似し、重鎖DVDポリペプチド及び軽鎖DVDポリペプチドを含むが、単一の抗原結合性ドメインをもたらす、IgG分子の重鎖及び軽鎖の対と異なり、DVD-Igの重鎖及び軽鎖の対は、2つ以上の抗原結合性部位をもたらす。

30

40

【0085】

DVD-Ig結合性タンパク質の各抗原結合性部位は、ドナー（「親」）モノクローナル抗体に由来しうるので、抗原結合性部位1つ当たり、合計6つのCDRであって、抗原への結合に関与するCDRを伴う、重鎖可変ドメイン（VH）及び軽鎖可変ドメイン（VL）を含みうる。したがって、2つの異なるエピトープ（すなわち、2つの異なる抗原分子の、2つの異なるエピトープ又は同じ抗原分子の、2つの異なるエピトープ）に結合するDVD-Ig結合性タンパク質は、第1の親モノクローナル抗体に由来する抗原結合性部位及び第2の親モノクローナル抗体の抗原結合性部位を含む。

【0086】

50

D V D - I g 結合性分子のデザイン、発現及び特徴付けについての記載は、P C T 公開第 2 0 0 7 / 0 2 4 7 1 5 号、米国特許第 7 , 6 1 2 , 1 8 1 号及び W u ら、N a t u r e B i o t e c h . , 2 5 : 1 2 9 0 ~ 1 2 9 7 (2 0 0 7) においてなされている。このような D V D - I g 分子の好ましい例は、構造式：V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n [式中、V D 1 は、第 1 の重鎖可変ドメインであり、V D 2 は、第 2 の重鎖可変ドメインであり、C は、重鎖定常ドメインであり、X 1 は、それが C H 1 ではないことを条件として、リンカーであり、X 2 は、F c 領域であり、n は、0 又は 1 であるが、好ましくは 1 である] を含む重鎖；及び構造式：V D 1 - (X 1) n - V D 2 - C - (X 2) n [式中、V D 1 は、第 1 の軽鎖可変ドメインであり、V D 2 は、第 2 の軽鎖可変ドメインであり、C は、軽鎖定常ドメインであり、X 1 は、これが C H 1 ではないことを条件として、リンカーであり、X 2 は、F c 領域を含まず、n は、0 又は 1 であるが、好ましくは 1 である] を含む軽鎖を含む。このような D V D - I g は、2 つのこのような重鎖及び 2 つのこのような軽鎖を含むことが可能であり、この場合、各鎖は、可変領域の間に介在する定常領域を伴わずに、タンデムにより連結された可変ドメインを含み、重鎖及び軽鎖は、会合して、タンデムの機能的抗原結合性部位を形成し、重鎖及び軽鎖の対は、重鎖及び軽鎖の別の対と会合して、4 つの機能的な抗原結合性部位を伴う、四量体の結合性タンパク質を形成しうる。別の例において、D V D - I g 分子は、各々が可変ドメインの間に介在する定常領域を伴わずに、タンデムに連結された、3 つの可変ドメイン (V D 1 、 V D 2 、 V D 3) を含む重鎖及び軽鎖を含むことが可能であり、この場合、重鎖及び軽鎖の対は、会合して、3 つの抗原結合性部位を形成することが可能であり、重鎖及び軽鎖の対は、重鎖及び軽鎖の別の対と会合して、6 つの抗原結合性部位を伴う、四量体の結合性タンパク質を形成しうる。

10

20

【 0 0 8 7 】

好ましい実施形態において、D V D - I g 結合性タンパク質は、その親モノクローナル抗体が結合する同じ標的分子に結合するだけでなく、また、その親モノクローナル抗体のうちの 1 つ以上の、1 つ以上の所望の特性も保有する。好ましくは、このようなさらなる特性は、親モノクローナル抗体のうちの 1 つ以上の抗体パラメータである。その親モノクローナル抗体のうちの 1 つ以上に由来する D V D - I g 結合性タンパク質に寄与されうる抗体パラメータは、抗原特異性、抗原アフィニティー、効力、生物学的機能、エピトープの認識、タンパク質の安定性、タンパク質の可溶性、作製効率、免疫原性、薬物動態、バイオアベイラビリティ、組織との交差反応性、及びオーソログ抗原への結合を含むがこれらに限定されない。

30

【 0 0 8 8 】

D V D - I g 結合性タンパク質は、U C H - L 1 の、少なくとも 1 つのエピトープに結合する。D V D - I g 結合性タンパク質の非限定例は、U C H - L 1 の、1 つ以上のエピトープに結合する D V D - I g 結合性タンパク質、ヒト U C H - L 1 のエピトープ及び別の種 (例えば、マウス) の U C H - L 1 のエピトープに結合する D V D - I g 結合性タンパク質及びヒト U C H - L 1 のエピトープ及び別の標的分子のエピトープに結合する D V D - I g 結合性タンパク質を含む。

【 0 0 8 9 】

本明細書において使用された「ダイナミックレンジ」とは、アッセイのリードアウトが、解析される試料中の標的分子又は解析物の量と比例する範囲を指す。

40

【 0 0 9 0 】

「エピトープ (e p i t o p e) 」又は「エピトープ (e p i t o p e s) 」又は「目的のエピトープ」とは、認識され、その特異的結合パートナー上の相補的な部位に結合しうる、任意の分子上の部位を指す。分子及び特異的結合パートナーは、特異的結合対の一部である。例えば、エピトープは、ポリペプチド、タンパク質、ハプテン、炭水化物抗原 (糖脂質、糖タンパク質又はリポ多糖のようであるがこれらに限定されない) 又は多糖の上にある。その特異的結合パートナーは、抗体でありうるがこれに限定されない。

【 0 0 9 1 】

50

本明細書において使用された「F a b (f r a g m e n t a n t i g e n - b i n d i n g) 断片」又は「F a b 断片」とは、抗原に結合し、1つの抗原結合性部位である、1つの完全な軽鎖及び1つの重鎖の一部を含有する抗体の断片を指す。F a b は、V L ドメイン、V H ドメイン、C L ドメイン及びC H 1 ドメインからなる一価断片である。F a b は、各重鎖及び各軽鎖の、1つの定常ドメイン及び1つの可変ドメインから構成される。可変ドメインは、単量体のアミノ末端において、相補性決定領域のセットを含む、パラトープ（抗原結合性部位）を含有する。したがって、Y字の各アームは、抗原上のエピトープに結合する。F a b 断片は、例えば、免疫グロブリン単量体を、2つのF a b 断片及びF c 断片へと切断するのに使用されうる、酵素であるパパインを使用して、当技術分野において記載されている通りに作出されうる、又は組換え手段により作製されうる。

10

【0092】

本明細書において使用された「F (a b ')₂断片」とは、ヒンジ領域の一部を無傷のままとしながら、F c 領域の大半を除去する、全I g G 抗体のペプシン消化により作出された抗体を指す。F (a b ')₂断片は、ジスルフィド結合により、一体に連結された、2つの抗原結合性F (a b) 部分を有するので、分子量を約110kDaとする、二価断片である。二価抗体断片（F (a b ')₂断片）は、全I g G 分子より小型であり、組織への良好な浸透を可能とするので、免疫組織化学における、良好な抗原認識を容易とする。F (a b ')₂断片の使用はまた、生細胞上のF c 受容体又はプロテインA / G への非特異的結合も回避する。F (a b ')₂断片は、抗原に結合し、かつ、これを沈殿させうる。

【0093】

20

本明細書において使用された「フレームワーク」（F R ）又は「フレームワーク配列」とは、C D R を除いた、可変領域の残りの配列を意味しうる。C D R 配列の正確な定義は、異なるシステム（例えば、上記を参照されたい）により決定されうるため、フレームワーク配列の意味は、これに応じて異なる解釈を受ける。6つのC D R （軽鎖のC D R - L 1、C D R - L 2 及びC D R - L 3 並びに重鎖のC D R - H 1、C D R - H 2 及びC D R - H 3 ）はまた、軽鎖上及び重鎖上のフレームワーク領域を、各鎖上の4つの部分領域（F R 1、F R 2、F R 3 及びF R 4 ）へも分割するが、ここで、C D R 1 は、F R 1 及びF R 2 の間に位置し、C D R 2 は、F R 2 及びF R 3 の間に位置し、C D R 3 は、F R 3 及びF R 4 の間に位置する。他の研究者により言及される通りに、特定の部分領域を、F R 1、F R 2、F R 3 又はF R 4 と指定しない場合、フレームワーク領域は、単一の、天然の免疫グロブリン鎖の可変領域内の、F R の組合せを表す。本明細書において使用されたF R は、4つの部分領域のうちの1つを表し、F R は、フレームワーク領域を構成する、4つの部分領域のうちの2つ以上を表す。

30

【0094】

当技術分野において公知の技法を使用して、非ヒト抗体をヒト化するのに、重鎖及び軽鎖の「アクセプター」フレームワーク配列（又は、単に、「アクセプター」配列）として使用されうる、ヒト重鎖及びヒト軽鎖のF R 配列は、当技術分野において公知である。一実施形態において、ヒト重鎖及びヒト軽鎖のアクセプター配列は、V - b a s e (h y p e r t e x t t r a n s f e r p r o t o c o l : / / v b a s e . m r c - c p e . c a m . a c . u k /) 又は国際的なI m M u n o G e n e T i c s （登録商標）（I M G T （登録商標））情報システム（h y p e r t e x t t r a n s f e r p r o t o c o l : / / i m g t . c i n e s . f r / t e x t s / I M G T r e p e r t o i r e / L o c u s G e n e s / ）のような、一般に公開されているデータベースにおいて列挙されたフレームワーク配列から選択される。

40

【0095】

本明細書において使用された「機能的な抗原結合性部位」とは、標的抗原に結合することが可能な、結合性タンパク質（例えば、抗体）上の部位を意味しうる。抗原結合性部位の抗原結合アフィニティーは、抗原結合性部位が由来する、親の結合性タンパク質、例えば、親抗体ほど強くない場合があるが、抗原に結合する能力は、抗原に結合するタンパク質、例えば、抗体を査定するための、公知の様々な方法のうちのいずれか1つを使用して

50

測定可能でなければならない。さらに、多価タンパク質、例えば、本明細書の多価抗体の抗原結合性部位の各々の抗原結合アフィニティーは、定量的に同じである必要はない。

【0096】

本明細書において、「GFAP」は、グリア原線維性酸性タンパク質について記載するために使用されている。GFAPとは、ヒトにおいて、GFAP遺伝子によりコードされ、作製されうる（例えば、組換え手段により、他の種において）タンパク質である。

【0097】

「GFAP状態」とは、ある時点（GFAPの単一の測定値を伴う時点など）における、GFAPのレベル若しくは量、モニタリング（対象において、GFAP量の上昇又は低下を同定する反復検査を伴うモニタリングなど）と関連する、GFAPのレベル若しくは量、外傷性脳損傷（一次脳損傷であれ、かつ／又は二次脳損傷であれ）のための処置と関連する、GFAPのレベル若しくは量又はこれらの組合せを意味する。

【0098】

本明細書において使用された「GCS（Glasgow Coma Scale）」又は「GCS」とは、全般的な社会的能力又は他者への依存に基づき、脳損傷の転帰を推定及び類別するための、15点のスケールを指す。検査は、運動応答、言語応答及び開眼応答を、これらの値：I．運動応答（6：指示に完全に従う；5：侵害刺激を位置特定する；4：侵害刺激から身を引く；3：異常屈曲、すなわち、除皮質姿勢；2：伸長応答、すなわち、除脳姿勢及び1：応答なし）；II．言語応答（5：意識清明で見当識がある；4：混乱しているが、一貫した発話；3：不適切な単語及び単語からなる支離滅裂な文章；2：理解不可能な音声及び1：音声なし）及びIII．開眼（4：自発的開眼；3：発話に応じた開眼；2：疼痛に応じた開眼及び1：開眼なし）により測定する。最終的なスコアは、I + II + IIIの値を足し合わせるにより決定される。最終的なスコアは、生存についての4つの可能なレベルへと類別される場合があり、数が小さいほど、より重度損傷及び予後不良を指し示す：軽度（13～15）；中等度身体障害（9～12）（30分間を超える意識の喪失；消失する場合もあり、消失しない場合もある、身体機能障害又は認知機能障害；リハビリから利益を得る）；重度身体障害（3～8）（昏迷：意識不明状態：有意味な応答なし、自発的な活動なし）；及び植物状態（3未満）（睡眠覚醒周期；目覚めるが、環境との相互作用なし；疼痛に対する、位置特定されない応答）。中等度脳損傷とは、20分間～6時間の意識喪失及び9～12のGCS（Glasgow Coma Scale）を結果としてもたらす脳損傷と規定される。重度脳損傷とは、6時間を超える意識喪失及び3～8のGCS（Glasgow Coma Scale）を結果としてもたらす脳損傷と規定される。

【0099】

本明細書において使用された「GOS（Glasgow Outcome Scale）」とは、機能的転帰についてのグローバルスケールであって、患者の状態を、5つの類型：死、植物状態、重度身体障害、中等度身体障害又は回復良好のうちの1つへと評価するグローバルスケールを指す。

【0100】

本明細書において互換的に使用された「GOSE（Extended Glasgow Outcome Scale）」又は「GOSE」は、重度身体障害、中等度身体障害及び回復良好の類型を、表1において示される、上下の類型へと細分することによる、8つの類型への、より詳細な類別を提示する。

【0101】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

1	死	D	
2	植物状態	VX	
3	重度身体障害の下	SD -	反射応答だけを伴うが、自発的開眼の期間も伴う意識不明状態
4	重度身体障害の上	SD +	
5	中等度身体障害の下	MD -	通例、両方の組合せである、精神障害又は身体障害に対する毎日の支援に依存する患者。患者が、自宅で、8時間を超えて、一人に放置されうる場合、SDの上レベルであり、そうでない場合、SDの下レベルである。
6	中等度身体障害の上	MD +	
7	回復良好の下	GR -	患者は、失語症、片麻痺若しくはてんかん及び/又は記憶若しくは人格の欠損のような、一部の身体障害を有するが、身の回りを整えることが可能である。患者は、自宅では自立するが、外では依存的である。患者が、特別の配慮を伴ってであっても、仕事に戻ることが可能な場合、MDの上レベルであり、そうでない場合、MDの下レベルである。
8	回復良好の上	GR +	

10

20

【0102】

本明細書において、「ヒト化抗体」は、非ヒト種（例えば、マウス）に由来する重鎖可変領域配列及び軽鎖可変領域配列を含むが、VH配列及び/又はVL配列の少なくとも一部が、より「ヒト様」となる、すなわち、ヒト生殖細胞系列可変配列と、より類似するように変更された抗体について記載するのに使用される。「ヒト化抗体」とは、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク（FR）領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域（CDR）を含む、抗体又はこの変異体、誘導体、類似体若しくは断片である。本明細書において使用された、CDRの文脈における「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一なアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、少なくとも1つであるが、典型的に2つの可変ドメイン（Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv）であって、CDR領域の全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリン（すなわち、ドナー抗体）のCDR領域に対応し、フレームワーク領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である可変ドメインの実質的に全てを含む。ある実施形態において、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的に、ヒト免疫グロブリンのFc領域の少なくとも一部も含む。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖のほか、重鎖の、少なくとも可変ドメインを含有する。抗体はまた、重鎖の、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域及びCH4領域も含みうる。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖だけを含有する。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖だけを含有する。具体的な実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖及び/又はヒト化重鎖のヒト化可変ドメインだけを含有する。

30

40

【0103】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含む、免疫グロブリンの任意のクラス並びに、限定なしに述べると、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む、任意のアイソタイプから選択されうる。ヒト化抗体は、1つを超えるクラス

50

又はアイソタイプに由来する配列を含むことが可能であり、特定の定常ドメインは、当技術分野において周知の技法を使用して、所望のエフェクター機能を最適化するように選択されうる。

【0104】

ヒト化抗体のフレームワーク領域及びCDRは、親配列に正確に対応する必要がない、例えば、ドナー抗体CDR又はコンセンサスフレームワークは、この部位におけるCDR残基又はフレームワーク残基が、ドナー抗体又はコンセンサスフレームワークに対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失により突然変異誘発されてもよい。しかし、好ましい実施形態において、このような突然変異は、広範にわたる突然変異ではない。通例、ヒト化抗体残基のうちの、少なくとも80%、好ましくは、少なくとも85%、より好ましくは、少なくとも90%であり、最も好ましくは、少なくとも95%は、親のFR配列及びCDR配列の残基に対応する。本明細書において使用された「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサスの免疫グロブリン配列内のフレームワーク領域を指す。本明細書において使用された「コンセンサスの免疫グロブリン配列」という用語は、類縁の免疫グロブリン配列のファミリーにおいて、最も高頻度で発生するアミノ酸（又はヌクレオチド）から形成された配列（例えば、Winna ker、「From Genes to Clones」(Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987)を参照されたい)を指す。したがって、「コンセンサスの免疫グロブリン配列」は、「コンセンサスフレームワーク領域」及び/又は「コンセンサスCDR」を含みうる。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列内の各位置は、ファミリー内のこの位置において、最も高頻度で発生するアミノ酸により占有されている。2つのアミノ酸が、同等に高頻度で発生する場合、いずれもが、コンセンサス配列内に含まれうる。

【0105】

本明細書の、2つ以上のポリペプチド配列又はポリヌクレオチド配列の文脈において使用された「同一な」又は「同一性」とは、配列が、指定された領域にわたり同じである、指定された百分率の残基を有することを意味しうる。百分率は、2つの配列を、最適にアライメントし、2つの配列を、指定された領域にわたり比較し、両方の配列内において、同一な残基が生じる位置の数を決定して、マッチした位置の数を求め、マッチした位置の数を、指定された領域内の位置の総数により除し、結果を、100により乗じて、配列同一性の百分率を求めることにより計算されうる。2つの配列の長さが異なる、又はアライメントが1つ以上の粘着末端をもたらし、指定された比較領域が、単一の配列だけを含む場合、単一の配列の残基は、計算の分母に組み入れられるが、分子に組み入れられない。

【0106】

本明細書において使用された「イメージング手順」とは、健康状態を診断、処置及びモニタリングするために、体内が見られるようにする医学的検査を指す。イメージング手順は、侵害性とならずに、疾患及び損傷の診断を可能とする、非侵襲性手順でありうる。イメージング手順の例は、MRI、CTスキャン、X線、ポジトロン放射断層撮影(PET)スキャン、単一光子放射コンピュータ断層撮影(SPECT)及び拡散テンソルイメージング(DTI)スキャンを含む。

【0107】

本明細書において互換的に使用された「頭部への損傷」又は「頭部損傷」とは、頭皮、頭蓋骨又は脳への、任意の外傷を指す。このような損傷は、頭蓋骨上の軽症の瘤だけを含みうる、又は重篤な脳損傷でありうる。このような損傷は、脳への一次損傷及び/又は脳への二次損傷を含む。一次脳損傷は、初期傷害時に生じ、脳の物理的構造のずれの結果としてもたらされる。より具体的に、一次脳損傷は、外傷性事象時に生じる、実質(組織、血管)への物理的ダメージであり、周囲の脳組織のせん断及び圧迫を結果としてもたらす。二次脳損傷は、一次損傷に後続して生じ、一連の細胞過程を伴いうる。より具体的に、二次脳損傷は、一次脳損傷の後、ある期間(数時間~数日間)にわたり発展する変化を指す。二次脳損傷は、脳内の、細胞、化学物質、組織又は血管の変化の全体のカスケードで

10

20

30

40

50

あって、脳組織のさらなる破壊に寄与するカスケードを含む。

【0108】

頭部への損傷は、閉鎖性又は開放性（穿通性）でありうる。閉鎖性頭部損傷とは、頭皮、頭蓋骨又は脳への外傷であって、ぶつかる物体による頭蓋骨への貫通が見られない外傷を指す。開放性頭部損傷は、頭皮、頭蓋骨又は脳への外傷であって、ぶつかる物体による頭蓋骨への貫通が見られる外傷を指す。頭部への損傷は、人の物理的振盪、外部の機械による鈍的打撃又は閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷を結果としてもたらす他の力（例えば、自動車、航空機、列車などによる車両事故のような車両事故；野球のバットによる痛撃又は火器からの痛撃のような頭部への痛撃）、脳血管発作（例えば、脳卒中）、1回以上の転倒（例えば、スポーツ又は他の活動における）、爆発若しくは爆破（まとめて、「爆破損傷」）及び他の種類の鈍的外傷に引き起こされうる。代替的に、頭部への損傷は、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せの摂取及び／又はこれらへの曝露により引き起こされうる。このような化学物質及び／又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス（一酸化炭素、硫化水素及びシアン化物など）、有機金属（メチル水銀、テトラエチル鉛及び有機スズなど）及び／又は1つ以上の乱用薬物を含む。代替的に、頭部への損傷は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、1つ以上のウイルス、髄膜炎、水頭症、低酸素症又はこれらの組合せを対象が患うことの結果として引き起こされうる。場合によって、任意のこのような事象又は損傷が生じた、又は起こったのかどうかを確認することは不可能である。例えば、患者又は対象において、病歴が見られない場合があり、対象は、発話が不可能な場合があり、対象は、どのような事象に曝露されたのか気づいている場合があるなどである。本明細書においてこのような状況は、対象「は、頭部への損傷を負った可能性がある」と記載される。本明細書の、ある特定の実施形態において、閉鎖性頭部損傷は、脳卒中などの脳血管発作を含まず、明確にこれを除外する。

【0109】

本明細書において使用された「頭蓋内病変」とは、脳内の損傷領域を指す。頭蓋内病変は、MRIスキャン又はCTスキャンなどの、イメージング手順又は脳イメージング検査において見られる異常でありうる。CTスキャン又はMRIスキャンにおいて、脳病変は、正常な脳組織のように見えない、暗色又は明色の斑点として現れうる。

【0110】

本明細書において使用された「単離ポリヌクレオチド」とは、その単離ポリヌクレオチドが、その由来において、「単離ポリヌクレオチド」が天然において共に見出されるポリヌクレオチドの全部若しくは一部に付随していない；それが天然においては連結されてないポリヌクレオチドと作動可能に連結されている；又は天然においてより大きな配列の一部として存在してはいないようなポリヌクレオチド（例えば、ゲノム、cDNA若しくは合成由来又はこれらの一部の組合せによる）を意味しうる。

【0111】

本明細書において使用された「標識」及び「検出可能な標識」とは、抗体と解析物との反応を検出可能とするように、抗体又は解析物へと接合された部分を指し、このように標識された抗体又は解析物は、「検出可能に標識された」と称される。標識は、視覚手段又は計測手段により検出可能なシグナルをもたらしうる。多様な標識は、色原体、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性化合物などのようなシグナル発生物質を含む。標識の代表例は、光をもたらす部分、例えば、アクリジニウム化合物及び蛍光をもたらす部分、例えば、フルオレセインを含む。他の標識も、本明細書において記載されている。この点で、部分自体は、検出可能でない場合もあるが、さらに別の部分と反応すると、検出可能となりうる。「検出可能に標識された」という用語は、このような標識を包含することが意図される。

【0112】

当技術分野において公知である、任意の適切な、検出可能な標識が使用されうる。例えば、検出可能な標識は、放射性標識（ ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、

10

20

30

40

50

99Tc、111In、125I、131I、177Lu、166Ho及び153Smなど)、酵素標識(西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリペルオキシダーゼ、グルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなど)、化学発光標識(アクリジニウムエステル、チオエステル又はスルホンアミド;ルミノール、イソルミノール、フェナントリジニウムエステルなど)、蛍光標識(フルオレセイン(例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセインなど)など)、ローダミン、フィコビリタンパク質、R-フィコエリトリン、量子ドット(例えば、硫化亜鉛によりキャッピングされたセレン化カドミウム)、測熱標識又はイムノポリメラーゼ連鎖反応標識でありうる。標識、標識手順及び標識の検出への導入は、Molecular Probes, Inc.、Eugene、Oregonにより公刊された、ハンドブックとカタログとの組合せである、Polak及びVan Noorden、「Introduction to Immunocytochemistry」、2版、Springer Verlag、N.Y.(1997)並びにHaugland、「Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals」(1996)において見出される。蛍光標識は、FPIA(例えば、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれた、米国特許第5,593,896号、同第5,573,904号、同第5,496,925号、同第5,359,093号及び同第5,352,803号を参照されたい)において使用されうる。アクリジニウム化合物は、同種化学発光アッセイにおける検出可能な標識(例えば、Adamczykら、Bioorg.Med.Chem.Lett.、16:1324~1328(2006);Adamczykら、Bioorg.Med.Chem.Lett.、4:2313~2317(2004);Adamczykら、Bioorg.Med.Chem.Lett.、14:3917~3921(2004)及びAdamczykら、Org.Lett.、5:3779~3782(2003)を参照されたい)として使用されうる。

【0113】

一態様において、アクリジニウム化合物は、アクリジニウム-9-カルボキサミドである。アクリジニウム9-カルボキサミドを調製するための方法については、Mattingly、J.Biolumin.Chemilumin.、6:107~114(1991);Adamczykら、J.Org.Chem.、63:5636~5639(1998);Adamczykら、Tetrahedron、55:10899~10914(1999);Adamczykら、Org.Lett.、1:779~781(1999);Adamczykら、Bioconjugate Chem.、11:714~724(2000);Mattinglyら、「Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications」、Dyke、K.V.編、CRC Press:Boca Raton、77~105(2002);Adamczykら、Org.Lett.、5:3779~3782(2003);並びに米国特許第5,468,646号、同第5,543,524号及び同第5,783,699号(それらの各々が、参照によりその全体において、これについてのその教示について、本明細書に組み込まれる)において記載されている。

【0114】

アクリジニウム化合物の別の例は、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルである。式IIのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルの例は、10-メチル-9-(フェノキシカルボニル)アクリジニウムフルオロスルホネート(Cayman Chemical、Ann Arbor、MIから市販されている)である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリールエステルを調製するための方法については、McCapraら、Photochem.Photobiol.、4:1111~21(1965);Razaviら、Luminescence、15:245~249(2000);Razaviら、Luminescence、15:239~244(2

10

20

30

40

50

000) 及び米国特許第5,241,070号(それらの各々が、参照によりその全体において、これについてのその教示について、本明細書に組み込まれる)において記載されている。このようなアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、シグナルの強度及び/又はシグナルの迅速性の点において、少なくとも1つのオキシダーゼによる、解析物の酸化において生成された過酸化水素についての、有効な化学発光指示薬である。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルの化学発光過程は、迅速に、すなわち、1秒間未満において完了されるが、アクリジニウム-9-カルボキサミドの化学発光は、2秒間を超えて遷延する。しかし、アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、タンパク質の存在下において、その化学発光特性を失う。したがって、その使用は、シグナルの発生時及び検出時における、タンパク質の非存在を要求する。試料中のタンパク質を分離又は除去するための方法は、当業者に周知であり、限外濾過、抽出、沈殿、透析、クロマトグラフィー及び/又は消化(例えば、Wells, 「High Throughput Bioanalytical Sample Preparation, Methods and Automation Strategies」、Elsevier (2003)を参照されたい)を含むがこれらに限定されない。被験試料から除去又は分離されるタンパク質の量は、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%又は約95%でありうる。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステル及びその使用に関する、さらなる詳細については、2007年4月9日において出願された、米国特許出願第11/697,835号において明示されている。アクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステルは、脱気無水N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)又は含水コール酸ナトリウムのような、任意の適切な溶媒中に溶解されうる。

【0115】

「連結配列」又は「連結ペプチド配列」とは、1つ以上の、目的のポリペプチド配列(例えば、全長配列、配列断片など)へと接続された、天然又は人工のポリペプチド配列を指す。「接続された」という用語は、連結配列の、目的のポリペプチド配列への接合を指す。このようなポリペプチド配列は、1つ以上のペプチド結合により接合されることが好ましい。連結配列は、約4~約50アミノ酸の長さを有しうる。好ましくは、連結配列の長さは、約6~約30アミノ酸である。天然の連結配列は、人工の連結配列を創出するように、アミノ酸の置換、付加又は欠失により修飾されうる。連結配列は、組換えFab内の使用を含む、多くの目的で使用されうる。例示的な連結配列は、以下を含むがこれらに限定されない：(i)HHHHHH(配列番号3)のアミノ酸配列を有する、6×Hisタグのようなヒスチジン(His)タグは、目的のポリペプチド及び抗体の単離及び精製を容易とする連結配列として有用である；(ii)Hisタグなどのエンテロキナーゼ切断部位は、目的のタンパク質及び抗体の単離及び精製において使用される。エンテロキナーゼ切断部位は、Hisタグと併せて、目的のタンパク質及び抗体の単離及び精製において使用されることが多い。当技術分野において、多様なエンテロキナーゼ切断部位が公知である。エンテロキナーゼ切断部位の例は、DDDDK(配列番号4)のアミノ酸配列及びその誘導体(例えば、ADDDDK(配列番号5)など)を含むがこれらに限定されない；(iii)その他の配列も、単鎖可変領域断片の軽鎖可変領域及び/又は重鎖可変領域を連結又は接続するのに使用されうる。他の連結配列の例は、Birdら、Science、242:423~426(1988)；Houstonら、PNAS USA85:5879~5883(1988)及びMcCaffertyら、Nature、348:552~554(1990)において見出されうる。連結配列はまた、薬物の接合又は固体支持体への接合のような、さらなる機能のためにも修飾されうる。本開示の文脈において、モノクローナル抗体は、例えば、Hisタグ、エンテロキナーゼ切断部位又はこれらの両方のような連結配列を含有しうる。

【0116】

本明細書において互換的に使用された「磁気共鳴イメージング」又は「MRI」とは、健常及び疾患両方の体内における解剖学及び生理学的過程についての描像を形成するよう

10

20

30

40

50

に、放射線医学において使用される医学的イメージング法を指す（例えば、本明細書において互換的に、「MRI」、「MRI手順」又は「MRIスキャン」と称される）。MRIは、強力な磁界内に置かれた場合の、体内組織の原子核の、高周波数のラジオ波に対する応答を測定し、内臓についての画像を作成する、医学的イメージングの形態である。核磁気共鳴（NMR）学に基づくMRIスキャナーは、強力な磁界、ラジオ波及び磁界勾配を使用して、体内についての画像を作成する。

【0117】

本明細書において使用された「モノクローナル抗体」とは、実質的に同種である抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、集団を構成する個別の抗体は、少量で存在しうる、可能な天然の突然変異を除き、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原に対して方向付けられている。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して方向付けられた、異なる抗体を含むことが典型的な、ポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対して方向付けられている。本明細書におけるモノクローナル抗体は、とりわけ、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種に由来するか、又は特定の抗体クラス若しくは抗体サブクラスに属する抗体内の、対応する配列と同一又は相同である一方、鎖の残りの部分は、別の種に由来するか、又は別の抗体クラス若しくは抗体サブクラスに属する抗体内の、対応する配列と同一又は相同である「キメラ」抗体のほか、それらが、所望の生体を呈する限りにおいて、このような抗体の断片も含む。

【0118】

本明細書において、「多価結合性タンパク質」とは、2つ以上の抗原結合性部位（本明細書において、「抗原結合性ドメイン」ともまた称される）を含む結合性タンパク質を指すように使用される。多価結合性タンパク質は、3つ以上の抗原結合性部位を有するように操作されていることが好ましく、一般に、天然の抗体ではない。「多特異性結合性タンパク質」という用語は、2つ以上の、類縁又は非類縁の標的に結合しうる結合性タンパク質であって、同じ標的分子の、2つ以上の異なるエピトープへの結合が可能な結合性タンパク質を含む結合性タンパク質を指す。

【0119】

本明細書において互換的に使用された「陰性予測値」又は「NPV」とは、対象が、陰性の検査結果を有する場合に、陰性の転帰を有する確率を指す。

【0120】

本明細書において使用された「基準レベル」とは、診断的有効性、予後診断的有効性又は治療的有効性を評価するのに使用され、本明細書において、多様な臨床パラメータ（例えば、疾患の存在、疾患の病期、疾患の重症度、疾患の進行、非進行又は改善など）と関連づけられた、又は関連づけられた、アッセイカットオフ値を指す。本明細書において使用された「絶対量」とは、異なる時点において採取又はサンプリングされ、基準レベルと同様に、本明細書において、多様な臨床パラメータ（例えば、疾患の存在、疾患の病期、疾患の重症度、疾患の進行、非進行又は改善など）と関連づけられた、又は関連づけられた、少なくとも2つのアッセイ結果の間の変化又は差違の絶対値を指す。本明細書において使用された「絶対値」とは、その符号に関わらず、すなわち、それが正であるのか、負であるのかに関わらず、実数の大きさ（例えば、2つの比較されたレベル（第1の時点において採取されたレベル及び第2の時点において採取されたレベルなど）の間の差違のような大きさ）を指す。

【0121】

本開示は、例示的な基準レベル及び絶対量（例えば、異なる時点における基準レベルを比較することにより計算された）を提示する。しかし、基準レベル及び絶対量は、イムノアッセイの性質（例えば、利用された抗体、反応条件、試料の純度など）に応じて、変動する場合があります。アッセイは、比較及び標準化されうることが周知である。さらに、本明細書における本開示を、他のイムノアッセイに適合させて、本開示により提示された記載に基づき、これらの他のイムノアッセイについて、イムノアッセイ特異的な基準レベル及

10

20

30

40

50

び絶対量を得ることは、十分に、当業者の技術の範囲内にある。基準レベル及び絶対量の正確な値は、アッセイ間において変動しうるが、本明細書において記載された知見は、一般に、適用可能であり、他のアッセイへの外挿が可能であるものとする。

【0122】

「ポイントオブケアデバイス」とは、ポイントオブケア（すなわち、検査室の外部）又はこの近傍の、患者ケアの時間及び場所（病院、診療所、救急ケア施設又は他の医療ケア施設、患者の自宅、介護施設及び／又は長期ケア施設及び／又はホスピス施設など）において、医学的診断検査を提供するのに使用されるデバイスを指す。ポイントオブケアデバイスの例は、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)（例えば、i-STAT及びi-STAT Alinity、Universal Biosensors (Rowville, Australia)）(US2006/0134713を参照されたい)、Axis-Shield PoC AS (Oslo, Norway) 及び Clinical Lab Products (Los Angeles, USA) により作製されたポイントオブケアデバイスを含む。

10

【0123】

本明細書において互換的に使用された「陽性予測値」又は「PPV」とは、対象が、陽性の検査結果を有する場合に、陽性の転帰を有する確率を指す。

【0124】

本明細書において記載されたイムノアッセイ及びキットの文脈における「品質管理試薬」は、較正物質、対照及び感度パネルを含むがこれらに限定されない。「較正物質」又は「標準物質」（例えば、複数の、1つ以上の）は、抗体又は解析物などの、解析物の濃度を内挿するための、較正曲線（検量線）を確立するために使用されることが典型的である。代替的に、基準レベル又は対照レベルの近傍（例えば、「低」レベル、「中」レベル、又は「高」レベル）にある、単一の較正物質も使用されうる。「感度パネル」を含むように、複数の較正物質（すなわち、1つを超える較正物質又は変動量の較正物質）が使用されうる。

20

【0125】

「ROC (receiver operating characteristic)」曲線又は「ROC」曲線とは、その識別閾値が変動するのに応じて、二項分類システムの作動を例示する、グラフによるプロットを指す。例えば、ROC曲線は、診断検査の、異なる可能なカットオフ点についての、偽陽性率に対する真陽性率のプロットでありうる。ROC曲線は、多様な閾値状況において、陽性中の真陽性の割合（TPR = 真陽性率）を、陰性中の偽陽性の割合（FPR = 偽陽性率）と対比してプロットすることにより創出される。TPRはまた、感度としても公知であり、FPRは、[1 - 特異度又は真陰性率]である。ROC曲線は、感度と特異度とのトレードオフ（任意の感度の上昇は、特異度の低下により伴われる）；曲線が、ROC空間の左側境界に近接し、次いで、上側境界に近接するほど、検査は、より正確となること；曲線が、ROC空間の45度の対角線に近接するほど、検査は、より正確でなくなること；カットオフ点における接線の傾きが、検査のこの値についての尤度比（LR）を与えること及び曲線下面積が、検定の精度の尺度であることを裏付ける。

30

40

【0126】

「組換え抗体 (recombinant antibody)」及び「組換え抗体 (recombinant antibodies)」とは、組換え法により、1つ以上のモノクローナル抗体の全部又は一部をコードする核酸配列を、適切な発現ベクターへとクローニングし、その後、抗体を、適切な宿主細胞において発現させるステップを含む、1つ以上のステップにより調製された抗体を指す。用語は、組換えにより作製されたモノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（完全ヒト化抗体又は部分的ヒト化抗体）、抗体断片から形成された多特異性構造又は多価構造、二官能性抗体、ヘテロコンジュゲートAb、DVD-Ig（登録商標）及び本明細書の(i)において記載された他の抗体（二重可変ドメイン免疫グロブリン及びそれらを作り出すための方法について、Wu, C.ら、N

50

ature Biotechnology、25:1290~1297(2007)において記載されている)を含むがこれらに限定されない。本明細書において使用された「二官能性抗体」という用語は、1つの抗原性部位に対する特異性を有する第1のアーム及び異なる抗原性部位に対する特異性を有する第2のアームを含む抗体を指す、すなわち、二官能性抗体は、二重特異性を有する。

【0127】

本明細書において使用された、対象(例えば、患者)についての「危険性の評価」、「危険性の分類」、「危険性の同定」又は「危険性の層別化」とは、対象に関する処置決定が、より情報を得た状態ベースにおいてなされうるように、疾患の発生又は疾患の進行を含む将来の事象の発生の危険性を予測するためのバイオマーカーを含む因子についての査定を指す。

10

【0128】

本明細書において使用された「試料」、「被験試料」、「検体」及び「患者試料」は、互換的に使用される場合があり、全血、組織、尿、血清、血漿、羊水、脳脊髄液、胎盤細胞又は胎盤組織、内皮細胞、白血球又は単球のような血液試料でありうる。一部の実施形態において、試料は、全血試料である。一部の実施形態において、試料は、血清試料である。さらに他の実施形態において、試料は、血漿試料である。試料は、患者から得られた通りに直接使用されうる、又は濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、干渉成分の不活化、試薬の添加など、本明細書において論じられている形において、又は当技術分野において公知である、別の形において、試料の特徴を変更するように前処置されうる。

20

【0129】

試料を得るのに、様々な細胞型、組織又は体液が用いられうる。このような細胞型、組織及び体液は、生検試料及び剖検試料のような組織切片、組織学的目的のために採取された凍結切片、血液(全血など)、血漿、血清、赤血球、血小板、間質液、脳脊髄液などを含みうる。細胞型及び組織はまた、リンパ液、脳脊髄液、により回収された体液も含みうる。組織又は細胞型は、細胞試料を、ヒト及び非ヒト動物から摘出することにより用意されうるが、また、あらかじめ単離された細胞(例えば、別の者により、別の時間において、かつ/又は別の目的のために単離された)を使用することによっても達せられうる。処置履歴又は転帰履歴を有する組織のようなアーカイブ組織もまた、使用されうる。タンパク質又はヌクレオチドの単離及び/又は精製は、必要でない場合もある。

30

【0130】

本明細書において使用された、アッセイの「感度」とは、その転帰が陽性である対象であって、陽性であると正しく同定された対象の比率(例えば、対象が検査されつつある疾患又は医学的状态を伴う対象を、正しく同定する比率)を指す。例えば、これは、TBIを有さない対象から区別して、対象を、TBIを有すると正しく同定すること、軽度TBIを有する対象から区別して、中等度、重度又は中等度~重度のTBIを有する対象を正しく同定すること、中等度、重度又は中等度~重度のTBIを有する対象から区別して、対象を、軽度TBIを有すると正しく同定すること、TBIを有さない対象から区別して、対象を、中等度、重度又は中等度~重度のTBIを有すると正しく同定すること、又はTBIを有さない対象から区別して、対象を、軽度TBIを有すると正しく同定すること、イメージング又は頭部CTスキャン若しくはMRIから利益を得る可能性が低い対象から区別して、対象を、イメージング又は頭部CTスキャン若しくはMRIから利益を得る可能性が高いと正しく同定することなどを含みうる。

40

【0131】

本明細書において使用された、アッセイの「特異度」とは、その転帰が陰性である対象であって、陰性であると正しく同定された対象の比率(例えば、対象が検査されつつある疾患又は医学的状态を有さない対象を、正しく同定する比率)を指す。例えば、これは、TBIを有さない対象から区別して、TBIを有する対象を正しく同定すること、軽度のTBIを有する対象から区別して、対象を、中等度、重度又は中等度~重度のTBIを有さない正しく同定すること、中等度、重度又は中等度~重度のTBIを有する対象から区

50

別して、対象を、軽度のＴＢＩを有しないと正しく同定すること、若しくは対象を、任意のＴＢＩを有しないと正しく同定すること、又はＴＢＩを有さない対象から区別して、対象を、軽度ＴＢＩを有すると、正しく同定することなどを含みうる。

【 0 1 3 2 】

「較正組成物のシリーズ」とは、公知の濃度のＵＣＨ－Ｌ１を含む複数の組成物であって、組成物の各々が、シリーズ内の他の組成物とＵＣＨ－Ｌ１の濃度が異なる組成物を指す。

【 0 1 3 3 】

本明細書において互換的に使用された、「固相」又は「固体支持体」とは、(1) 1つ以上の捕捉剤若しくは捕捉のための特異的結合パートナー又は(2) 1つ以上の検出剤若しくは検出のための特異的結合パートナーを接合させ、かつ/又は誘引し、固定化させる、任意の材料を指す。固相は、捕捉剤を誘引し、固定化させる、その内因性の能力について選択されうる。代替的に、固相は、(1) 捕捉剤若しくは捕捉のための特異的結合パートナー又は(2) 検出剤若しくは検出のための特異的結合パートナーを誘引し、固定化させる能力を有する、連結剤を付加されている。例えば、連結剤は、捕捉剤(例えば、捕捉のための特異的結合パートナー)又は検出剤(例えば、検出のための特異的結合パートナー)自体若しくは(1) 捕捉剤若しくは捕捉のための特異的結合パートナー又は(2) 検出剤若しくは検出のための特異的結合パートナーへとコンジュゲートされた帯電物質に対して、逆向きに帯電した帯電物質を含みうる。一般に、連結剤は、固相上に固定化され(固相へと接合され)、結合反応を介して、(1) 捕捉剤若しくは捕捉のための特異的結合パートナー又は(2) 検出剤若しくは検出のための特異的結合パートナーを固定化させる能力を有する、任意の結合パートナー(好ましくは特異的結合パートナー)でありうる。連結剤は、アッセイの実施前に、又はアッセイの実施時に、捕捉剤の、固相材料への間接的結合を可能とする。例えば、固相は、例えば、試験管、マイクロ滴定ウェル、シート、ビーズ、微粒子、チップ及び当業者に公知の他の構成を含む、プラスチック、誘導体化プラスチック、磁性金属又は非磁性金属、ガラス又はシリコンでありうる。

【 0 1 3 4 】

本明細書において使用された「特異的結合」又は「～に特異的に結合すること」とは、抗体、タンパク質、又はペプチドの、第2の化学的分子種との相互作用を指す場合があり、この場合、相互作用は、化学的分子種上の特定の構造(例えば、抗原性決定基又はエピトープ)の存在に依存する；例えば、抗体は、タンパク質一般ではなく、特異的なタンパク質構造を認識し、これに結合する。抗体が、エピトープ「A」に対して特異的である場合、エピトープAを含有する分子(又は遊離のA、非標識A)の、標識「A」及び抗体を含有する反応物中の存在は、抗体に結合した標識Aの量を低減する。

【 0 1 3 5 】

「特異的結合パートナー」とは、特異的結合対のメンバーである。特異的結合対は、化学物質又は物理的手段を介して、互いと特異的に結合する、2つの異なる分子を含む。したがって、一般的なイムノアッセイの、抗原と抗体との特異的結合対に加えて、他の特異的結合対は、ビオチン及びアビジン(又はストレプトアビジン)、炭水化物及びレクチン、相補的なヌクレオチド配列、エフェクター分子及び受容体分子、補因子及び酵素、酵素及び酵素阻害剤などを含みうる。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合メンバーの類似体、例えば、解析物類似体であるメンバーを含みうる。免疫反応性の特異的結合メンバーは、抗原、抗原断片並びにモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体のほか、単離されたものであれ、組換えにより作製されたものであれ、これらの複合体及び断片を含む抗体を含む。

【 0 1 3 6 】

本明細書において使用された「統計学的に有意な」とは、2つ以上の変数の間の関係が、ランダムな偶然以外の何かにより引き起こされる可能性を指す。統計学的仮説検定は、データセットの結果が、統計学的に有意であるのかどうかを決定するのに使用される。統計学的仮説検定において、統計学的有意な結果は、検定統計量について観察されたp値が

10

20

30

40

50

、研究について規定された有意性レベル未満である場合なら、いかなる場合にも達せられる。p 値とは、少なくとも帰無仮説が真である場合に観察される結果と、少なくとも同程度に極端な結果を得る確率である。統計学的仮説解析の例は、ウィルコクソンの符号順位検定、t 検定、カイ二乗検定又はフィッシャーの正確検定を含む。本明細書において使用された「著明な」とは、統計学的に有意であることが決定されていない変化（例えば、統計学的仮説検定にかけられていない可能性がある）を指す。

【0137】

本明細書において互換的に使用された、「対象」及び「患者」とは、哺乳動物（例えば、ウシ、ブタ、ラクダ、ラマ、ウマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、モルモット、ネコ、イヌ、ラット及びマウス、非ヒト霊長動物（例えば、カニクイザル又はアカゲザル、チンパンジーなどのようなサル）及びヒト）を含むがこれらに限定されない、任意の脊椎動物を指す。一部の実施形態において、対象は、ヒト又は非ヒトでありうる。一部の実施形態において、対象は、ヒトである。対象又は患者は、他の形態の処置を受けつつある場合がある。

【0138】

本明細書において、「～を処置する」、「～を処置すること」又は「処置」は各々、疾患及び/若しくは損傷又はこのような用語が適用される、このような疾患の、1つ以上の症状を阻止、緩和すること又はこれらの進行を阻害することについて記載するのに、互換的に使用される。対象の状態に依存して、用語はまた、疾患を予防することも指し、疾患の発生を予防すること又は疾患と関連する症状を予防することを含む。処置は、急性に、又は慢性的に実施されうる。用語はまた、疾患への罹患の前における、疾患又はこのような疾患と関連する症状の重症度を軽減することも指す。罹患の前における、疾患の重症度のこのような予防又は低減は、医薬組成物の、投与時において疾患に罹患していない対象への投与を指す。「～を予防すること」はまた、疾患又はこのような疾患と関連する、1つ以上の症状の再発を予防することも指す。「処置」及び「治療的に」とは、「～を処置すること」が、上記において規定された通りである場合の、処置する行為を指す。

【0139】

本明細書において互換的に使用された「外傷性脳損傷」又は「TBI」とは、広範囲にわたる症状及び身体障害を伴う複合損傷を指す。TBIは、他の損傷と同様の、急性事象であることが最も多い。TBIは、「軽度」、「中等度」、又は「重度」と分類されうる。TBIの原因は、多様であり、人力による物理的振盪、自動車事故、火器による損傷、脳血管発作（例えば、脳卒中）、転倒、爆発又は爆破及び他の種類の鈍的外傷を含む。TBIの他の原因は、1つ以上の化学物質又は毒素（火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤及び殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス（一酸化炭素、硫化水素及びシアン化物など）、有機金属（メチル水銀、テトラエチル鉛及び有機スズなど）、1つ以上の乱用薬物又はこれらの組合せ）の摂取及び/又はこれらへの曝露を含む。代替的に、TBIは、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、1つ以上のウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患うヒト対象において生じうる。若年成人及び高齢者は、TBIの危険性が最も高い年齢群である。本明細書の、ある特定の実施形態において、外傷性脳損傷又はTBIは、脳卒中のような脳血管発作を含まず、明確にこれを除外する。

【0140】

本明細書において使用された「軽度TBI」とは、意識喪失が短時間であり、通例数秒間若しくは数分間であり、かつ/又は意識混濁及び見当識の喪失が、1時間より短い脳損傷を指す。軽度TBIはまた、脳振盪、軽症の頭部外傷、軽症のTBI、軽症の脳損傷及び軽症の頭部損傷とも称される。MRI及びCTスキャンは、正常であることが多いが、軽度TBIを伴う個体は、頭痛、思考困難、記憶問題、注意欠陥、気分変動及び欲求不満のような認知問題を有しうる。

【0141】

軽度TBIは、最も高頻度のTBIであり、初期損傷時に、見逃されることが多い。典型的に、対象は、13～15（13～15又は14～15など）の間のGCS（Glas

10

20

30

40

50

gow Coma Scale) 数を有する。軽度 TBI を伴う人々のうち、15 パーセント (15%) は、3 カ月間以上にわたり持続する症状を有する。軽度 TBI は、頭部の強制的な運動又は精神状態の短い変化 (意識混濁、見当識の喪失又は記憶喪失) を引き起こす衝撃又は 30 分間未満にわたる意識喪失の結果として規定される。軽度 TBI の一般的な症状は、疲労感、頭痛、視覚障害、記憶喪失、注意 / 集中力の低下、睡眠障害、回転性めまい / 平衡感覚の喪失、易刺激性 (感情障害)、抑うつ感覚及び発作を含む。軽度 TBI と関連する他の症状は、悪心、嗅覚喪失、光及び音への過敏性、気分の変化、迷子若しくは意識混濁及び / 又は思考遅滞を含む。

【0142】

本明細書において使用された「中等度 TBI」とは、意識喪失及び / 又は意識混濁並びに見当識の喪失が、1 ~ 24 時間の間であり、対象が、9 ~ 13 (9 ~ 12 又は 9 ~ 13 など) の間の GCS (Glasgow Coma Scale) 数を有する脳損傷を指す。中等度 TBI を伴う個体は、脳イメージング結果の異常を有する。本明細書において使用された「重度 TBI」とは、意識喪失が、24 時間を超え、損傷又は穿通性頭蓋骨損傷後の記憶喪失が、24 時間より長く、対象が、3 ~ 8 の間の GCS (Glasgow Coma Scale) 数を有する脳損傷を指す。欠損は、高レベルの認知機能の機能障害 ~ 昏睡状態の範囲にわたる。生存者は、腕部又は脚部の機能の限定、発話又は言語の異常、思考能力の喪失又は感情問題を有しうる。重度損傷を伴う個体は、長期にわたる不応状態に置かれたままになりうる重度 TBI を伴う多くの人々の場合、機能及び自立を最大化するために、長期にわたるリハビリが必要となることが多い。

【0143】

本明細書において使用された、「中等度 ~ 重度」の TBI とは、中等度 ~ 重度を含む、脳損傷のスペクトルを指し、したがって、中等度 TBI 単独、重度 TBI 単独及び組み合わせられた中等度 ~ 重度の TBI を包含する。中等度 ~ 重度の TBI を患う対象は、3 ~ 13 の間 (3 ~ 12 の間又は 3 ~ 13 の間など) の GCS (Glasgow Coma Scale) 数を有しうる。例えば、臨床状況によって、対象は、初期に、中等度 TBI を有すると診断されうるが、時間の経過 (数分間、数時間又は数日間) を経て、重度 TBI を有する対象へと進行しうる (例えば、脳出血が存在する状況におけるように)。このような対象は、「中等度 ~ 重度」として分類されうる患者の例となる。中等度 ~ 重度の TBI の一般的な症状は、注意に関する困難、集中力、散漫性、記憶、処理速度、混乱、固執、衝動性、言語処理及び / 又は「実行機能」、発話された単語の無理解 (受容失語症)、発話及び理解されることの困難 (表現失語症)、発話の不明瞭、発話が極めて速い又は極めて遅い、読むときの問題、書くときの問題、接触、温度、運動の解釈、下肢の位置及び微細な識別、感覚的印象の、心理学的に有意なデータへの統合又はパターン化に関する困難、部分的又は全体的な視覚の喪失、眼筋力の低下及び二重視覚 (複視)、かすみ目、距離を判断するときの問題、非自発的な眼運動 (眼振)、光不耐性 (羞明)、聴覚問題、のような聴力の低下又は喪失、耳が鳴ること (耳鳴り)、音に対する過敏性、嗅覚の喪失又は低下 (無嗅覚)、味覚の喪失又は低下、てんかんと関連する痙攣であって、いくつかの種類であることが可能であり、意識、感覚的認知又は運動、腸及び膀胱の制御の破壊を伴いうる痙攣、睡眠障害、気力の喪失、食欲の変化、体内温度の調節、月経困難、依存性行動、感情能力、意欲の欠如、易刺激性、攻撃、抑うつ、脱抑制又は意識の否認 / 欠如を含む認知欠損を含む。

【0144】

本明細書において互換的に使用された「ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L1 (UCH-L1)」又は「UCH-L1」とは、ヒトにおいて、UCH-L1 遺伝子によりコードされた脱ユビキチン化酵素を指す。ユビキチンカルボキシル末端エステラーゼ L1 及びユビキチンチオールエステラーゼとしてもまた公知の UCH-L1 は、その産物が、ユビキチンの、小型の C 末端付加物を加水分解して、ユビキチン単量体を発生させる遺伝子ファミリーのメンバーである。

【0145】

10

20

30

40

50

「UCH-L1状態」とは、ある時点（UCH-L1の単一の測定値を伴う時点など）における、UCH-L1のレベル若しくは量、モニタリング（対象において、UCH-L1量の上昇又は低下を同定する反復検査を伴うモニタリングなど）と関連する、UCH-L1のレベル若しくは量、外傷性脳損傷（一次脳損傷であれ、かつ／又は二次脳損傷であれ）のための処置と関連する、UCH-L1のレベル若しくは量又はこれらの組合せを意味する。

【0146】

本明細書において、「変異体」は、アミノ酸の挿入、欠失又は保存的置換により、アミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物学的活性を保持するペプチド又はポリペプチドについて記載するのに使用される。「生物学的活性」の代表例は、特異的抗体による結合を受ける能力又は免疫反応を促進する能力を含む。本明細書において、変異体はまた、少なくとも1つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を伴う基準タンパク質と実質的に同一なアミノ酸配列を伴うタンパク質について記載するのに使用される。当技術分野において、アミノ酸の保存的置換、すなわち、アミノ酸を、類似の特性（例えば、親水性、帯電の程度及び帯電領域の分布）を有する、異なるアミノ酸により置き換えることは、典型的に、小さな変化を伴うこととして当技術分野において認識されている。当技術分野において理解された通り、これらの小さな変化は、部分的に、アミノ酸の疎水性指数を検討することにより同定されうる（Kyteら、J. Mol. Biol. 157: 105~132 (1982)）。アミノ酸の疎水性指数は、その疎水性及び電荷の検討に基づく。当技術分野において、同様の疎水性指数を有するアミノ酸は、置換される場合があるが、なお、タンパク質の機能を保持することが公知である。一態様において、 ± 2 の疎水性指数を有するアミノ酸は、置換される。アミノ酸の親水性もまた、生物学的機能を保持するタンパク質を結果としてもたらす置換を明らかにするのに使用されうる。ペプチドの文脈における、アミノ酸の親水性についての検討は、抗原性及び免疫原性とよく相関することが報告されている、有用な尺度である、このペプチドの局所平均親水性の最大値の計算を可能とする（参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第4,554,101号）。同様の親水性値を有するアミノ酸による置換は、生物学的活性、例えば、当技術分野において理解された免疫原性を保持するペプチドを結果としてもたらしうる。置換は、互いから ± 2 以内の親水性値を有するアミノ酸により実施されうる。アミノ酸の疎水性指数及び親水性値のいずれも、このアミノ酸の特定の側鎖の影響を受ける。生物学的機能と適合性であるアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ及び他の特性により明らかにされる通り、アミノ酸の相対的類似性に依存し、特に、これらのアミノ酸の側鎖に依存すると理解されることは、この観察と符合する。「変異体」はまた、抗原的に反応性の抗UCH-L1抗体の断片であって、アミノ酸配列内の、対応する抗UCH-L1抗体の断片と異なるが、なお抗原的に反応性であり、UCH-L1との結合について、対応する抗UCH-L1抗体の断片と競合しうる断片を指すようにも使用されうる。「変異体」はまた、タンパク質分解、リン酸化又は他の翻訳後修飾によるような、異なる形でプロセッシングされているが、その抗原反応性を保持する、ポリペプチド又はこの断片について記載するのに使用されうる。

【0147】

本明細書において、「ベクター」とは、連結された別の核酸を運びうる核酸分子について記載するのに使用される。ベクターの1つの種類は、さらなるDNAセグメントがライゲーションされうる、環状二本鎖DNAループを指す、「プラスミド」である。ベクターの別の種類は、さらなるDNAセグメントが、ウイルスゲノムへとライゲーションされうる、ウイルスベクターである。ある特定のベクターは、これらが導入される宿主細胞内の自己複製が可能である（例えば、細菌の複製起点及び哺乳動物エピソームベクターを有する細菌ベクター）。他のベクター（例えば、哺乳動物の非エピソームベクター）は、宿主細胞へと導入されると、宿主細胞のゲノムへと組み込まれ、これにより、宿主ゲノムと共に複製されうる。さらに、ある特定のベクターは、作動的に連結される遺伝子の発現を方向付けることが可能である。本明細書において、このようなベクターは、「組換え発現ベ

10

20

30

40

50

クター」(又は、単に、「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA法において有用な発現ベクターは、プラスミドの形態にあることが多い。プラスミドは、最も一般に、ベクターの形態で使用されるので、「プラスミド」と「ベクター」とは、互換的に使用されうる。しかし、ウイルスベクター(例えば、複製欠損性のレトロウイルス、アデノウイルス、及びアデノ随伴ウイルス)のような、同等な機能を果たす、発現ベクターの他の形態も使用されうる。この点で、ベクターのRNA形(ウイルス性RNAベクターを含む)もまた、本開示の文脈において使用されうる。

【0148】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書において使用される技術用語及び科学用語は、当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有するものとする。例えば、本明細書において記載された、細胞培養法及び組織培養法、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学並びにタンパク質化学及び核酸化学及びハイブリダイゼーションとの関連において使用された用語法、並びにこれらについての技法は、周知の用語法及び技法であり、当技術分野において一般的に使用されている用語法及び技法である。用語の意味及び範囲は、明確であるものとするが、万一、なんらかの潜在的な曖昧さが生じた場合、本明細書において提示された定義が、任意の辞書又は外部の定義に対して優先される。さらに、文脈により、そうでないことが要求されない限りにおいて、単数形の用語は、複数形を含み、複数形の用語は、単数形を含むものとする。

【0149】

2. 対象に由来する、1つの試料を使用する、頭部への損傷を負ったヒト対象に対して、イメージングを実施するのかどうかについての決定の一助となる方法

本開示は、他の方法の中でとりわけ、頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、MRIスキャン又はCTスキャンなどのイメージング手順を実施するのかどうかについて決定する一助となる方法に関する。本明細書において使用された「ヒト対象に対して、MRIスキャン又はCTスキャンなどのイメージング手順を実施するのかどうかについての決定」とは、対象のMRIが陽性となる、又は頭部CTスキャンが陽性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在する可能性が、そうでない場合より高いことを決定するのに、他の情報(例えば、臨床評価データ)と共に、前述の方法が使用されうるという事実を指す。具体的に、このような方法は、(a)推測される頭部への損傷後約24時間以内に対象から採取された試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1(UCH-L1)、グリア原線維性酸性タンパク質(GFAP)又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定又は検出するステップ;及び(b)早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対する、MRIスキャン又はCTスキャンなどのイメージング手順を実施し(イメージング手順の実施「を組み入れ」)、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しない(イメージング手順の実施「を除外する」)ステップを含みうる。試料は、生物学的試料でありうる。

【0150】

一部の実施形態において、本方法は、推測される対象への損傷から約24時間以内に試料を得、試料を、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1(UCH-L1)、グリア原線維性酸性タンパク質(GFAP)又はこれらの組合せのようなTBIの早期バイオマーカーに対する抗体と接触させて、抗体と早期バイオマーカーとの複合体の形成を可能とするステップを含みうる。本方法はまた、結果として得られる、抗体-早期バイオマーカー複合体を検出するステップも含む。

【0151】

一部の実施形態において、試料は、ヒト対象から、頭部への損傷又は推測される損傷から、約0~約6時間以内、約0~約8時間以内、約0~約10時間以内、約0~約12時間以内、約0~約18時間以内、約6時間~約12時間以内、約6時間~約18時間以内又は約12時間~約18時間以内のような、約24時間以内に採取される。例えば、試料

は、ヒト対象から、頭部への損傷又は推測される損傷から、約 0 分間、約 30 分間、約 60 分間、約 90 分間、約 120 分間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間又は約 24 時間以内に採取されうる。一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの存在の開始は、頭部への損傷後、約 0 分間、約 30 分間、約 60 分間、約 90 分間、約 120 分間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、7 時間、約 8 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、約 12 時間、約 13 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間又は約 24 時間以内に現れる。

10

【0152】

一部の実施形態において、対象は、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、MRI スキャン又は CT スキャンなどの、イメージング手順を受けている。一部の実施形態において、対象は、イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される。一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、陽性の MRI スキャン又は陽性の頭部 CT スキャン、すなわち、頭蓋内病変の存在と相関する。

【0153】

一般に、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、被験試料を、UCH-L1 についてアッセイしたときに得られた結果を評価するためのベンチマークとして利用されうる。一般に、このような比較を行う場合に、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、解析物の存在、量又は濃度の、TBI の特定の病期若しくはエンドポイント又は特定の徴候との連関又は関連を成立させうるような、十分な回数及び適切な条件下において、特定のアッセイを行うことにより得られる。典型的に、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、基準対象（又は対象の集団）についてのアッセイにより得られる。測定される UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーは、これらの断片、これらの分解産物及び/又は酵素によるこれらの切断産物を含むうる。

20

30

【0154】

一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP 又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、少なくとも約 70% ~ 約 100% の間の感度及び少なくとも約 30% ~ 約 100% の間の特異度を有するアッセイにより決定される。一部の実施形態において、感度は、少なくとも約 70% ~ 約 100% の間、少なくとも約 70% ~ 少なくとも約 99% の間、少なくとも約 70% ~ 少なくとも約 95% の間、少なくとも約 70% ~ 少なくとも約 90% の間、少なくとも約 70% ~ 少なくとも約 85% の間、少なくとも約 75% ~ 約 100% の間、少なくとも約 75% ~ 少なくとも約 99% の間、少なくとも約 75% ~ 少なくとも約 95% の間、少なくとも約 75% ~ 少なくとも約 90% の間、少なくとも約 75% ~ 少なくとも約 85% の間、少なくとも約 80% ~ 約 100% の間、少なくとも約 80% ~ 少なくとも約 99% の間、少なくとも約 80% ~ 少なくとも約 95% の間、少なくとも約 80% ~ 少なくとも約 90% の間、少なくとも約 80% ~ 少なくとも約 85% の間、少なくとも約 85% ~ 約 100% の間、少なくとも約 85% ~ 少なくとも約 99% の間、少なくとも約 85% ~ 少なくとも約 95% の間、少なくとも約 85% ~ 少なくとも約 90% の間、少なくとも約 90% ~ 約 100% の間、少なくとも約 90% ~ 少なくとも約 99% の間、少なくとも約 90% ~ 少なくとも約 95% の間、少なくとも約 95% ~ 約 100% の間又は少なくとも約 95% ~ 少なくとも約 99% の間である。一部の実施形態において、感度は、少なくとも約 70.0%、少なくとも約 75.0%、少なくとも約 80.0%、少なくとも約 85.0%、少なくとも約 87.5%、少なくとも約 90.0%、少なくとも約 95.0%、少なくとも約 99.0%、少なくとも約 99.1

40

50

％、少なくとも約 99.2％、少なくとも約 99.3％、少なくとも約 99.4％、少なくとも約 99.5％、少なくとも約 99.6％、少なくとも約 99.7％、少なくとも約 99.8％、少なくとも約 99.9％又は少なくとも約 100.0％である。

【0155】

一部の実施形態において、特異度は、少なくとも約 30％～約 100％の間、少なくとも約 30％～約 99％の間、少なくとも約 30％～約 95％の間、少なくとも約 30％～約 90％の間、少なくとも約 30％～約 85％の間、少なくとも約 30％～約 80％の間、少なくとも約 30％～約 75％の間、少なくとも約 30％～約 70％の間、少なくとも約 30％～約 60％の間、少なくとも約 30％～約 50％の間、少なくとも約 40％～約 100％の間、少なくとも約 40％～約 99％の間、少なくとも約 40％～約 95％の間、少なくとも約 40％～約 90％の間、少なくとも約 40％～約 85％の間、少なくとも約 40％～約 80％の間、少なくとも約 40％～約 75％の間、少なくとも約 40％～約 70％の間、少なくとも約 40％～約 60％の間、少なくとも約 40％～約 50％の間、少なくとも約 50％～約 100％の間、少なくとも約 50％～約 99％の間、少なくとも約 50％～約 95％の間、少なくとも約 50％～約 90％の間、少なくとも約 50％～約 85％の間、少なくとも約 50％～約 80％の間、少なくとも約 50％～約 75％の間、少なくとも約 50％～約 70％の間、少なくとも約 50％～約 60％の間、少なくとも約 60％～約 100％の間、少なくとも約 60％～約 99％の間、少なくとも約 60％～約 95％の間、少なくとも約 60％～約 90％の間、少なくとも約 60％～約 85％の間、少なくとも約 60％～約 80％の間、少なくとも約 60％～約 75％の間、少なくとも約 60％～約 70％の間、少なくとも約 70％～約 100％の間、少なくとも約 70％～約 99％の間、少なくとも約 70％～約 95％の間、少なくとも約 70％～約 90％の間、少なくとも約 70％～約 85％の間、少なくとも約 70％～約 80％の間、少なくとも約 70％～約 75％の間、少なくとも約 80％～約 100％の間、少なくとも約 80％～約 99％の間、少なくとも約 80％～約 95％の間、少なくとも約 80％～約 90％の間、少なくとも約 80％～約 85％の間、少なくとも約 90％～約 100％の間、少なくとも約 90％～約 99％の間、少なくとも約 90％～約 95％の間、少なくとも約 95％～約 99％の間又は少なくとも約 95％～約 100％の間である。一部の実施形態において、特異度は、少なくとも約 30.0％、少なくとも約 31.0％、少なくとも約 32.0％、少なくとも約 33.0％、少なくとも約 34.0％、少なくとも約 35.0％、少なくとも約 36.0％、少なくとも約 37.0％、少なくとも約 38.0％、少なくとも約 39.0％、少なくとも約 40.0％、少なくとも約 45.0％、少なくとも約 50.0％、少なくとも約 55.0％、少なくとも約 60.0％、少なくとも約 65.0％、少なくとも約 70.0％、少なくとも約 75.0％、少なくとも約 80.0％、少なくとも約 85.0％、少なくとも約 90.0％、少なくとも約 91.0％、少なくとも約 92.0％、少なくとも約 93.0％、少なくとも約 94.0％、少なくとも約 95.0％、少なくとも約 96.0％、少なくとも約 97.0％、少なくとも約 98.0％、少なくとも約 99.0％、少なくとも約 99.1％、少なくとも約 99.2％、少なくとも約 99.3％、少なくとも約 99.4％、少なくとも約 99.5％、少なくとも約 99.6％、少なくとも約 99.7％、少なくとも約 99.8％、少なくとも約 99.9％又は少なくとも約 100.0％である。例えば、感度は、少なくとも約 99％であり、特異度は、少なくとも約 75％である、感度は、少なくとも約 99％であり、特異度は、少なくとも約 99％である、又は感度は、少なくとも約 100％であり、特異度は、少なくとも約 100％である。

【0156】

一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、少なくとも約 10 pg/mL～約 500 pg/mLの間でありうる。一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、少なくとも約 10 pg/mL～約 500 pg/mLの間、少なくとも約 10 pg/mL～約 400 pg/mLの間、少なくとも約 10 pg/mL

10

20

30

40

50

/mL ~ 約300 pg/mLの間、少なくとも約10 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、
 少なくとも約10 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、少なくとも約10 pg/mL ~ 約50 pg/mLの間、
 少なくとも約10 pg/mL ~ 約30 pg/mLの間、少なくとも約20 pg/mL ~ 約50 pg/mLの間、
 少なくとも約20 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、少なくとも約20 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、
 少なくとも約20 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、少なくとも約20 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、
 少なくとも約20 pg/mL ~ 約50 pg/mLの間、少なくとも約20 pg/mL ~ 約40 pg/mLの間、
 少なくとも約20 pg/mL ~ 約30 pg/mLの間、少なくとも約30 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約30 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、少なくとも約30 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、
 少なくとも約30 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、少なくとも約30 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、
 少なくとも約30 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、少なくとも約30 pg/mL ~ 約50 pg/mLの間、
 少なくとも約30 pg/mL ~ 約40 pg/mLの間、少なくとも約30 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約40 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、少なくとも約40 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、
 少なくとも約40 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、少なくとも約40 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、
 少なくとも約40 pg/mL ~ 約50 pg/mLの間、少なくとも約50 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約50 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、少なくとも約50 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、
 少なくとも約50 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、少なくとも約75 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約75 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、少なくとも約75 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、
 少なくとも約75 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、少なくとも約75 pg/mL ~ 約100 pg/mLの間、
 少なくとも約100 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、少なくとも約100 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約100 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間、少なくとも約100 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、
 少なくとも約150 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、少なくとも約150 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、
 少なくとも約150 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間、少なくとも約200 pg/mL ~ 約500 pg/mLの間、
 少なくとも約200 pg/mL ~ 約400 pg/mLの間、又は少なくとも約200 pg/mL ~ 約300 pg/mLの間
 でありうる。例えば、UCH-L1についての基準レベルは、少なくとも約80 pg/mL ~ 約150 pg/mLの間であることが可能であり、GFAPについての基準レベルは、
 少なくとも約20 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間でありうる。

【0157】

一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、少なくとも約10 pg/mL、少なくとも約20 pg/mL、
 少なくとも約30 pg/mL、少なくとも約40 pg/mL、少なくとも約50 pg/mL、
 少なくとも約55 pg/mL、少なくとも約60 pg/mL、少なくとも約65 pg/mL、
 少なくとも約70 pg/mL、少なくとも約75 pg/mL、少なくとも約80 pg/mL、
 少なくとも約85 pg/mL、少なくとも約90 pg/mL、少なくとも約95 pg/mL、
 少なくとも約100 pg/mL、少なくとも約150 pg/mL、少なくとも約200 pg/mL、
 少なくとも約250 pg/mL、少なくとも約300 pg/mL、少なくとも約350 pg/mL、
 少なくとも約400 pg/mL、少なくとも約450 pg/mL、又は少なくとも約500 pg/mLでありうる。一部の実施形態において、GFAPについての基準レベルは、約20 pg/mL ~ 約200 pg/mLの間である。一部の実施形態において、UCH-L1についての基準レベルは、約80 pg/mL ~ 約150 pg/mLの間である。

【0158】

一部の実施形態において、本方法は、下記において記載される通り、ヒト対象を外傷性

10

20

30

40

50

脳損傷処置により処置し、かつ／又はヒト対象をモニタリングするステップをさらに含む。

【 0 1 5 9 】

本明細書において記載された方法において利用されたアッセイの性質は、それほど重要ではなく、検査は、例えば、イムノアッセイ、タンパク質免疫沈降、免疫電気泳動、化学解析、S D S - P A G E 及びウェスタンブロット解析又はタンパク質免疫染色、電気泳動解析、タンパク質アッセイ、競合的結合アッセイ、機能的タンパク質アッセイ、又は高速液体クロマトグラフィー（H P L C）若しくは液体クロマトグラフィー - 質量分析（L C / M S）のような、クロマトグラフィー法若しくは分光法のような、当技術分野において公知である、任意のアッセイでありうる。また、アッセイは、当業者に公知の臨床化学フォーマットにおいて利用されうる。このようなアッセイについては、本明細書の第 5 ～ 9 10
節において、さらに詳細に記載されている。当技術分野において、特異的な試料型を利用するアッセイ（例えば、血清を用いるイムノアッセイ又は全血を利用するポイントオブケアデバイスなど）において使用された値（例えば、基準レベル、カットオフ、閾値、特異度、感度、較正物質及び／又は対照の濃度など）は、アッセイ標準化のような、当技術分野において公知の技法を使用して、他のアッセイフォーマットへと外挿されることが公知である。例えば、アッセイの標準化が実施されうる、1つの方式は、比較法に見合う傾きを得るように、試料濃度の読取りを高値又は低値とするために、アッセイにおいて利用される較正物質へと、係数を適用することによるものである。1つのアッセイにおいて得られた結果を、別のアッセイへと標準化する、他の方法も周知であり、文献において記載されている（例えば、その内容が、参照により本明細書に組み込まれた、D a v i d W i l d、*「Immunooassay Handbook」*、4版、3.5章、315～322頁を参照されたい）。20

【 0 1 6 0 】

3. 対象に由来する、少なくとも2つの試料を使用する、頭部への損傷を負ったヒト対象に対して、イメージングを実施するのかどうかについての決定の一助となる方法

本開示は、他の方法の中でとりわけ、頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、M R I スキャン又はC T スキャンなどのイメージング手順を実施するのかどうかについて決定する一助となる方法に関する。本明細書において使用された「ヒト対象に対して、M R I スキャン又はC T スキャンなどのイメージング手順を実施するのかどうかについての決定」とは、対象のM R I が陽性となる、又は頭部C T スキャンが陽性となる、すなわち、頭蓋内病変が存在する可能性が、そうでない場合より高いことを決定するのに、他の情報（例えば、臨床評価データ）と共に、前述の方法が使用されうるという事実を指す。具体的に、このような方法は、推測される損傷から約24時間以内に対象から採取された第1の試料及び第1の試料が採取された約3～約6時間後に対象から採取された第2の試料である、対象から得られた、少なくとも2つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；少なくとも2つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1（U C H - L 1）、グリア原線維性酸性タンパク質（G F A P）又はこれらの組合せのような、外傷性脳損傷についての早期バイオマーカーを検出するステップ及び早期バイオマーカーのレベルが、第1の試料から、第2の試料へと、少なくともある絶対量だけ、低下又は上昇する場合に、M R I スキャン又はC T スキャンなどのイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの、第1の試料から、第2の試料への、少なくともある絶対量だけの、低下又は上昇が見られない場合に、イメージング手順を実施しない（イメージング手順の実施「を除外する」）ステップを含みうる。試料は、生物学的試料でありうる。30

【 0 1 6 1 】

一部の実施形態において、本方法は、試料を、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼL1（U C H - L 1）、グリア原線維性酸性タンパク質（G F A P）又はこれらの組合せのようなT B I の早期バイオマーカーに対する抗体と接触させて、抗体と早期バイオマーカーとの複合体の形成を可能とするステップを含みうる。本方法はまた、結果として得られる抗体 - 早期バイオマーカー複合体を検出して、第1の試料及び第2の試料の各々につ40

10

20

30

40

50

いて、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーのレベルを決定するステップも含む。UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの存在の開始は、推測される損傷の発生後、約0～約24時間以内に現れる。一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの存在の開始は、頭部への損傷後、約0分間、約30分間、約60分間、約90分間、約120分間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間又は約24時間以内に現れる。

【0162】

一部の実施形態において、対象のMRIスキャン又は頭部CTスキャンが、陽性となるのか、陰性となるのか、すなわち、頭蓋内病変が存在するのか、存在しないのかを決定するように、第1の試料は、推測される損傷から24時間以内である、第1の時点において得られ、第2の試料が、第1の時点の後である、第2の時点又は、任意選択的に、第3の時点若しくは第4の時点において得られる。一部の実施形態において、第1の試料は、推測される損傷後、約24時間以内に採取され、第2の試料は、第1の試料の後、約3時間～約6時間以内に採取される。一部の実施形態において、第1の時点は、頭部への損傷又は推測される損傷の、約0～約24時間後である。例えば、第1の時点は、頭部への損傷又は推測される損傷後、約0～約6時間以内、約0～約8時間以内、約0～約10時間以内、約0～約12時間以内、約0～約18時間以内、約6時間～約12時間以内、約6時間～約18時間以内又は約12時間～約18時間以内でありうる。例えば、第1の試料は、ヒト対象から、頭部への損傷又は推測される損傷後、約0分間、約30分間、約60分間、約90分間、約120分間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、7時間、約8時間、約9時間、約10時間、約11時間、約12時間、約13時間、約14時間、約15時間、約16時間、約17時間、約18時間、約19時間、約20時間、約21時間、約22時間、約23時間又は約24時間以内に採取されうる。

【0163】

一部の実施形態において、第2の時点又は、任意選択的に、第3の時点若しくは第4の時点は、第1の時点の約3時間～約6時間後のような、第1の時点の約1時間～約10時間後である。一部の実施形態において、第2の時点は、第1の時点の約1時間、約2時間、約3時間、約4時間、約5時間、約6時間、約7時間、約8時間、約9時間又は約10時間後である。

【0164】

一部の実施形態において、UCH-L1、GFAP又はこれらの組合せのような早期バイオマーカーの基準レベルは、少なくとも約70%～約100%の間の感度及び少なくとも約30%～約100%の間の特異度を有するアッセイにより決定される。一部の実施形態において、感度は、少なくとも約70%～約100%の間、少なくとも約70%～少なくとも約99%の間、少なくとも約70%～少なくとも約95%の間、少なくとも約70%～少なくとも約90%の間、少なくとも約70%～少なくとも約85%の間、少なくとも約75%～約100%の間、少なくとも約75%～少なくとも約99%の間、少なくとも約75%～少なくとも約95%の間、少なくとも約75%～少なくとも約90%の間、少なくとも約75%～少なくとも約85%の間、少なくとも約80%～約100%の間、少なくとも約80%～少なくとも約99%の間、少なくとも約80%～少なくとも約95%の間、少なくとも約80%～少なくとも約90%の間、少なくとも約80%～少なくとも約85%の間、少なくとも約85%～約100%の間、少なくとも約85%～少なくとも約99%の間、少なくとも約85%～少なくとも約95%の間、少なくとも約85%～少なくとも約90%の間、少なくとも約90%～約100%の間、少なくとも約90%～少なくとも約95%の間、少なくとも約95%～約100%の間又は少なくとも約95%～少なくとも約99%の間である。一部の実施形態において、感度は、少なくとも約70.0%、少なくとも約75.0%、少な

10

20

30

40

50

くとも約 80.0%、少なくとも約 85.0%、少なくとも約 87.5%、少なくとも約 90.0%、少なくとも約 95.0%、少なくとも約 99.0%、少なくとも約 99.1%、少なくとも約 99.2%、少なくとも約 99.3%、少なくとも約 99.4%、少なくとも約 99.5%、少なくとも約 99.6%、少なくとも約 99.7%、少なくとも約 99.8%、少なくとも約 99.9% 又は少なくとも約 100.0% である。

【0165】

一部の実施形態において、特異度は、少なくとも約 30%～約 100%の間、少なくとも約 30%～約 99%の間、少なくとも約 30%～約 95%の間、少なくとも約 30%～約 90%の間、少なくとも約 30%～約 85%の間、少なくとも約 30%～約 80%の間、少なくとも約 30%～約 75%の間、少なくとも約 30%～約 70%の間、少なくとも約 30%～約 60%の間、少なくとも約 30%～約 50%の間、少なくとも約 40%～約 100%の間、少なくとも約 40%～約 99%の間、少なくとも約 40%～約 95%の間、少なくとも約 40%～約 90%の間、少なくとも約 40%～約 85%の間、少なくとも約 40%～約 80%の間、少なくとも約 40%～約 75%の間、少なくとも約 40%～約 70%の間、少なくとも約 40%～約 60%の間、少なくとも約 40%～約 50%の間、少なくとも約 50%～約 100%の間、少なくとも約 50%～約 99%の間、少なくとも約 50%～約 95%の間、少なくとも約 50%～約 90%の間、少なくとも約 50%～約 85%の間、少なくとも約 50%～約 80%の間、少なくとも約 50%～約 75%の間、少なくとも約 50%～約 70%の間、少なくとも約 50%～約 60%の間、少なくとも約 60%～約 100%の間、少なくとも約 60%～約 99%の間、少なくとも約 60%～約 95%の間、少なくとも約 60%～約 90%の間、少なくとも約 60%～約 85%の間、少なくとも約 60%～約 80%の間、少なくとも約 60%～約 75%の間、少なくとも約 60%～約 70%の間、少なくとも約 70%～約 100%の間、少なくとも約 70%～約 99%の間、少なくとも約 70%～約 95%の間、少なくとも約 70%～約 90%の間、少なくとも約 70%～約 85%の間、少なくとも約 70%～約 80%の間、少なくとも約 70%～約 75%の間、少なくとも約 80%～約 100%の間、少なくとも約 80%～約 99%の間、少なくとも約 80%～約 95%の間、少なくとも約 80%～約 90%の間、少なくとも約 80%～約 85%の間、少なくとも約 90%～約 100%の間、少なくとも約 90%～約 99%の間、少なくとも約 90%～約 95%の間、少なくとも約 95%～約 99%の間又は少なくとも約 95%～約 100%の間である。一部の実施形態において、特異度は、少なくとも約 30.0%、少なくとも約 31.0%、少なくとも約 32.0%、少なくとも約 33.0%、少なくとも約 34.0%、少なくとも約 35.0%、少なくとも約 36.0%、少なくとも約 37.0%、少なくとも約 38.0%、少なくとも約 39.0%、少なくとも約 40.0%、少なくとも約 45.0%、少なくとも約 50.0%、少なくとも約 55.0%、少なくとも約 60.0%、少なくとも約 65.0%、少なくとも約 70.0%、少なくとも約 75.0%、少なくとも約 80.0%、少なくとも約 85.0%、少なくとも約 90.0%、少なくとも約 91.0%、少なくとも約 92.0%、少なくとも約 93.0%、少なくとも約 94.0%、少なくとも約 95.0%、少なくとも約 96.0%、少なくとも約 97.0%、少なくとも約 98.0%、少なくとも約 99.0%、少なくとも約 99.1%、少なくとも約 99.2%、少なくとも約 99.3%、少なくとも約 99.4%、少なくとも約 99.5%、少なくとも約 99.6%、少なくとも約 99.7%、少なくとも約 99.8%、少なくとも約 99.9% 又は少なくとも約 100.0% である。例えば、感度は、少なくとも約 99% であり、特異度は、少なくとも約 75% である、感度は、少なくとも約 99% であり、特異度は、少なくとも約 99% である、又は感度は、少なくとも約 100% であり、特異度は、少なくとも約 100% である。

【0166】

一部の実施形態において、絶対量は、少なくとも約 5 pg/mL～約 1000 pg/mLの間でありうる。一部の実施形態において、絶対量は、少なくとも約 5 pg/mL～約 1000 pg/mLの間、少なくとも約 5 pg/mL～約 750 pg/mLの間、少なく

10

20

30

40

50

50

5 pg/mL、少なくとも約100 pg/mL、少なくとも約110 pg/mL、少なくとも約120 pg/mL、少なくとも約129 pg/mL、少なくとも約130 pg/mL、少なくとも約140 pg/mL、少なくとも約150 pg/mL、少なくとも約200 pg/mL、少なくとも約250 pg/mL、少なくとも約300 pg/mL、少なくとも約350 pg/mL、少なくとも約400 pg/mL、少なくとも約450 pg/mL、少なくとも約500 pg/mL、少なくとも約550 pg/mL、少なくとも約600 pg/mL、少なくとも約650 pg/mL、少なくとも約700 pg/mL、少なくとも約750 pg/mL、少なくとも約800 pg/mL、少なくとも約900 pg/mL又は少なくとも約1000 pg/mLでありうる。

【0167】

一部の実施形態において、早期バイオマーカーは、UCH-L1であり、絶対量は、少なくとも約30 pg/mL～約100 pg/mLの間である、早期バイオマーカーは、GFAPであり、絶対量は、少なくとも約10 pg/mL～約150 pg/mLの間である、又はこれらの組合せである。

【0168】

一部の実施形態において、本方法は、下記において記載される通り、ヒト対象を外傷性脳損傷処置により処置し、かつ/又はヒト対象をモニタリングするステップをさらに含む。

【0169】

本明細書において記載された方法において利用されたアッセイがどのようなものかは、それほど重要ではなく、検査は、例えば、イムノアッセイ、タンパク質免疫沈降、免疫電気泳動、化学分析、SDS-PAGE及びウェスタンブロット解析又はタンパク質免疫染色、電気泳動解析、タンパク質アッセイ、競合的結合アッセイ、機能的タンパク質アッセイ又は高速液体クロマトグラフィー(HPLC)若しくは液体クロマトグラフィー-質量分析(LC/MS)のような、クロマトグラフィー法若しくは分光法のような、当技術分野において公知である、任意のアッセイでありうる。また、臨床化学フォーマット、例えば当業者に公知の臨床化学フォーマットのアッセイも利用されうる。このようなアッセイについては、本明細書の第5～9節において、さらに詳細に記載されている。当技術分野において、特異的な試料型を利用するアッセイ(例えば、血清を用いるイムノアッセイ又は全血を利用するポイントオブケアデバイスなど)において使用された値(例えば、基準レベル、カットオフ、閾値、特異度、感度、較正物質及び/又は対照の濃度など)は、アッセイ標準化のような、当技術分野において公知の技法を使用して、他のアッセイフォーマットへと外挿されうることが公知である。例えば、アッセイの標準化が実施されうる、1つの方式は、比較法に見合う傾きを得るように、試料濃度の読取りを高値又は低値とするために、アッセイにおいて利用される較正物質へと、係数を適用することによるものである。1つのアッセイにおいて得られた結果を、別のアッセイへと標準化する、他の方法も周知であり、文献において記載されている(例えば、その内容が、参照により本明細書に組み込まれた、David Wild、「Immunoassay Handbook」、4版、3.5章、315～322頁を参照されたい)。

【0170】

4. 頭部への損傷を負った対象の処置及びモニタリング

上記された方法において同定された対象は、処置又はモニタリングされうる。一部の実施形態において、本方法は、ヒト対象を、当技術分野において公知である、任意の処置のような、外傷性脳損傷処置により処置するステップをさらに含む。例えば、外傷性脳損傷の処置は、頭部への損傷の重症度に応じて、様々な形態を取りうる。例えば、軽度TBIを患う対象の場合、処置は、休息、スポーツのような、身体活動を控えること、日向に出るときの、光線の回避又はサングラスの着用、頭痛又は偏頭痛を緩和するための投薬、抗悪心薬などのうちの1つ以上を含みうる。中等度、重度又は中等度～重度のTBIを患う患者のための処置は、1つ以上の適切な薬物(例えば、利尿剤、抗痙攣薬物、個体を鎮静させ、薬物誘導性昏睡へと導く薬物など)又は他の医薬若しくは生物医薬(TBIの処置のために公知の医薬又は将来開発される医薬)、1つ以上の手術手順(例えば、血腫の除

10

20

30

40

50

去、頭蓋骨骨折の修復、減圧開頭術など）、気道の保護及び1つ以上の治療（例えば、1つ以上のリハビリ、認知行動学的治療、アンガーマネージメント、心理カウンセリングなど）を含みうる。一部の実施形態において、本方法は、ヒト対象をモニタリングするステップをさらに含む。一部の実施形態において、対象は、CTスキャン又はMRIによりモニタリングされうる。

【0171】

5. UCH-L1のレベルを測定するための方法

上記された方法において、UCH-L1レベルは、イムノアッセイ、タンパク質免疫沈降、免疫電気泳動、化学解析、SDS-PAGE及びウェスタンブロット解析若しくはタンパク質免疫染色のような抗体依存的方法のような、電気泳動解析、タンパク質アッセイ、競合的結合アッセイ、機能的タンパク質アッセイ、又は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）若しくは液体クロマトグラフィー-質量分析（LC/MS）のような、クロマトグラフィー法若しくは分光法のような、任意の手段により測定されうる。また、当業者

10

【0172】

一部の実施形態において、UCH-L1のレベルを測定するステップは、試料を、第1の特異的結合メンバー及び第2の特異的結合メンバーと接触させるステップを含む。一部の実施形態において、第1の特異的結合メンバーは、捕捉抗体であり、第2の特異的結合メンバーは、検出抗体である。一部の実施形態において、UCH-L1のレベルを測定するステップは、試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、（1）UCH-L1上又はUCH-L1断片上のエピトープに結合して捕捉抗体-UCH-L1抗原複合体（例えば、UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原複合体）を形成する捕捉抗体（例えば、UCH-L1捕捉抗体）、及び（2）検出可能な標識を含み、捕捉抗体が結合していないUCH-L1上のエピトープに結合してUCH-L1抗原-検出抗体複合体（例えば、UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体）を形成する検出抗体（例えば、UCH-L1検出抗体）と接触させて、捕捉抗体-UCH-L1抗原-検出抗体複合体（例えば、UCH-L1捕捉抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1検出抗体複合体）を形成すること、並びにUCH-L1の、試料中量又は試料中濃度を、捕捉抗体-UCH-L1抗原-検出抗体複合体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定することを

20

30

【0173】

一部の実施形態において、第1の特異的結合メンバーは、固体支持体上に固定化される。一部の実施形態において、第2の特異的結合メンバーは、固体支持体上に固定化される。一部の実施形態において、第1の特異的結合メンバーは、下記で記載されるUCH-L1抗体である。

【0174】

一部の実施形態において、試料は、希釈される、又は希釈されない。試料は、約1～約25マイクロリットル、約1～約24マイクロリットル、約1～約23マイクロリットル、約1～約22マイクロリットル、約1～約21マイクロリットル、約1～約20マイクロリットル、約1～約18マイクロリットル、約1～約17マイクロリットル、約1～約16マイクロリットル、約15マイクロリットル又は約1マイクロリットル、約2マイクロリットル、約3マイクロリットル、約4マイクロリットル、約5マイクロリットル、約6マイクロリットル、約7マイクロリットル、約8マイクロリットル、約9マイクロリットル、約10マイクロリットル、約11マイクロリットル、約12マイクロリットル、約13マイクロリットル、約14マイクロリットル、約15マイクロリットル、約16マイクロリットル、約17マイクロリットル、約18マイクロリットル、約19マイクロリットル、約20マイクロリットル、約21マイクロリットル、約22マイクロリットル、約23マイクロリットル、約24マイクロリットル又は約25マイクロリットルでありうる。一部の実施形態において、試料は、約1～約150マイクロリットル若しくはこれ未満又は約1～約25マイクロリットル若しくはこれ未満である。

40

50

【 0 1 7 5 】

ポイントオブケアデバイス以外の、一部の測定器（例えば、A b b o t t L a b o r a t o r i e s 製の測定器である A R C H I T E C T（登録商標）及び他のコア検査測定器など）は、U C H - L 1 の、2 5 , 0 0 0 p g / m L 以上の試料中レベルを測定することが可能でありうる。

【 0 1 7 6 】

他の検出法は、ナノポアデバイス又はナノウェルデバイスの使用を含む、又はこれらにおける使用に適合させられうる。ナノポアデバイスの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、国際特許公開第 2 0 1 6 / 1 6 1 4 0 2 号において記載されている。ナノウェルデバイスの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、国際特許公開第 2 0 1 6 / 1 6 1 4 0 0 号において記載されている。

【 0 1 7 7 】

6 . U C H - L 1 抗体

本明細書において記載された方法は、「U C H - L 1 抗体」と称される、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1（「U C H - L 1」）（又はこの断片）に特異的に結合する単離抗体を使用しうる。U C H - L 1 抗体は、U C H - L 1 状態を、外傷性脳損傷の尺度として評価するか、又は U C H - L 1 の、試料中の存在を検出する、U C H - L 1 の、試料中量を定量する、若しくは U C H - L 1 の、試料中の存在を検出し、かつ、U C H - L 1 の、試料中量を定量するのに使用されうる。

【 0 1 7 8 】

a . ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1（U C H - L 1）

「ユビキチン C 末端ヒドロラーゼ」としてもまた公知のユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1（U C H - L 1）（「U C H - L 1」）は、脱ユビキチン化酵素である。U C H - L 1 は、その産物が、ユビキチンの、小型の C 末端付加物を加水分解して、ユビキチン単量体を発生させる遺伝子ファミリーのメンバーである。U C H - L 1 の発現は、ニューロン及びびまん性神経内分泌系の細胞並びにそれらの腫瘍に、高度に特異的である。U C H - L 1 は、全てのニューロン内に、豊富に存在し（全脳タンパク質のうちの、1 ~ 2 % を占める）、とりわけ、ニューロン及び精巣 / 卵巣において発現される。U C H - L 1 の触媒三残基は、そのヒドロラーゼ活性の一因となる、9 0 位におけるシステイン、1 7 6 位におけるアスパラギン酸及び 1 6 1 位におけるヒスチジンを含有する。

【 0 1 7 9 】

ヒト U C H - L 1 は、以下のアミノ酸配列：

【 0 1 8 0 】

【 化 1 】

MLKPKMEINPEMLNKVLSRLGVAGQWRFVDVLGLEEESLGSPAPACALL
LLFPLTAQHENFRKKQIEELKGQEVSPKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDKLGF
EDGSVLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIQAAHDAVAQEGQCRVDDKVNHFHIL
FNNVDGHLIELDGRMPFPVNHGASSEDTLKDAAKVCREFTEREQGEVRFSAVALC
KAA（配列番号 1）

を有しうる。

【 0 1 8 1 】

ヒト U C H - L 1 は、配列番号 1 の断片又は変異体でありうる。U C H - L 1 の断片は、5 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、1 0 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、5 0 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、6 0 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、6 5 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、1 0 0 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、1 5 0 ~ 2 2 5 アミノ酸の間、1 0 0 ~ 1 7 5 アミノ酸の間又は 1 7 5 ~ 2 2 5 アミノ酸の間の長さでありうる。断片は、配列番号 1 に由来する、連続番号のアミノ酸を含みうる。

【 0 1 8 2 】

b. UCH-L1 認識抗体

抗体は、UCH-L1、この断片、UCH-L1のエピトープ又はこの変異体に結合する抗体である。抗体は、抗UCH-L1抗体の断片又はこの変異体若しくは誘導体でありうる。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体でありうる。抗体は、キメラ抗体、単鎖抗体、アフニティ成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又はFab断片のような抗体断片又はこれらの混合物でありうる。抗体の断片又は誘導体は、F(ab')₂断片、Fv断片又はscFv断片を含みうる。抗体の誘導体は、ペプチド模倣体により作製されうる。さらに、単鎖抗体を作製するために記載されている技法は、単鎖抗体を作製するように適合させられうる。

【0183】

抗UCH-L1抗体は、キメラ抗UCH-L1又はヒト化抗UCH-L1抗体でありうる。一実施形態において、ヒト化抗体及びキメラ抗体のいずれも、一価である。一実施形態において、ヒト化抗体及びキメラ抗体のいずれも、Fc領域へと連結された、単一のFab領域を含む。

【0184】

ヒト抗体は、ファージディスプレイ技術又はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにより導出されうる。ヒト抗体は、ヒトのインビボにおける免疫応答の結果として作出及び単離されうる。例えば、Funaroら、BMC Biotechnology、2008(8):85を参照されたい。したがって、抗体は、ヒトの産物であることが可能であり、動物レパートリーではない場合がある。抗体は、ヒト由来であるため、自己抗原に対する反応性の危険性は、最小化されうる。代替的に、標準的な酵母ディスプレイライブラリー及び酵母ディスプレイ技術は、ヒト抗UCH-L1抗体を選択及び単離するのに使用されうる。例えば、ナイーブヒト単鎖可変断片(scFv)のライブラリーは、ヒト抗UCH-L1抗体を選択するのに使用されうる。トランスジェニック動物は、ヒト抗体を発現させるのに使用されうる。

【0185】

ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子であって、非ヒト種に由来する、1つ以上の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する抗体分子でありうる。

【0186】

抗体は、それが、当技術分野において公知の抗体と異なる生物学的機能を保有するという点で、公知の抗体と識別可能である。

【0187】

(1) エピトープ

抗体は、UCH-L1(配列番号1)、この断片又はこの変異体に免疫特異的に結合しうる。抗体は、エピトープ領域内の、少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸又は少なくとも10アミノ酸を免疫特異的に認識することが可能であり、これらに結合しうる。抗体は、エピトープ領域のうちの、少なくとも3連続アミノ酸、少なくとも4連続アミノ酸、少なくとも5連続アミノ酸、少なくとも6連続アミノ酸、少なくとも7連続アミノ酸、少なくとも8連続アミノ酸、少なくとも9連続アミノ酸又は少なくとも10連続アミノ酸を有するエピトープを免疫特異的に認識することが可能であり、これらに結合しうる。

【0188】

c. 抗体の調製/作製

抗体は、当業者に周知の技法を含む、様々な技法のうちのいずれかにより調製されうる。一般に、抗体は、従来の技法を介するか、又は抗体の遺伝子、重鎖及び/若しくは軽鎖の、適切な細菌細胞宿主若しくは哺乳動物細胞宿主へのトランスフェクションであって、組換えでありうる抗体の作製を可能とするためのトランスフェクションを介する、モノクローナル抗体の作出を含む細胞培養法により作製されうる。「トランスフェクション」と

10

20

30

40

50

いう用語の多様な形態は、外因性DNAの、原核宿主細胞又は真核宿主細胞への導入のために一般に使用されている、多種多様な技法、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。抗体を、原核宿主細胞又は真核宿主細胞において発現させることが可能であるが、そのような真核細胞（そして、特に、哺乳動物の細胞）は、原核細胞より、アSEMBルし、適正にフォールディングされ、免疫学的に活性である抗体を分泌する可能性が高いため、抗体の、真核細胞内の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞内の発現が最も好ましい。

【0189】

組換え抗体を発現させるための、例示的な哺乳動物宿主細胞は、例えば、Kaufman及びSharp、J. Mol. Biol.、159：601～621（1982）において記載されているようにDHFR選択用マーカーと共に使用されるチャニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（Urlaub及びChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77：4216～4220（1980）において記載されているdhfr-CHO細胞を含む）、NS0骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが、哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、抗体は、宿主細胞内の抗体の発現又は、より好ましくは、宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間にわたり、宿主細胞を培養することにより作製される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して、培養培地から回収されうる。

【0190】

宿主細胞はまた、Fab断片又はscFv分子のような、機能的抗体断片を作製するのにも使用されうる。上記の手順に対する変動は、実施されることが理解される。例えば、宿主細胞に、抗体の軽鎖及び／又は重鎖の機能的断片をコードするDNAをトランスフェクトすることが所望されうる。組換えDNA技術はまた、目的の抗原への結合に必要な軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードするDNAの一部又は全部を除去するのにも使用されうる。また、このような切断型DNA分子から発現させた分子も、抗体に包含される。加えて、1つの重鎖及び1つの軽鎖が、抗体（すなわち、ヒトUCH-L1に結合する抗体）であり、他の重鎖及び軽鎖が、ヒトUCH-L1以外の抗原に特異的である、二官能性抗体も、抗体を、標準的な化学的架橋法を介して、第2の抗体へと架橋することにより作製されうる。

【0191】

抗体又はこの抗原結合性部分を組換え発現させるための好ましい系において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介型トランスフェクションにより、dhfr-CHO細胞へと導入される。組換え発現ベクター内において、高レベルの遺伝子の転写を駆動するように、抗体重鎖遺伝子及び抗体軽鎖遺伝子の各々が、CMVエンハンサー／AdMLPプロモーター調節エレメントへと作動的に連結される。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサートによる選択／増幅を使用するベクターをトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も保有する。抗体の重鎖及び軽鎖の発現を可能とするように、選択された形質転換体の宿主細胞が培養され、無傷抗体が培養培地から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクトし、形質転換体について選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培養培地から回収するのに、標準的な分子生物学法が使用される。なおさらに、組換え抗体を合成する方法は、組換え抗体が合成されるまで、宿主細胞を、適切な培養培地中において培養することによる。本方法は、組換え抗体を、培養培地から単離するステップをさらに含む。

【0192】

モノクローナル抗体を調製する方法は、所望の特異性を有する抗体を作製することが可能な不死細胞株の調製を伴う。このような細胞株は、免疫化された動物から得られた脾臓細胞から作製されうる。動物は、UCH-L1又はこの断片及び／若しくは変異体により免疫化されうる。動物を免疫化するのに使用されるペプチドは、ヒトFc、例えば、ヒト抗体のFc（fragment crystallizable）領域又はテール領域を

10

20

30

40

50

コードするアミノ酸を含みうる。次いで、脾臓細胞が、例えば、骨髄腫細胞融合パートナーとの融合により免疫化される。様々な融合法が利用されうる。例えば、脾臓細胞及び骨髄腫細胞が、非イオン性界面活性剤と、数分間にわたり組み合わされ、次いで、低密度において、ハイブリッド細胞の増殖を支援するが、骨髄腫細胞の増殖を支援しない選択培地上に播種される。このような一技法は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン（HAT）選択を使用する。別の技法は、電気融合を含む。十分な時間、通例、約1～2週間の後、ハイブリッド体のコロニーが観察される。単一のコロニーが選択され、それらの培養物上清は、ポリペプチドに対する結合活性について試験される。高度な反応性及び特異性を有するハイブリドーマが使用されうる。

【0193】

モノクローナル抗体は、増殖するハイブリドーマコロニーの上清から単離されうる。加えて、収率を増強するように、ハイブリドーマ細胞株の、マウスのような、適切な脊椎動物宿主の腹腔への注射のような、多様な技法が利用されうる。次いで、モノクローナル抗体は、腹水又は血液から採取されうる。夾雑物は、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈殿及び抽出のような、従来の技法により、抗体から除去されうる。アフィニティークロマトグラフィーは、抗体を精製する工程において使用されうる方法の例である。

【0194】

タンパク質分解酵素であるパパインは、IgG分子を優先的にいくつかの断片に切断して、これらのうちの2つの（Fab断片）の各々が、無傷の抗原結合部位を含む、共有結合的ヘテロ二量体を含む断片をもたらす。酵素であるペプシンは、IgG分子を切断して、両方の抗原結合性部位を含む、Fab'断片を含む、いくつかの断片をもたらすことが可能である。

【0195】

Fv断片は、IgMの、優先的なタンパク質分解性切断により作製されうるが、まれな場合に、IgG免疫グロブリン分子又はIgA免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解性切断によっても作製されうる。Fv断片は、組換え法を使用して導出されうる。Fv断片は、天然抗体分子の抗原認識能及び抗原結合能の大半を保持する抗原結合部位を含む、非共有結合的VH：VLヘテロ二量体を含む。

【0196】

抗体、抗体断片又は誘導体は、それぞれ、CDRに対する支持をもたらし、CDRの、互いに対する空間的関係を規定する、重鎖及び軽鎖のフレームワーク（「FR」）のセットの間に挿入された、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域（「CDR」）のセットを含みうる。CDRのセットは、重鎖V領域又は軽鎖V領域からなる、3つの超可変領域を含有しうる。

【0197】

必須の特異性を有する抗体を作製又は単離する、他の適する方法であって、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば、Cambridge Antibody Technologies（Cambridgeshire、UK）、MorphoSys（Martinsried/Planegg、Del.）、Biovation（Aberdeen、Scotland、UK）、BioInvent（Lund、Sweden）のような、多様な市販品の販売元から市販されている、ペプチドライブラリー又はタンパク質ライブラリー（例えば、バクテリオファージライブラリー、リボソームライブラリー、オリゴヌクレオチドライブラリー、RNAライブラリー、cDNAライブラリー、酵母ライブラリーなどのディスプレイライブラリーであるがこれらに限定されない）から組換え抗体を選択する方法を含むがこれらに限定されない方法が使用されうる。米国特許第4,704,692号；同第5,723,323号；同第5,763,192号；同第5,814,476号；同第5,817,483号；同第5,824,514号；同第5,976,862号を参照されたい。代替的な方法は、ヒト抗体のレパートリーを作製することが可能な、トランスジェニック動物の免疫化（例えば、SCIDマウス、Nguyenら（1997）、Microbiol. Immunol.、41：901～907；San

10

20

30

40

50

dhuら(1996)、Crit. Rev. Biotechnol.、16:95~118; Erenら(1998)、Immunol.、93:154~161)であって、当技術分野において公知であり、かつ/又は本明細書において記載された、トランスジェニック動物の免疫化に依拠する。このような技法は、リボソームディスプレイ(Hanesら(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:4937~4942; Hanesら(1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、95:14130~14135); 単一細胞による抗体作製技術(例えば、選択リンパ球抗体法(「SLAM」)(米国特許第5,627,052号、Wenら(1987)J. Immunol.、17:887~892; Babcookら(1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93:7843~7848); ゲル微小液滴及び
10 フローサイトメトリー(Powellら(1990)、Biotechnol.、8:333-337; One Cell Systems (Cambridge, Mass.); Grayら(1995)、J. Imm. Meth.、182:155~163; Kenn
yら(1995)、Bio/Technol.、13:787~790); B細胞の選択
(Steenbakkersら(1994)、Molec. Biol. Reports、19:125~134(1994))を含むがこれらに限定されない。

【0198】

アフニティー成熟抗体は、当技術分野において公知である、多数の手順のうちのいずれか1つにより作製されうる。例えば、Marksら、BioTechnology、10:779~783(1992)は、VHとVLとのドメインシャッフリングによるアフニ
20 ティー成熟について記載している。CDR残基及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発については、Barbasら、Proc. Nat. Acad. Sci. USA、91:3809~3813(1994); Schierら、Gene、169:147~155(1995); Yeltonら、J. Immunol.、155:1994~2004(1995); Jacksonら、J. Immunol.、154(7):3310~3319(1995); Hawkinsら、J. Mol. Biol.、226:889~896(1992)により記載されている。選択的突然変異誘発位置及び活性増強アミノ酸残基を伴う接触位置又は超変異位置における選択的突然変異については、米国特許第6,914,128B1号において記載されている。

【0199】

抗体の変異体はまた、抗体をコードするポリヌクレオチドを、トランスジェニック動物又はこのような抗体をそれらのミルク中に産生するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどのような哺乳動物をもたらしに適する宿主へと送達することを使用して調製されうる。これらの方法は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,827,690号; 同第5,849,992号; 同第4,873,316号; 同第5,849,992号; 同第5,994,616号; 同第5,565,362号及び同第5,304,489号において記載されている。

【0200】

抗体の変異体はまた、このような抗体、指定された部分又は変異体を、植物の部分又はこれらから培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物及び培養植物細胞
40 (例えば、タバコ、トウモロコシ、及びウキクサであるがこれらに限定されない)をもたらしように、ポリヌクレオチドを送達することによっても調製されうる。例えば、Cramerら(1999)、Curr. Top. Microbiol. Immunol.、240:95~118及びこの文献において引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを使用する、大量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックのタバコ葉の産生について記載している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系において産生された、又は天然の供給源から精製された哺乳動物タンパク質と同等の生物学的活性を伴う哺乳動物タンパク質を、市販品生産のレベルにおいて発現させるのに使用されている。例えば、Hoodら、Adv. Exp. Med. Biol. (1999)、464:127~147及びこの文献において引用された参考文献を参照されたい。抗体の変異体
50

はまた、単鎖抗体 (s c F v) のような抗体断片を含むトランスジェニック植物の種子であって、タバコの種子及びパレイショの塊茎を含む種子からも大量に作製されている。例えば、Conradら (1998)、Plant Mol. Biol.、38:101~109及びこの文献において引用された参考文献を参照されたい。したがって、抗体はまた、公知の方法に従いトランスジェニック植物を使用しても作製されうる。

【 0 2 0 1 】

抗体の誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を修飾するか、又は結合、アフィニティー、オン速度、オフ速度、アビディティー、特異性、半減期若しくは他の任意の適切な特徴を低減、増強若しくは修飾することにより作製されうる。一般に、可変領域及び定常領域の非ヒト配列を、ヒトアミノ酸又は他のアミノ酸により置換しながら、非ヒトCDR配列又はヒトCDR配列のうちの一部又は全部は維持される。

【 0 2 0 2 】

小型の抗体断片は、2つの抗原結合性部位を有するダイアボディーであって、断片が、同じポリペプチド鎖において、軽鎖可変ドメイン (V L) へと接続された重鎖可変ドメイン (V H) (V H - V L) を含む、ダイアボディーでありうる。例えば、EP404,097; WO93/1161及びHollingerら (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448を参照されたい。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補性ドメインと対合し、2つの抗原結合性部位を創出するように強いられる。また、参照によりその全体において本明細書に組み込まれ、かつ、1つ以上のアミノ酸が、親抗体の超可変領域内へと挿入され、標的抗原に対する結合アフィニティーが、この抗原に対する親抗体の結合アフィニティーの少なくとも約2倍強い抗体変異体についても開示する、Chenらによる、米国特許第6,632,926号も参照されたい。

【 0 2 0 3 】

抗体は、直鎖状抗体でありうる。当技術分野において、直鎖状抗体を作るための手順が公知であり、Zapataら (1995)、Protein Eng.、8 (10) : 1057~1062において記載されている。略述すると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成する、タンデムのFdセグメント (V H - C H 1 - V H - C H 1) の対を含む。直鎖状抗体は、二重特異性又は単一特異性でありうる。

【 0 2 0 4 】

抗体は、プロテインA精製、硫酸アンモニウム沈殿又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィー又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない、公知の方法により、組換え細胞培養物から回収及び精製されうる。高速液体クロマトグラフィー (「HPLC」) もまた、精製のために使用されうる。

【 0 2 0 5 】

抗体を検出可能に標識することは、有用でありうる。抗体を、これらの薬剤へとコンジュゲートさせるための方法は、当技術分野において公知である。例示だけを目的として述べると、抗体は、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどのような検出可能部分により標識されうる。このような標識抗体は、インビボにおける、又は単離された被験試料中の診断法のために使用されうる。このような標識抗体は、サイトカイン、リガンド、別の抗体へと連結されうる。抗腫瘍効果を達成するための、抗体へのカップリングに適する薬剤は、インターロイキン2 (I L - 2) 及び腫瘍壊死因子 (T N F) のようなサイトカイン；光力学療法における使用のための光増感剤であって、アルミニウム (I I I) フタロシアニンテトラスルホン酸、ヘマトポルフィリン及びフタロシアニンを含む光増感剤；ヨウ素131 (¹³¹I)、イットリウム90 (⁹⁰Y)、ビスマス212 (²¹²Bi)、ビスマス213 (²¹³Bi)、テクネシウム99m (^{99m}Tc)、レニウム186 (¹⁸⁶Re) 及びレニウム188 (¹⁸⁸Re) のような放射性核種；ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、メトトレキサート、ダウノマイシン、ネオカルチノ

10

20

30

40

50

スタチン及びカルボプラチンのような抗生剤；ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素A、ブドウ球菌エンテロトキシンA、アブリンA毒素、リシンA（脱グリコシル化リシンA及び天然リシンA）、TGF-アルファ毒素、タイワンコブラに由来する細胞毒素（ナジャ・ナジャ・アトラ）及びゲロニン（植物毒素）のような、細菌毒素、植物毒素及び他の毒素；レストリクトシン（アスペルギルス・レストリクツスにより産生されたりボソーム不活化タンパク質）、サポリン（サポナリア・オフィキナリスに由来するリボソーム不活化タンパク質）及びRNアーゼのような、植物、細菌及び真菌に由来する、リボソーム不活化タンパク質；チロシンキナーゼ阻害剤；ly207702（ニフッ素化プリンヌクレオシド）；抗細胞剤を含有するリボソーム（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、毒素をコードするプラスミド、メトトレキサートなど）並びに他の抗体又はF（ab）のような抗体断片を含む。

10

【0206】

ハイブリドーマ技術、選択リンパ球抗体法（SLAM）、トランスジェニック動物及び組換え抗体ライブラリーの使用を介する抗体の作製については、下記において、より詳細に記載される。

【0207】

（1）ハイブリドーマ技術を使用する、抗UCH-L1モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の、多種多様な技法であって、ハイブリドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組合せの使用を含む技法を使用して調製されうる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、例えば、Harlowら、「Antibodies: A Laboratory Manual」、2版（Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1988）；Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas」（Elsevier、N.Y.、1981）において教示されているハイブリドーマ法を含むハイブリドーマ法を使用して作製されうる。また、本明細書において使用された「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を介して作製された抗体に限定されないことも留意される。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン又はファージクローンを含む単一クローンに由来する抗体を指し、それが作製された方法を指すものではない。

20

30

【0208】

本方法により作製されるモノクローナル抗体並びに抗体を作出する方法は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養するステップを含みうるが、この場合、ハイブリドーマは、UCH-L1により免疫化された動物、例えば、ラット又はマウスから単離された脾臓細胞を、骨髄腫細胞と融合させ、次いで、融合体から生じるハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合することが可能な抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることにより作出されることが好ましい。略述すると、ラットは、UCH-L1抗原により免疫化されうる。好ましい実施形態において、UCH-L1抗原は、免疫応答を刺激するように、アジュバントと共に投与される。このようなアジュバントは、フロイント完全アジュバント又はフロイント不完全アジュバント、RIBI（ムラミルジペプチド）又はISCOM（免疫刺激性複合体）を含む。このようなアジュバントは、ポリペプチドを、局所的な沈着物内に封入することにより、急速な分散から保護しうる、又はこのようなアジュバントは、マクロファージ及び免疫系の他の構成要素に対して走化性である因子を分泌するように、宿主を刺激する物質を含有しうる。ポリペプチドが投与される場合、免疫化スケジュールは、何週間かにわたる、2回以上のポリペプチドの投与を伴うことが好ましいが、ポリペプチドの単回投与もまた、使用されうる。

40

【0209】

UCH-L1抗原による動物の免疫化の後、抗体及び/又は抗体産生細胞が、動物から得られうる。抗UCH-L1抗体含有血清は、動物から採血するか、又は動物を殺することにより、動物から得られる。血清は、動物から得られたままに使用されうる、免疫グ

50

ロブリン画分は、血清から得られうる、又は抗UCH-L1抗体は、血清から精製されうる。このようにして得られた血清又は免疫グロブリンは、ポリクローナルであるので、一連の異種特性を有する。

【0210】

免疫応答が検出されたら、例えば、ラット血清中において、抗原であるUCH-L1に特異的な抗体が検出されたら、ラット脾臓が摘出され、脾臓細胞が単離される。次いで、脾臓細胞が、周知の技法により、任意の適切な骨髓腫細胞、例えば、American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Va., U.S.) から市販されている細胞株である、SP20に由来する細胞へと融合させられる。ハイブリドーマが選択され、限界希釈によりクローニングされる。次いで、ハイブリドーマクローンが、当技術分野において公知の方法により、UCH-L1に結合することが可能な抗体を分泌する細胞についてアッセイされる。ラットを、陽性のハイブリドーマクローンにより免疫化することにより、一般に、高レベルの抗体を含有する腹水が作出されうる。

10

【0211】

別の実施形態において、抗体を産生する免疫化ハイブリドーマが、免疫化された動物から調製されうる。免疫化の後、動物は、殺され、当技術分野において周知の通り、脾臓B細胞は、免疫化された骨髓腫細胞へと融合される。例えば、Harlow及びLane、前出を参照されたい。好ましい実施形態において、骨髓腫細胞は、免疫グロブリンポリペプチドを分泌しない（非分泌性細胞株）。融合及び抗生剤による選択の後、ハイブリドーマは、UCH-L1若しくはこの部分又はUCH-L1を発現する細胞を使用してスクリーニングされる。好ましい実施形態において、初期スクリーニングは、酵素免疫測定アッセイ (ELISA) 又はラジオイムノアッセイ (RIA)、好ましくはELISAを使用して実施される。ELISAスクリーニングの例は、PCT公開第00/37504号において提示されている。

20

【0212】

抗UCH-L1抗体を産生するハイブリドーマは、ロバストなハイブリドーマの増殖、高度な抗体の産生、及び所望の抗体特徴を含む、所望の特徴について選択され、クローニングされ、さらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、インビボの同系動物、免疫系を欠く動物、例えば、ヌードマウスにおいて、又はインビトロの細胞培養物中において培養され、拡大されうる。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、拡大する方法は、当業者に周知である。

30

【0213】

好ましい実施形態において、ハイブリドーマは、ラットハイブリドーマである。別の実施形態において、ハイブリドーマは、マウス、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマのような、ヒト以外でラット以外の種において作製される。さらに別の好ましい実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髓腫が、抗UCH-L1抗体を発現するヒト細胞と融合させられた、ヒトハイブリドーマである。

【0214】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技法により作出されうる。例えば、本発明のFab断片及びF(ab')₂断片は、パパイン（2つの同一なFab断片をもたらす）又はペプシン（F(ab')₂断片をもたらす）のような酵素を使用する、免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断により作製されうる。IgG分子のF(ab')₂断片は、大型の（「親」）IgG分子の、2つの抗原結合性部位であって、親IgG分子の、両方の軽鎖（軽鎖可変領域及び定常領域を含有する）、重鎖のCH1ドメイン及びジスルフィド形成ヒンジ領域を含む、抗原結合性部位を保持する。したがって、F(ab')₂断片は、親IgG分子と同様に、抗原分子を架橋することが可能である。

40

【0215】

（2）SLAMを使用する、抗UCH-L1モノクローナル抗体

本発明の別の態様において、組換え抗体は、米国特許第5,627,052号；PCT

50

公開第 92/02551 号及び Babcock ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、93: 7843~7848 (1996) において記載されている通り、当技術分野において、選択リンパ球抗体法 (SLAM) と称される手順を使用して、単一の単離リンパ球から作出される。この方法において、ビオチンのようなリンカーを使用して、抗原である UCH-L1、UCH-L1 のサブユニット又はこの断片が、ヒツジ赤血球へとカップリングされ、UCH-L1 に対する特異性を伴う抗体を分泌する単一細胞を同定するのに使用される、抗原特異的溶血プラークアッセイを使用して、目的の抗体を分泌する、単一の細胞、例えば、免疫化された動物のうちのいずれか 1 つに由来するリンパ球がスクリーニングされる。目的の抗体分泌細胞を同定した後、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の cDNA が、逆転写酵素 PCR (RT-PCR) により、細胞からレスキューされ、次いで、これらの可変領域を、COS 細胞又は CHO 細胞のような、哺乳動物宿主細胞内の、適切な免疫グロブリン定常領域 (例えば、ヒト定常領域) の文脈において発現させる。次いで、インビトロにおいて選択されたリンパ球に由来する、増幅された免疫グロブリン配列をトランスフェクトされた宿主細胞は、例えば、UCH-L1 に対する抗体を発現する細胞を単離するように、トランスフェクト細胞をパニングすることにより、インビトロにおいて、さらなる解析及び選択を経る場合がある。増幅された免疫グロブリン配列は、インビトロアフィニティー成熟法によるように、インビトロにおいて、さらに操作される。例えば、PCT 公開第 97/29131 号及び PCT 公開第 00/56772 号を参照されたい。

【0216】

(3) トランスジェニック動物を使用する、抗 UCH-L1 モノクローナル抗体

本発明の別の実施形態において、抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又は全部を含む非ヒト動物を、UCH-L1 抗原により免疫化することにより作製される。ある実施形態において、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大型断片を含み、マウス抗体の作製が欠損する操作マウス株である、XENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスである。例えば、Green ら、Nature Genetics、7: 13~21 (1994) 並びに米国特許第 5,916,771 号; 同第 5,939,598 号; 同第 5,985,615 号; 同第 5,998,209 号; 同第 6,075,181 号; 同第 6,091,001 号; 同第 6,114,598 号及び同第 6,130,364 号を参照されたい。また、PCT 公開第 91/10741 号; PCT 公開第 94/02602 号; PCT 公開第 96/34096 号; PCT 公開第 96/33735 号; PCT 公開第 98/16654 号; PCT 公開第 98/24893 号; PCT 公開第 98/50433 号; PCT 公開第 99/45031 号; PCT 公開第 99/53049 号; PCT 公開第 00/09560 号及び PCT 公開第 00/37504 号も参照されたい。XENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスは、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を発生させる。XENOMOUSE (登録商標) トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座及び x 軽鎖遺伝子座の、メガ塩基サイズの、生殖細胞系列構成の YAC 断片を導入することにより、ヒト抗体レパートリーのうちの約 80% を含有する。その開示が参照により組み込まれた、Mendez ら、Nature Genetics、15: 146~156 (1997); Green 及び Jakobovits、J. Exp. Med.、188: 483~495 (1998) を参照されたい。

【0217】

(4) 組換え抗体ライブラリーを使用する、抗 UCH-L1 モノクローナル抗体

インビトロ法もまた、本発明の抗体を作るのに使用されうる場合があり、この場合、所望の UCH-L1 結合特異性を有する抗体を同定するのに、抗体ライブラリーがスクリーニングされる。組換え抗体ライブラリーの、このようなスクリーニングのための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、それらの各々の内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第 5,223,409 号 (Ladner ら); PCT 公開第 92/18619 号 (Kang ら); PCT 公開第 91/17271 号 (Dower ら); P

C T 公開第 9 2 / 2 0 7 9 1 号 (W i n t e r ら) ; P C T 公開第 9 2 / 1 5 6 7 9 号 (M a r k l a n d ら) ; P C T 公開第 9 3 / 0 1 2 8 8 号 (B r e i t l i n g ら) ; P C T 公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号 (M c C a f f e r t y ら) ; P C T 公開第 9 2 / 0 9 6 9 0 号 (G a r r a r d ら) ; F u c h s ら、B i o / T e c h n o l o g y、9 : 1 3 6 9 ~ 1 3 7 2 (1 9 9 1) ; H a y ら、H u m . A n t i b o d . H y b r o d o m a s、3 : 8 1 ~ 8 5 (1 9 9 2) ; H u s e ら、S c i e n c e、2 4 6 : 1 2 7 5 ~ 1 2 8 1 (1 9 8 9) ; M c C a f f e r t y ら、N a t u r e、3 4 8 : 5 5 2 ~ 5 5 4 (1 9 9 0) ; G r i f f i t h s ら、E M B O J .、1 2 : 7 2 5 ~ 7 3 4 (1 9 9 3) ; H a w k i n s ら、J . M o l . B i o l .、2 2 6 : 8 8 9 ~ 8 9 6 (1 9 9 2) ; C l a c k s o n ら、N a t u r e、3 5 2 : 6 2 4 ~ 6 2 8 (1 9 9 1) ; G r a m ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、8 9 : 3 5 7 6 ~ 3 5 8 0 (1 9 9 2) ; G a r r a r d ら、B i o / T e c h n o l o g y、9 : 1 3 7 3 ~ 1 3 7 7 (1 9 9 1) ; H o o g e n b o o m ら、N u c l . A c i d s R e s .、1 9 : 4 1 3 3 ~ 4 1 3 7 (1 9 9 1) ; B a r b a s ら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、8 8 : 7 9 7 8 ~ 7 9 8 2 (1 9 9 1) ; 米国特許出願公開第 2 0 0 3 / 0 1 8 6 3 7 4 号及び P C T 公開第 9 7 / 2 9 1 3 1 号、において記載されている方法を含む。

【 0 2 1 8 】

組換え抗体ライブラリーは、U C H - L 1 又は U C H - L 1 の部分により免疫化された対象に由来しうる。代替的に、組換え抗体ライブラリーは、ヒト U C H - L 1 により免疫化されていないヒト対象に由来する、ヒト抗体ライブラリーのように、ナイーブ対象、すなわち、U C H - L 1 により免疫化されていない対象に由来しうる。本発明の抗体は、ヒト U C H - L 1 を含むペプチドを伴う組換え抗体ライブラリーをスクリーニングして、これにより、U C H - L 1 を認識する抗体を選択することにより選択される。このようなスクリーニング及び選択を行うための方法は、前出の段落内の参考文献において記載されている方法のように、当技術分野において周知である。U C H - L 1 に対して、特定の結合アフィニティーを有する、本発明の抗体であって、ヒト U C H - L 1 から、特定の K_{off} 速度定数により解離する抗体のような抗体を選択するために、所望の K_{off} 速度定数を有する抗体を選択するように、当技術分野において公知の表面プラズモン共鳴法が使用されうる。h U C H - L 1 に対する、特定の中和活性を有する本発明の抗体であって、特定の IC_{50} を伴う抗体のような抗体を選択するために、U C H - L 1 活性の阻害を評価するための、当技術分野において公知の標準的方法が使用されうる。

【 0 2 1 9 】

一態様において、本発明は、ヒト U C H - L 1 に結合する、単離抗体又はこの抗原結合性部分に関する。好ましくは、抗体は、中和抗体である。多様な実施形態において、抗体は、組換え抗体又はモノクローナル抗体である。

【 0 2 2 0 】

例えば、抗体はまた、当技術分野において公知である、多様なファージディスプレイ法を使用して作出されうる。ファージディスプレイ法において、機能的な抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。このようなファージは、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はマウスの）から発現させた抗原結合性ドメインを提示するのに用いられうる。目的の抗原に結合する抗原結合性ドメインを発現するファージは、抗原により、例えば、標識抗原又は固体表面若しくはビーズに結合された、若しくはこれらへと捕捉された抗原を使用して選択又は同定されうる。これらの方法において使用されたファージは典型的に、ファージから発現させた f d 結合性ドメイン及び M 1 3 結合性ドメインを、組換えにより、ファージ遺伝子 I I I タンパク質又はファージ遺伝子 V I I I タンパク質へと融合させた、F a b 抗体ドメイン、F v 抗体ドメイン又はジスルフィド安定化 F v 抗体ドメインと共に含む、繊維状ファージである。抗体を作るのに使用されうるファージディスプレイ法の例は、B r i n k m a n n ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s、1 8 2 : 4 1 ~ 5 0 (1 9 9 5) ; A m e s ら、J . I m m u n o l . M e t h o d s、1 8 4 : 1 7

7 ~ 186 (1995); Kettleboroughら、Eur. J. Immunol.、24: 952 ~ 958 (1994); Persicら、Gene、187: 9 ~ 18 (1997); Burtonら、Advances in Immunology、57: 191 ~ 280 (1994); PCT公開第92/01047号; PCT公開第90/02809号; PCT公開第91/10737号; PCT公開第92/01047号; PCT公開第92/18619号; PCT公開第93/11236号; PCT公開第95/15982号; PCT公開第95/20401号及び米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号及び同第5,969,108号において開示されているファージディスプレイ法を含む。

10

【0221】

上記の参考文献において記載された通り、ファージ選択の後、ファージに由来する抗体のコード領域は、単離され、ヒト抗体を含む全抗体又は他の任意の所望の抗原結合性断片を作出するのに使用され、例えば、下記において詳細に記載される通り、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む、任意の所望の宿主内において発現させる。PCT公開第92/22324号; Mullinaxら、BioTechniques、12(6): 864 ~ 869 (1992); Sawaiら、Am. J. Reprod. Immunol.、34: 26 ~ 34 (1995) 及び Betterら、Science、240: 1041 ~ 1043 (1988) において開示されている方法のような、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば、Fab断片、Fab'断片及びF(ab')₂断片を組換えにより作製する技法もまた利用されうる。単鎖Fv抗体を作製するのに使用されうる技法の例は、米国特許第4,946,778号及び同第5,258,498号; Hustonら、Methods in Enzymology、203: 46 ~ 88 (1991); Shuら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90: 7995 ~ 7999 (1993) 及び Skerraら、Science、240: 1038 ~ 1041 (1988) において記載されている技法を含む。

20

【0222】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングに対する代替法である、大型のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための、当技術分野において公知である、他の方法も、本発明の抗体の同定へと適用されうる。代替的発現系の1つの種類は、組換え抗体ライブラリーをRNA-タンパク質融合体として発現させた発現系であって、PCT公開第98/31700号(Szostak及びRoberts)並びにRoberts及びSzostak、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94: 12297 ~ 12302 (1997) において記載されている発現系である。3'末端において、ペプチジルアクセプター抗生剤であるピューロマイシンを保有する、合成mRNAのインビトロ翻訳により、この系の、mRNAと、mRNAがコードする、ペプチド又はタンパク質との間において、共有結合的融合が創出される。したがって、特異的mRNAは、抗体又はこの部分の、二重特異性抗原への結合のような、コードされたペプチド又はタンパク質、例えば、抗体又はこの部分の特性に基づき、mRNAの複合体混合物(例えば、コンビナトリアルライブラリー)から濃縮されうる。このようなライブラリーのスクリーニングから回収された、抗体又はこの部分をコードする核酸配列は、上記された(例えば、哺乳動物の宿主細胞内の)組換え手段により発現され、さらに、突然変異が、当初選択された配列へと導入された、mRNA-ペプチド融合体のスクリーニングのさらなるラウンドにより、又は上記された、インビトロにおける、組換え抗体のアフィニティー成熟のための他の方法により、さらなるアフィニティー成熟にかけられうる。この方法論の好ましい例は、PROfusionディスプレイ技術である。

30

40

【0223】

別の手法において、抗体はまた、当技術分野において公知の酵母ディスプレイ法を使用

50

しても作出されうる。酵母ディスプレイ法において、抗体ドメインを、酵母細胞壁へとテザリングし、それらを、酵母の表面上に提示するのに、遺伝子法が使用される。特に、このような酵母は、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はマウスの）から発現させた抗原結合性ドメインを提示するのに用いられうる。抗体を作るのに使用されうる、酵母ディスプレイ法の例は、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第 6,699,658 号 (Witttrup) において開示された酵母ディスプレイ法を含む。

【0224】

d. 組換え UCH-L1 抗体の作製

抗体は、当技術分野において公知である、多数の技法のうちのいずれかにより作製されうる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターが、標準的技法により、宿主細胞へとトランスフェクトされた、宿主細胞からの発現である。「トランスフェクション」という用語の多様な形態は、外因性 DNA の、原核宿主細胞又は真核宿主細胞への導入のために一般に使用されている、多種多様な技法、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。本発明の抗体を、原核宿主細胞又は真核宿主細胞において発現させることが可能であるが、そのような真核細胞（そして、特に、哺乳動物の細胞）は、原核細胞より、アSEMBルし、適正にフォールディングさせられ、免疫学的に活性である抗体を分泌する可能性が高いため、抗体の、真核細胞内の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞内の発現が最も好ましい。

【0225】

本発明の組換え抗体を発現させるための、例示的な哺乳動物宿主細胞は、例えば、Kauffman 及び Sharp、J. Mol. Biol.、159:601~621 (1982) において記載されているように DHFR 選択用マーカーと共に使用されるチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞 (Urlaub 及び Chasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216~4220 (1980)) において記載されている、dhfr-CHO 細胞を含む)、NS0 骨髄腫細胞、COS 細胞及び SP2 細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが、哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、抗体は、宿主細胞内の抗体の発現又は、より好ましくは、宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間にわたり、宿主細胞を培養することにより作製される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して、培養培地から回収されうる。

【0226】

宿主細胞はまた、Fab 断片又は scFv 分子のような、機能的抗体断片を作製するのにも使用されうる。上記の手順に対する変動は、実施されうるということが理解される。例えば、宿主細胞に、本発明の抗体の軽鎖及び / 又は重鎖の機能的断片をコードする DNA をトランスフェクトすることが所望されうる。組換え DNA 技術はまた、目的の抗原への結合に必要でない軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードする DNA の一部又は全部を除去するのにも使用されうる。また、このような切断型 DNA 分子から発現させた分子も、本発明の抗体に包含される。加えて、1つの重鎖及び1つの軽鎖が、本発明の抗体（すなわち、ヒト UCH-L1 に結合する抗体）であり、他の重鎖及び軽鎖が、ヒト UCH-L1 以外の抗原に特異的である、二官能性抗体も、本発明の抗体を、標準的な化学的架橋法を介して、第2の抗体へと架橋することにより作製されうる。二官能性抗体はまた、二官能性抗体をコードするように操作された核酸を発現させることによって作製されうる。

【0227】

本発明の抗体又はこの抗原結合性部分を組換え発現させるための好ましい系において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介型トランスフェクションにより、dhfr-CHO 細胞へと導入される。組換え発現ベクター内において、高レベルの遺伝子の転写を駆動するように、抗体重鎖遺伝子及び抗体軽鎖遺伝子の各々が、CMV エンハンサー / AdMLP プロモーター調節エレメントへと作動的に連結される。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサートによる選択 / 増幅を使

10

20

30

40

50

用するベクターをトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子も保有する。抗体の重鎖及び軽鎖の発現を可能とし、無傷抗体が培養培地から回収されるように、選択された形質転換体の宿主細胞が培養される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクトし、形質転換体について選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培養培地から回収するのに、標準的な分子生物学法が使用される。なおさらに、本発明は、本発明の組換え抗体が合成されるまで、本発明の宿主細胞を、適切な培養培地中において培養することにより、本発明の組換え抗体を合成する方法を提供する。本方法は、組換え抗体を、培養培地から単離するステップをさらに含む。

【0228】

(1) ヒト化抗体

ヒト化抗体は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)を含む、抗体又はこの変異体、誘導体、類似体若しくは部分でありうる。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体であって、非ヒト種に由来する、1つ以上の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する非ヒト種抗体に由来しうる。

【0229】

本明細書において使用された、CDRの文脈における「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一なアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、少なくとも1つであるが、典型的に2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)であって、CDR領域の全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のCDR領域に対応し、フレームワーク領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である可変ドメインの実質的に全てを含む。一態様に従い、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的に、ヒト免疫グロブリンのFc領域の少なくとも一部も含む。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖、及び重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体はまた、重鎖の、CH1領域、ヒンジ領域、CH2領域、CH3領域及びCH4領域も含みうる。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖だけを含有する。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖だけを含有する。具体的な実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖及び/又は重鎖のヒト化可変ドメインだけを含有する。

【0230】

ヒト化抗体は、IgM、IgG、IgD、IgA、及びIgEを含む、免疫グロブリンの任意のクラス、並びに、限定なしに述べると、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4を含む、任意のアイソタイプから選択されうる。ヒト化抗体は、1つを超えるクラス又はアイソタイプに由来する配列を含むことが可能であり、特定の定常ドメインは、当技術分野において周知の技法を使用して、所望のエフェクター機能を最適化するように選択されうる。

【0231】

ヒト化抗体のフレームワーク領域及びCDRは、親配列に正確に対応する必要がない、例えば、ドナー抗体CDR又はコンセンサスフレームワークは、この部位におけるCDR残基又はフレームワーク残基が、ドナー抗体又はコンセンサスフレームワークに対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失により突然変異誘発されうる。しかし、一実施形態において、このような突然変異は、広範にわたる突然変異ではない。通例、ヒト化抗体残基のうちの、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%は、親のFR配列及びCDR配列の残基に対応する。本明細書において使用された「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサスの免疫グロブリン配列内のフレームワーク領域を指す。本明細書において使用された「コンセンサスの免疫グロブリン配列」という用語は、類縁の免疫グロブリン配列のファミリーにおいて、最も高頻度で発生するアミノ酸(又はヌクレオチド)から形成された配

10

20

30

40

50

列（例えば、Winnaker、「From Genes to Clones」(Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1987)を参照されたい)を指す。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列内の各位置は、ファミリー内のこの位置において、最も高頻度で発生するアミノ酸により占有されている。2つのアミノ酸が、同等に高頻度で発生する場合、いずれもが、コンセンサス配列内に含まれる。

【0232】

ヒト化抗体は、ヒトレシピエントにおける、これらの部分の治療適用の持続時間及び有効性を制限する、抗ヒト齧歯動物抗体に対する、望ましくない免疫応答を最小化するようにデザインされうる。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から、それへと導入された、1つ以上のアミノ酸残基を有しうる。これらの非ヒト残基は、典型的に、可変ドメインから採取される、「インポート」残基と称されることが多い。ヒト化は、超可変領域配列を、ヒト抗体の対応する配列で置換することにより実施されうる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的に無傷に満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種に由来する、対応する配列により置換されたキメラ抗体である。例えば、その内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第4,816,567号を参照されたい。ヒト化抗体は、一部の超可変領域残基と、おそらく、一部のFR残基とが、齧歯動物抗体内の相似部位に由来する残基により置換されたヒト抗体でありうる。本発明の抗体のヒト化又は操作は、米国特許第5,723,323号；同第5,976,862号；同第5,824,514号；同第5,817,483号；同第5,814,476号；同第5,763,192号；同第5,723,323号；同第5,766,886号；同第5,714,352号；同第6,204,023号；同第6,180,370号；同第5,693,762号；同第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,225,539号及び同第4,816,567号において記載されている方法のようであるがこれらに限定されない、任意の公知の方法を使用して実施されうる。

【0233】

ヒト化抗体は、UCH-L1に対する高アフィニティー及び他の好適な生物学的特性を保持しうる。ヒト化抗体は、親配列及びヒト化配列についての三次元モデルを使用して、親配列及び多様な概念的ヒト化産物を解析する工程により調製されうる。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能である。選択された候補免疫グロブリン配列の、可能な三次元コンフォメーション構造を例示及び提示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検討は、残基の、候補免疫グロブリン配列の機能における、鍵となる役割についての解析、すなわち、候補免疫グロブリンが、その抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基についての解析を可能とする。このようにして、UCH-L1に対するアフィニティーの上昇のような、所望の抗体特徴が、達成されるように、FR残基が、レシピエント及びインポート配列から選択され、組み合わせられうる。一般に、超可変領域残基は、直接、かつ、最も実質的に、抗原結合への影響に関与しうる。

【0234】

ヒト化に対する代替法として、ヒト抗体（本明細書において、「完全ヒト抗体」ともまた言及された）が作出されうる。例えば、PROfusion及び/又は酵母関連技術を介して、ヒト抗体を、ライブラリーから単離することが可能である。また、トランスジェニック動物（例えば、免疫化すると、内因性の免疫グロブリン産生の非存在下において、ヒト抗体の完全レパートリーを作製することが可能なマウス）を作製することも可能である。例えば、キメラマウス及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける、抗体重鎖接合領域（J_H）遺伝子のホモ接合性の欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害を結果としてもたらす。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの移入は、抗原投与時における、ヒト抗体の産生を結果としてもたらす。ヒト化抗体又は完全ヒト抗体は、それらの各々の内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第5,770,429号；同第5,833,985号；同第5,837,243号；同第5,922,845号；同第6,017,517号；同第6,096,31

1号；同第6, 111, 166号；同第6, 270, 765号；同第6, 303, 755号；同第6, 365, 116号；同第6, 410, 690号；同第6, 682, 928号及び同第6, 984, 720号において記載されている方法に従い調製されうる。

【0235】

e. 抗UCH-L1抗体

抗UCH-L1抗体は、上記された技法を使用して、並びに、当技術分野において公知である、規定の技法を使用して作出されうる。一部の実施形態において、抗UCH-L1抗体は、United State Biological (型番: 031320)、Cell Signaling Technology (型番: 3524)、Sigma-Aldrich (型番: HPA005993)、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (型番: sc-58593又はsc-58594)、R&D Systems (型番: MAB6007)、Novus Biologicals (型番: NB600-1160)、Biorbyt (型番: orb33715)、Enzo Life Sciences, Inc. (型番: ADI-905-520-1)、Bio-Rad (型番: VMA00004)、BioVision (型番: 6130-50)、Abcam (型番: ab75275又はab104938)、Invitrogen Antibodies (型番: 480012)、ThermoFisher Scientific (型番: MA1-46079、MA5-17235、MA1-90008、又はMA1-83428)、EMD Millipore (型番: MABN48)、又はSino Biological Inc. (型番: 50690-R011) から市販されているUCH-L1抗体のような非コンジュゲートUCH-L1抗体でありうる。抗UCH-L1抗体は、BioVision (型番: 6960-25) 又はAviva Systems Biology (型番: OAAF01904-FITC) から市販されている、コンジュゲートUCH-L1抗体のように、フルオロフォアへとコンジュゲートされうる。

【0236】

7. GFAPのレベルを測定するための方法

上記された方法において、GFAPレベルは、イムノアッセイ、タンパク質免疫沈降、免疫電気泳動、化学分析、SDS-PAGE及びウェスタンブロット解析若しくはタンパク質免疫染色のような抗体依存的方法、電気泳動解析、タンパク質アッセイ、競合的結合アッセイ、機能的タンパク質アッセイ又は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 若しくは液体クロマトグラフィー-質量分析 (LC/MS) のような、クロマトグラフィー法若しくは分光法のような、任意の手段により測定されうる。また、当業者に公知のフォーマットのような、臨床化学フォーマットのアッセイも利用されうる。

【0237】

一部の実施形態において、GFAPのレベルを測定するステップは、試料を、第1の特異的結合メンバー及び第2の特異的結合メンバーと接触させるステップを含む。一部の実施形態において、第1の特異的結合メンバーは、捕捉抗体であり、第2の特異的結合メンバーは、検出抗体である。一部の実施形態において、GFAPのレベルを測定するステップは、試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、(1) GFAP上又はGFAP断片上のエピトープに結合して捕捉抗体-GFAP抗原複合体 (例えば、GFAP捕捉抗体-GFAP抗原複合体) を形成する捕捉抗体 (例えば、GFAP捕捉抗体) 及び(2) 検出可能な標識を含み、捕捉抗体が結合していないGFAP上のエピトープに結合してGFAP抗原-検出抗体複合体 (例えば、GFAP抗原-GFAP検出抗体複合体) を形成する検出抗体 (例えば、GFAP検出抗体) と接触させて、捕捉抗体-GFAP抗原-検出抗体複合体 (例えば、GFAP捕捉抗体-GFAP抗原-GFAP検出抗体複合体) を形成すること並びにGFAPの、試料中量又は試料中濃度を、捕捉抗体-GFAP抗原-検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定することを含む。

【0238】

一部の実施形態において、第1の特異的結合メンバーは、固体支持体上に固定化される

。一部の実施形態において、第 2 の特異的結合メンバーは、固体支持体上に固定化される。一部の実施形態において、第 1 の特異的結合メンバーは、下記に記載される G F A P 抗体である。

【 0 2 3 9 】

一部の実施形態において、試料は、希釈される、又は希釈されない。試料は、約 1 ~ 約 2 5 マイクロリットル、約 1 ~ 約 2 4 マイクロリットル、約 1 ~ 約 2 3 マイクロリットル、約 1 ~ 約 2 2 マイクロリットル、約 1 ~ 約 2 1 マイクロリットル、約 1 ~ 約 2 0 マイクロリットル、約 1 ~ 約 1 8 マイクロリットル、約 1 ~ 約 1 7 マイクロリットル、約 1 ~ 約 1 6 マイクロリットル、約 1 5 マイクロリットル又は約 1 マイクロリットル、約 2 マイクロリットル、約 3 マイクロリットル、約 4 マイクロリットル、約 5 マイクロリットル、約 6 マイクロリットル、約 7 マイクロリットル、約 8 マイクロリットル、約 9 マイクロリットル、約 1 0 マイクロリットル、約 1 1 マイクロリットル、約 1 2 マイクロリットル、約 1 3 マイクロリットル、約 1 4 マイクロリットル、約 1 5 マイクロリットル、約 1 6 マイクロリットル、約 1 7 マイクロリットル、約 1 8 マイクロリットル、約 1 9 マイクロリットル、約 2 0 マイクロリットル、約 2 1 マイクロリットル、約 2 2 マイクロリットル、約 2 3 マイクロリットル、約 2 4 マイクロリットル又は約 2 5 マイクロリットルでありうる。一部の実施形態において、試料は、約 1 ~ 約 1 5 0 マイクロリットル若しくはこれ未満又は約 1 ~ 約 2 5 マイクロリットル若しくはこれ未満である。

10

【 0 2 4 0 】

ポイントオブケアデバイス以外の、一部の測定器（例えば、A b b o t t L a b o r a t o r i e s 製の測定器である A R C H I T E C T（登録商標）及び他のコア検査測定器など）は、G F A P の、2 5 , 0 0 0 p g / m L 以上の試料中レベルを測定することが可能でありうる。

20

【 0 2 4 1 】

他の検出法は、ナノポアデバイス又はナノウェルデバイスの使用を含む、又はこれらにおける使用に適合されうる。ナノポアデバイスの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、国際特許公開第 2 0 1 6 / 1 6 1 4 0 2 号において記載されている。ナノウェルデバイスの例については、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、国際特許公開第 2 0 1 6 / 1 6 1 4 0 0 号において記載されている。

【 0 2 4 2 】

8 . G F A P 抗体

本明細書において記載された方法は、「G F A P 抗体」と称される、グリア細胞線維性酸性タンパク質（「G F A P」）（又はこの断片）に特異的に結合する単離抗体を使用しうる。G F A P 抗体は、G F A P 状態を、外傷性脳損傷の尺度として評価する、G F A P の、試料中の存在を検出する、G F A P の、試料中に存在する量を定量するか、又は G F A P の、試料中の存在を検出し、かつ、G F A P の、試料中量を定量するのに使用されうる。

30

【 0 2 4 3 】

a . グリア細胞線維性酸性タンパク質（G F A P）

グリア細胞線維性酸性タンパク質（G F A P）とは、星状細胞の細胞骨格の部分を構成し、星状細胞由来の細胞についての、最も特異的のマーカーであることが実証されている、5 0 k D a の細胞質内線維性タンパク質である。G F A P タンパク質は、ヒトにおいて、G F A P 遺伝子によりコードされる。G F A P とは、成熟星状細胞の、主要な中間体線維である。分子中央のロッドドメインにおいて、G F A P は、他の中間体線維との、大きな構造的相同性を共有する。G F A P は、星状細胞突起へと、構造的安定性をもたらすことにより、星状細胞の運動性及び形状に関与する。グリア細胞線維性酸性タンパク質及びその分解産物（G F A P - B D P）とは、外傷性脳損傷（T B I）後において、病態生理学的応答の一部として、血液へと放出された脳特異的タンパク質である。外傷、遺伝障害又は化学物質により引き起こされたヒト C N S への損傷に続き、星状細胞は、増殖し、細胞体及び細胞突起の、多大な肥大を示し、G F A P は、顕著に上方調節される。これに対し

40

50

、星状細胞の悪性度が増大すると、進行性の、G F A P 産生の喪失が見られる。G F A P はまた、シュワン細胞、消化管グリア細胞、唾液腺新生物、転移性腎癌、喉頭蓋軟骨、下垂体細胞、未成熟希突起膠細胞、乳頭状髄膜腫及び乳腺の筋上皮細胞においても検出される。

【 0 2 4 4 】

ヒト G F A P は、以下のアミノ酸配列：

【 0 2 4 5 】

【 化 2 】

MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGGLAPGRRRLGPGTRL SLARMPPPLPTRV
DFSLAGALNAGFKETRASERAEMMELNDRFASYIEKVRFLFLEQQNKALAAELNQLRA
KEPTKLADVYQAE LRELRLRLDQLTANSARLEVERDNLAQDLATVRQKLQDET NLR
LEAENNLAAYRQEAD EATLARLDLERKIESLEEEIRFLRKIHEEEVRELQEQLARQQV
HVELDVAKPDLTAALKEIRTQYEAMASSNMHEAE EWYRSKFADLTDAARN AELL
RQAKHEANDYRRQLQSLTCDLES LRGTNESLERQMREQEERHVREAASYQEALARL
EEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEGEENRITIPVQTFSNLQIR
ETSLDTKSVSEGH LKRNIVVKTVMERDGEVIKESKQEHKDVM (配列番号 2)

10

20

を有しうる。

【 0 2 4 6 】

ヒト G F A P は、配列番号 2 の断片又は変異体でありうる。G F A P の断片は、5 ~ 400 アミノ酸の間、10 ~ 400 アミノ酸の間、50 ~ 400 アミノ酸の間、60 ~ 400 アミノ酸の間、65 ~ 400 アミノ酸の間、100 ~ 400 アミノ酸の間、150 ~ 400 アミノ酸の間、100 ~ 300 アミノ酸の間又は200 ~ 300 アミノ酸の間の長さでありうる。断片は、配列番号 2 に由来する、連続番号のアミノ酸を含みうる。配列番号 2 の、ヒト G F A P の断片又は変異体は、G F A P 分解産物 (B D P) でありうる。G F A P B D P は、38 k D a、42 k D a (薄いバンド：41 k D a)、47 k D a (薄いバンド：45 k D a)；25 k D a (薄いバンド：23 k D a)；19 k D a 又は20 k D a でありうる。

30

【 0 2 4 7 】

b . G F A P 認識抗体

抗体は、G F A P、この断片、G F A P のエピトープ又はこの変異体に結合する抗体である。抗体は、抗 G F A P 抗体の断片又はこの変異体若しくは誘導体でありうる。抗体は、ポリクローナル又はモノクローナル抗体でありうる。抗体は、キメラ抗体、単鎖抗体、アフニティー成熟抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体又は F a b 断片のような抗体断片又はこれらの混合物でありうる。抗体の断片又は誘導体は、F (a b ')₂ 断片、F v 断片又は s c F v 断片を含みうる。抗体の誘導体は、ペプチド模倣体により作製される。さらに、単鎖抗体を作製するために記載されている技法は、単鎖抗体を作製するよう

40

【 0 2 4 8 】

抗 G F A P 抗体は、キメラ抗 G F A P 又はヒト化抗 G F A P 抗体でありうる。一実施形態において、ヒト化抗体及びキメラ抗体のいずれも、一価である。一実施形態において、ヒト化抗体及びキメラ抗体のいずれも、F c 領域へと連結された、単一の F a b 領域を含む。

【 0 2 4 9 】

ヒト抗体は、ファージディスプレイ技術又はヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するトランスジェニックマウスにより導出される。ヒト抗体は、ヒトのインビボにおける免疫応答の結果として作出及び単離される。例えば、F u n a r o ら、B M C B i o t e c

50

hnology、2008(8):85を参照されたい。したがって、抗体は、ヒトの産物であることが可能であり、動物レパトリーではない場合がある。抗体は、ヒト由来であるため、自己抗原に対する反応性の危険性は、最小化されうる。代替的に、標準的な酵母ディスプレイライブラリー及び酵母ディスプレイ技術は、ヒト抗GFAP抗体を選択及び単離するのに使用されうる。例えば、ナイーブヒト単鎖可変断片(scFv)のライブラリーは、ヒト抗GFAP抗体を選択するのに使用されうる。トランスジェニック動物は、ヒト抗体を発現させるのに使用されうる。

【0250】

ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体に由来する抗体分子であって、非ヒト種に由来する、1つ以上の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する抗体分子でありうる。

10

【0251】

抗体は、それが、当技術分野において公知の抗体と異なる生物学的機能を保有するという点で、公知の抗体と識別可能である。

【0252】

(1) エピトープ

抗体は、GFAP(配列番号2)、この断片又はこの変異体に免疫特異的に結合しうる。抗体は、エピトープ領域内の、少なくとも3アミノ酸、少なくとも4アミノ酸、少なくとも5アミノ酸、少なくとも6アミノ酸、少なくとも7アミノ酸、少なくとも8アミノ酸、少なくとも9アミノ酸又は少なくとも10アミノ酸を免疫特異的に認識することが可能であり、これらに結合しうる。抗体は、エピトープ領域のうちの、少なくとも3連続アミノ酸、少なくとも4連続アミノ酸、少なくとも5連続アミノ酸、少なくとも6連続アミノ酸、少なくとも7連続アミノ酸、少なくとも8連続アミノ酸、少なくとも9連続アミノ酸又は少なくとも10連続アミノ酸を有するエピトープを免疫特異的に認識することが可能であり、これらに結合しうる。

20

【0253】

c. 抗体の調製/作製

抗体は、当業者に周知の技法を含む、様々な技法のうちのいずれかにより調製されうる。一般に、抗体は、従来の技法を介するか、又は抗体の遺伝子、重鎖及び/若しくは軽鎖の、適切な細菌細胞宿主若しくは哺乳動物細胞宿主へのトランスフェクションであって、組換えでありうる抗体の作製を可能とするためのトランスフェクションを介する、モノクローナル抗体の作出を含む細胞培養法により作製されうる。「トランスフェクション」という用語の多様な形態は、外因性DNAの、原核宿主細胞又は真核宿主細胞への導入のために一般に使用されている、多種多様な技法、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。抗体を、原核宿主細胞又は真核宿主細胞において発現させることが可能であるが、そのような真核細胞(特に、哺乳動物の細胞)は、原核細胞より、アセンブルし、適正にフォールディングされ、免疫学的に活性である抗体を分泌する可能性が高いため、抗体の、真核細胞内の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞内の発現が最も好ましい。

30

【0254】

組換え抗体を発現させるための、例示的な哺乳動物宿主細胞は、例えば、Kaufman及びSharp、J. Mol. Biol.、159:601~621(1982)において記載されているようにDHFR選択用マーカーと共に使用されるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(、Urlaub及びChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216~4220(1980)において記載されているdhfr-CHO細胞を含む)、NS0骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが、哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、抗体は、宿主細胞内の抗体の発現又は、より好ましくは、宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間にわたり、宿主細胞を培養することにより作製される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して、培養培地から回収されうる。

40

50

【 0 2 5 5 】

宿主細胞はまた、F a b 断片又はs c F v分子のような、機能的抗体断片を作製するのにも使用されうる。上記の手順に対する変動は、実施されうることを理解される。例えば、宿主細胞に、抗体の軽鎖及び／又は重鎖の機能的断片をコードするDNAをトランスフェクトすることが所望されうる。組換えDNA技術はまた、目的の抗原への結合に必要なでない軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードするDNAの一部又は全部を除去するのにも使用されうる。また、このような切断型DNA分子から発現された分子も、抗体に包含される。加えて、1つの重鎖及び1つの軽鎖が、抗体（すなわち、ヒトGFAPに結合する抗体）であり、他の重鎖及び軽鎖が、ヒトGFAP以外の抗原に特異的である、二官能性抗体も、抗体を、標準的な化学的架橋法を介して、第2の抗体へと架橋することにより作製されうる。

10

【 0 2 5 6 】

抗体又はこの抗原結合性部分を組換え発現させるための好ましい系において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介型トランスフェクションにより、d h f r - C H O細胞へと導入される。組換え発現ベクター内において、高レベルの遺伝子の転写を駆動するように、抗体重鎖遺伝子及び抗体軽鎖遺伝子の各々が、C M Vエンハンサー／A d M L Pプロモーター調節エレメントへと作動的に連結される。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサートによる選択／増幅を使用するベクターをトランスフェクトされたC H O細胞の選択を可能とするD H F R遺伝子も保有する。抗体の重鎖及び軽鎖の発現を可能とするように、選択された形質転換体の宿主細胞が培養され、無傷抗体が培養培地から回収される。組換え発現ベクターを調製し、宿主細胞にトランスフェクトし、形質転換体について選択し、宿主細胞を培養し、抗体を培養培地から回収するのに、標準的な分子生物学法が使用される。なおさらに、組換え抗体を合成する方法は、組換え抗体が合成されるまで、宿主細胞を、適切な培養培地中において培養することによる方法でありうる。本方法は、組換え抗体を、培養培地から単離するステップをさらに含む。

20

【 0 2 5 7 】

モノクローナル抗体を調製する方法は、所望の特異性を有する抗体を作製することが可能な不死細胞株の調製を伴う。このような細胞株は、免疫化された動物から得られた脾臓細胞作製からされうる。動物は、GFAP又はこの断片及び／若しくは変異体により免疫化されうる。動物を免疫化するのに使用されるペプチドは、ヒトFc、例えば、ヒト抗体のFc (f r a g m e n t c r y s t a l l i z a b l e) 領域又はテール領域をコードするアミノ酸を含みうる。次いで、脾臓細胞が、例えば、骨髓腫細胞融合パートナーとの融合により免疫化される。様々な融合法が利用されうる。例えば、脾臓細胞及び骨髓腫細胞が、非イオン性界面活性剤と、数分間にわたり組み合わせられ、次いで、低密度において、ハイブリッド細胞の増殖を支援するが、骨髓腫細胞の増殖を支援しない、選択培地上に播種される。このような一技法は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン (H A T) 選択を使用する。別の技法は、電気融合を含む。十分な時間、通例、約1～2週間の後、ハイブリッド体のコロニーが観察される。単一のコロニーが選択され、それらの培養物上清は、ポリペプチドに対する結合活性について調べられる。高度な反応性及び特異性を有するハイブリドーマが使用されうる。

30

40

【 0 2 5 8 】

モノクローナル抗体は、増殖するハイブリドーマコロニーの上清から単離されうる。加えて、収率を増強するように、ハイブリドーマ細胞株の、マウスのような、適切な脊椎動物宿主の腹腔への注射のような、多様な技法が利用されうる。次いで、モノクローナル抗体は、腹水又は血液から採取されうる。夾雑物は、クロマトグラフィー、ゲル濾過、沈殿及び抽出のような、従来の技法により、抗体から除去されうる。アフィニティークロマトグラフィーは、抗体を精製する工程において使用されうる方法の例である。

【 0 2 5 9 】

タンパク質分解酵素であるパパインは、I g G分子を優先的にいくつかの断片に切断し

50

て、これらのうちの2つ(F(ab)断片)の各々が、無傷の抗原結合部位を含む、共有結合的ヘテロ二量体を含む断片をもたらす。酵素であるペプシンは、IgG分子を切断して、両方の抗原結合性部位を含む、F(ab')₂断片を含む、いくつかの断片をもたらすことが可能である。

【0260】

Fv断片は、IgMの、優先的なタンパク質分解性切断により作製されうるが、まれな場合に、IgG免疫グロブリン分子又はIgA免疫グロブリン分子の優先的なタンパク質分解性切断によっても作製されうる。Fv断片は、組換え法を使用して導出されうる。Fv断片は、天然抗体分子の抗原認識能及び抗原結合能の大半を保持する抗原結合性部位を含む、非共有結合的VH::VLヘテロ二量体を含む。

10

【0261】

抗体、抗体断片又は誘導体は、それぞれ、CDRに対する支持をもたらし、CDRの、互いに対する空間的關係を規定する、重鎖及び軽鎖のフレームワーク(「FR」)のセットの間に挿入された、重鎖及び軽鎖の相補性決定領域(「CDR」)のセットを含みうる。CDRのセットは、重鎖V領域又は軽鎖V領域からなる、3つの超可変領域を含有しうる。

【0262】

必須の特異性を有する抗体を作製又は単離する、他の適する方法であって、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば、Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK)、MorphoSys (Martinsried/Planegg, Del.), Biovation (Aberdeen, Scotland, UK)、BioInvent (Lund, Sweden)のような、多様な市販品の販売元から市販されているペプチドライブラリー又はタンパク質ライブラリー(例えば、バクテリオファージライブラリー、リボソームライブラリー、オリゴヌクレオチドライブラリー、RNAライブラリー、cDNAライブラリー、酵母ライブラリーなどのディスプレイライブラリーであるがこれらに限定されない)から組換え抗体を選択する方法を含むがこれらに限定されない方法が使用されうる。米国特許第4,704,692号;同第5,723,323号;同第5,763,192号;同第5,814,476号;同第5,817,483号;同第5,824,514号;同第5,976,862号を参照されたい。代替的な方法は、ヒト抗体のレパートリーを作製することが可能な、トランスジェニック動物の免疫化(例えば、SCIDマウス、Nguyenら(1997)、Microbiol. Immunol., 41:901~907; Sandhuら(1996)、Crit. Rev. Biotechnol., 16:95~118; Erenら(1998)、Immunol., 93:154~161)であって、当技術分野において公知であり、かつ/又は本明細書において記載された、トランスジェニック動物の免疫化に依拠する。このような技法は、リボソームディスプレイ(Hanesら(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:4937~4942; Hanesら(1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:14130~14135);単一細胞による抗体作製技術(例えば、選択リンパ球抗体法(「SLAM」)(米国特許第5,627,052号、Wenら(1987))J. Immunol., 17:887~892; Babcookら(1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:7843~7848);ゲル微小液滴及びフローサイトメトリー(Powellら(1990)、Biotechnol., 8:333-337; One Cell Systems, Inc. (Cambridge, Mass.); Grayら(1995)、J. Imm. Meth., 182:155~163; Kennyら(1995)、Bio/Technol., 13:787~790);B細胞の選択(Steenbakkersら(1994)、Molec. Biol. Reports, 19:125~134(1994))を含むがこれらに限定されない。

20

30

40

【0263】

アフィニティー成熟抗体は、当技術分野において公知である、多数の手順のうちのいず

50

れか1つにより作製されうる。例えば、Marksら、BioTechnology、10:779~783(1992)は、VHとVLとのドメインシャッフリングによるアフィニティー成熟について記載している。CDR残基及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発については、Barbasら、Proc.Nat.Acad.Sci.USA、91:3809~3813(1994); Schierら、Gene、169:147~155(1995); Yeltonら、J.Immunol.、155:1994~2004(1995); Jacksonら、J.Immunol.、154(7):3310~3319(1995); Hawkinsら、J.Mol.Biol.、226:889~896(1992)により記載されている。選択的突然変異誘発位置及び活性増強アミノ酸残基を伴う接触位置又は超変異位置における選択的突然変異については、米国特許第6,914,128B1号において記載されている。

10

【0264】

抗体の変異体はまた、抗体をコードするポリヌクレオチドを、トランスジェニック動物又はこのような抗体をそれらのミルク中に産生するヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどの哺乳動物をもたらすのに適する宿主へと送達することを使用しても調製されうる。これらの方法は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許第5,827,690号;同第5,849,992号;同第4,873,316号;同第5,849,992号;同第5,994,616号;同第5,565,362号及び同第5,304,489号において記載されている。

【0265】

20

抗体の変異体はまた、このような抗体、指定された部分又は変異体を、植物の部分又はこれらから培養された細胞において産生する、トランスジェニック植物及び培養植物細胞(例えば、タバコ、トウモロコシ、及びウキクサであるがこれらに限定されない)をもたらすように、ポリヌクレオチドを送達することによっても調製されうる。例えば、Cramerら(1999)、Curr.Top.Microbiol.Immunol.、240:95~118及びこの文献において引用された参考文献は、例えば、誘導性プロモーターを使用する、大量の組換えタンパク質を発現するトランスジェニックのタバコ葉の産生について記載している。トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系において産生された、又は天然の供給源から精製された哺乳動物タンパク質と同等の生物学的活性を伴う哺乳動物タンパク質を、市販品生産のレベルにおいて発現させるのに使用されている。例えば、Hoodら、Adv.Exp.Med.Biol.(1999)、464:127~147及びこの文献において引用された参考文献を参照されたい。抗体の変異体はまた、単鎖抗体(s c F v)のような抗体断片を含むトランスジェニック植物の種子であって、タバコの種子及びパレイショの塊茎を含む種子からも大量に作製されている。例えば、Conradら(1998)、Plant Mol.Biol.、38:101~109及びこの文献において引用された参考文献を参照されたい。したがって、抗体はまた、公知の方法に従いトランスジェニック植物を使用しても作製されうる。

30

【0266】

抗体の誘導体は、例えば、外因性配列を付加して、免疫原性を修飾するか、又は結合、アフィニティー、オン速度、オフ速度、アビディティー、特異性、半減期若しくは他の任意の適切な特徴を低減、増強若しくは修飾することにより作製されうる。一般に、可変領域及び定常領域の非ヒト配列を、ヒトアミノ酸又は他のアミノ酸により置換しながら、非ヒトCDR配列又はヒトCDR配列のうちの一部又は全部は維持される。

40

【0267】

小型の抗体断片は、2つの抗原結合性部位を有するダイアボディーであって、断片が、同じポリペプチド鎖において、軽鎖可変ドメイン(VL)へと接続された重鎖可変ドメイン(VH)(VH-VL)を含む、ダイアボディーでありうる。例えば、EP404,097;WO93/1161及びHollingerら(1993)、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:6444~6448を参照されたい。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能とするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメイ

50

ンは、別の鎖の相補性ドメインと対合し、2つの抗原結合性部位を創出するように強いられる。また、参照によりその全体において本明細書に組み込まれ、かつ、1つ以上のアミノ酸が、親抗体の超可変領域内へと挿入され、標的抗原に対する結合アフィニティーが、この抗原に対する親抗体の結合アフィニティーの少なくとも約2倍強い抗体変異体についても開示する、Chenらによる、米国特許第6,632,926号も参照されたい。

【0268】

抗体は、直鎖状抗体でありうる。当技術分野において、直鎖状抗体を作るための手順が公知であり、Zapataら(1995)、Protein Eng., 8(10): 1057~1062において記載されている。略述すると、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成する、タンデムのFdセグメント(VH-CH1-VH-CH1)の対を含む。

10

【0269】

抗体は、プロテインA精製、硫酸アンモニウム沈殿又はエタノール沈殿、酸抽出、アニオン交換クロマトグラフィー又はカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー及びレクチンクロマトグラフィーを含むがこれらに限定されない、公知の方法により、組換え細胞培養物から回収及び精製されうる。高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)もまた、精製のために使用されうる。

【0270】

抗体を検出可能に標識することは、有用でありうる。抗体を、これらの薬剤へとコンジュゲートさせるための方法は、当技術分野において公知である。例示だけを目的として述べると、抗体は、放射性原子、発色団、フルオロフォアなどのような検出可能部分により標識されうる。このような標識抗体は、インビボにおける、又は単離された被験試料中の診断法のために使用されうる。このような標識抗体は、サイトカイン、リガンド、別の抗体へと連結されうる。抗腫瘍効果を達成するための、抗体へのカップリングに適する薬剤は、インターロイキン2(IL-2)及び腫瘍壊死因子(TNF)のようなサイトカイン；光力学療法における使用のための光増感剤であって、アルミニウム(III)フタロシアニンテトラスルホン酸、ヘマトポルフィリン及びフタロシアニンを含む光増感剤；ヨウ素131(131I)、イットリウム90(90Y)、ピスマス212(212Bi)、ピスマス213(213Bi)、テクネシウム99m(99mTc)、レニウム186(186Re)及びレニウム188(188Re)のような放射性核種；ドキソルビシン、アドリアマイシン、ダウノルビシン、メトトレキサート、ダウノマイシン、ネオカルチノスタチン及びカルボプラチンのような抗生剤；ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素A、ブドウ球菌エンテロトキシンA、アブリンA毒素、リシンA(脱グリコシル化リシンA及び天然リシンA)、TGF-アルファ毒素、タイワンコブラに由来する細胞毒素(ナジャ・ナジャ・アトラ)及びゲロニン(植物毒素)のような、細菌毒素、植物毒素及び他の毒素；レストリクトシン(アスペルギルス・レストリクツスにより産生されたりボソーム不活化タンパク質)、サポリン(サポナリア・オフィキナリスに由来するリボソーム不活化タンパク質)及びRNアーゼのような、植物、細菌及び真菌に由来する、リボソーム不活化タンパク質；チロシンキナーゼ阻害剤；ly207702(ニフッ素化プリンヌクレオシド)；抗細胞剤を含有するリボソーム(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、毒素をコードするプラスミド、メトトレキサートなど)並びに他の抗体又はF(ab)のような抗体断片を含む。

20

30

40

【0271】

ハイブリドーマ技術、選択リンパ球抗体法(SLAM)、トランスジェニック動物及び組換え抗体ライブラリーの使用を介する抗体の作製については、下記において、より詳細に記載される。

【0272】

(1) ハイブリドーマ技術を使用する、抗GFAPモノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、当技術分野において公知の、多種多様な技法であって、ハイブ

50

リドーマ、組換え及びファージディスプレイ技術又はこれらの組合せの使用を含む技法を使用して調製されうる。例えば、モノクローナル抗体は、当技術分野において公知であり、例えば、Harlowら、「Antibodies: A Laboratory Manual」、2版(Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、1988); Hammerlingら、「Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas」(Elsevier、N.Y.、1981)において教示されているハイブリドーマ法を含むハイブリドーマ法を使用して作製されうる。また、本明細書において使用された「モノクローナル抗体」という用語は、ハイブリドーマ技術を介して作製された抗体に限定されないことも留意される。「モノクローナル抗体」という用語は、任意の真核生物クローン、原核生物クローン又はファージクローンを含む、単一クローンに由来する抗体を指し、それが作製された方法を指すものではない。

10

【0273】

本方法により作製されるモノクローナル抗体並びに抗体を作出する方法は、本発明の抗体を分泌するハイブリドーマ細胞を培養するステップを含みうるが、この場合、ハイブリドーマは、GFAPにより免疫化された動物、例えば、ラット又はマウスから単離された脾臓細胞を、骨髄腫細胞と融合させ、次いで、融合体から生じるハイブリドーマを、本発明のポリペプチドに結合することが可能な抗体を分泌するハイブリドーマクローンについてスクリーニングすることにより作出されることが好ましい。略述すると、ラットは、GFAP抗原により免疫化されうる。好ましい実施形態において、GFAP抗原は、免疫応答を刺激するように、アジュバントと共に投与される。このようなアジュバントは、フロイント完全アジュバント又はフロイント不完全アジュバント、RIBI(ムラミルジペプチド)又はISCOM(免疫刺激性複合体)を含む。このようなアジュバントは、ポリペプチドを、局所的な沈着物内に封入することにより、急速な分散から保護しうる、又はこのようなアジュバントは、マクロファージ及び免疫系の他の構成要素に対して走化性である因子を分泌するように、宿主を刺激する物質を含有しうる。ポリペプチドが投与される場合、免疫化スケジュールは、何週間かにわたる、2回以上のポリペプチドの投与を伴うことが好ましいが、ポリペプチドの単回投与もまた、使用されうる。

20

【0274】

GFAP抗原による動物の免疫化の後、抗体及び/又は抗体産生細胞が、動物から得られうる。抗GFAP抗体含有血清は、動物から採血するか、又は動物を殺することにより、動物から得られる。血清は、動物から得られたままに使用されうる、免疫グロブリン画分は、血清から得られうる、又は抗GFAP抗体は、血清から精製されうる。このようにして得られた血清又は免疫グロブリンは、ポリクローナルであるので、一連の異種特性を有する。

30

【0275】

免疫応答が検出された場合、例えば、ラット血清中において、抗原であるGFAPに特異的な抗体が検出された場合、ラット脾臓が摘出され、脾臓細胞が単離される。次いで、脾臓細胞が、周知の技法により、任意の適切な骨髄腫細胞、例えば、American Type Culture Collection(ATCC、Manassas、Va.、US)から市販されている細胞株である、SP20に由来する細胞へと融合される。ハイブリドーマが選択され、限界希釈によりクローニングされる。次いで、ハイブリドーマクローンが、当技術分野において公知の方法により、GFAPに結合することが可能な抗体を分泌する細胞についてアッセイされる。ラットを、陽性のハイブリドーマクローンにより免疫化することにより、一般に、高レベルの抗体を含有する腹水が作出されうる。

40

【0276】

別の実施形態において、抗体を産生する免疫化ハイブリドーマが、免疫化された動物から調製されうる。免疫化の後、動物は、殺され、当技術分野において周知の通り、脾臓B細胞は、免疫化された骨髄腫細胞へと融合される。例えば、Harlow及びLane、前出を参照されたい。好ましい実施形態において、骨髄腫細胞は、免疫グロブリンポリ

50

ペプチドを分泌しない（非分泌性細胞株）。融合及び抗生剤による選択の後、ハイブリドーマは、G F A P若しくはこの部分又はG F A Pを発現する細胞を使用してスクリーニングされる。好ましい実施形態において、初期スクリーニングは、酵素免疫測定アッセイ（E L I S A）又はラジオイムノアッセイ（R I A）、好ましくはE L I S Aを使用して実施される。E L I S Aスクリーニングの例は、P C T公開第00/37504号において提示されている。

【0277】

抗G F A P抗体を産生するハイブリドーマは、ロバストなハイブリドーマの増殖、高度な抗体の産生及び所望の抗体特徴を含む、所望の特徴について選択され、クローニングされ、さらにスクリーニングされる。ハイブリドーマは、インビボの同系動物、免疫系を欠く動物、例えば、ヌードマウスにおいて、又はインビトロの細胞培養物中において培養され、拡大されうる。ハイブリドーマを選択し、クローニングし、拡大する方法は、当業者に周知である。

【0278】

好ましい実施形態において、ハイブリドーマは、ラットハイブリドーマである。別の実施形態において、ハイブリドーマは、マウス、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ又はウマのような、ヒト以外でラット以外の種において作製される。さらに別の好ましい実施形態において、ハイブリドーマは、ヒト非分泌性骨髄腫が、抗G F A P抗体を発現するヒト細胞と融合されたヒトハイブリドーマである。

【0279】

特異的エピトープを認識する抗体断片は、公知の技法により作出されうる。例えば、本発明のF a b断片及びF (a b ')₂断片は、パパイン（2つの同一なF a b断片をもたらす）又はペプシン（F (a b ')₂断片をもたらす）のような酵素を使用する、免疫グロブリン分子のタンパク質分解性切断により作製されうる。I g G分子のF (a b ')₂断片は、大型の（「親」）I g G分子の、2つの抗原結合性部位であって、親I g G分子の、両方の軽鎖（軽鎖可変領域及び軽鎖定常領域を含有する）、重鎖のC H 1ドメイン及びジスルフィド形成ヒンジ領域を含む、抗原結合性部位を保持する。したがって、F (a b ')₂断片は、親I g G分子と同様に、抗原分子を架橋することが可能である。

【0280】

（2）S L A Mを使用する、抗G F A Pモノクローナル抗体

本発明の別の態様において、組換え抗体は、米国特許第5,627,052号；P C T公開第92/02551号及びB a b c o o kら、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A、93:7843~7848（1996）において記載されている通り、当技術分野において、選択リンパ球抗体法（S L A M）と称される手順を使用して、単一の単離リンパ球から作出される。この方法において、ビオチンのようなリンカーを使用して、抗原であるG F A P、G F A Pのサブユニット又はこの断片が、ヒツジ赤血球へとカップリングされ、G F A Pに対する特異性を伴う抗体を分泌する単一細胞を同定するのに使用される、抗原特異的溶血プラーカアッセイを使用して、目的の抗体を分泌する、単一の細胞、例えば、免疫化された動物のうちのいずれか1つに由来するリンパ球がスクリーニングされる。目的の抗体分泌細胞を同定した後、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のc D N Aが、逆転写酵素P C R（R T - P C R）により、細胞からレスキューされ、次いで、これらの可変領域が、C O S細胞又はC H O細胞のような、哺乳動物宿主細胞内の、適切な免疫グロブリン定常領域（例えば、ヒト定常領域）の文脈において発現される。次いで、インビボにおいて選択されたリンパ球に由来する、増幅された免疫グロブリン配列をトランスフェクトされた宿主細胞は、例えば、G F A Pに対する抗体を発現する細胞を単離するように、トランスフェクト細胞をパニングすることにより、インビトロにおいて、さらなる解析及び選択を経る場合がある。増幅された免疫グロブリン配列は、インビトロアフィニティー成熟法によるように、インビトロにおいて、さらに操作されうる。例えば、P C T公開第97/29131号及びP C T公開第00/56772号を参照されたい。

【0281】

(3) トランスジェニック動物を使用する、抗GFAPモノクローナル抗体

本発明の別の実施形態において、抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の一部又は全部を含む非ヒト動物を、GFAP抗原により免疫化することにより作製される。ある実施形態において、非ヒト動物は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の大型断片を含み、マウス抗体の産生が欠損する操作マウス株である、XENOMOUSE（登録商標）トランスジェニックマウスである。例えば、Greenら、Nature Genetics、7:13~21(1994)並びに米国特許第5,916,771号；同第5,939,598号；同第5,985,615号；同第5,998,209号；同第6,075,181号；同第6,091,001号；同第6,114,598号及び同第6,130,364号を参照されたい。また、PCT公開第91/10741号；PCT公開第94/02602号；PCT公開第96/34096号；PCT公開第96/33735号；PCT公開第98/16654号；PCT公開第98/24893号；PCT公開第98/50433号；PCT公開第99/45031号；PCT公開第99/53049号；PCT公開第00/09560号及びPCT公開第00/37504号も参照されたい。XENOMOUSE（登録商標）トランスジェニックマウスは、完全ヒト抗体の成人様ヒトレパートリーを産生し、抗原特異的ヒトモノクローナル抗体を発生させる。XENOMOUSE（登録商標）トランスジェニックマウスは、ヒト重鎖遺伝子座及びx軽鎖遺伝子座の、メガ塩基サイズの、生殖細胞系列構成のYAC断片を導入することにより、ヒト抗体レパートリーのうちの約80%を含有する。開示が参照により組み込まれた、Mendezら、Nature Genetics、15:146~156(1997)；Green及びJakobovits、J. Exp. Med.、188:483~495(1998)を参照されたい。

【0282】

(4) 組換え抗体ライブラリーを使用する、抗GFAPモノクローナル抗体

インビトロ法もまた、本発明の抗体を作るのに使用されうる場合があり、この場合、所望のGFAP結合特異性を有する抗体を同定するのに、抗体ライブラリーがスクリーニングされる。組換え抗体ライブラリーの、このようなスクリーニングのための方法は、当技術分野において周知であり、例えば、各々の内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第5,223,409号(Ladnerら)；PCT公開第92/18619号(Kangら)；PCT公開第91/17271号(Dowerら)；PCT公開第92/20791号(Winterら)；PCT公開第92/15679号(Marklandら)；PCT公開第93/01288号(Breitlingら)；PCT公開第92/01047号(McCaffertyら)；PCT公開第92/09690号(Garrardら)；Fuchsら、Bio/Technology、9:1369~1372(1991)；Hayら、Hum. Antibod. Hybridomas、3:81~85(1992)；Huseら、Science、246:1275~1281(1989)；McCaffertyら、Nature、348:552~554(1990)；Griffithsら、EMBOJ.、12:725~734(1993)；Hawkinsら、J. Mol. Biol.、226:889~896(1992)；Clacksonら、Nature、352:624~628(1991)；Gramら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:3576~3580(1992)；Garrardら、Bio/Technology、9:1373~1377(1991)；Hoogenboomら、Nucl. Acids Res.、19:4133~4137(1991)；Barbasら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:7978~7982(1991)；米国特許出願公開第2003/0186374号及びPCT公開第97/29131号において記載されている方法を含む。

【0283】

組換え抗体ライブラリーは、GFAP又はGFAPの部分により免疫化された対象に由来しうる。代替的に、組換え抗体ライブラリーは、ヒトGFAPにより免疫化されていないヒト対象に由来する、ヒト抗体ライブラリーのように、ナイーブ対象、すなわち、GF

10

20

30

40

50

A Pにより免疫化されていない対象に由来しうる。本発明の抗体は、ヒトG F A Pを含むペプチドを伴う組換え抗体ライブラリーをスクリーニングして、これにより、G F A Pを認識する抗体を選択することにより選択される。このようなスクリーニング及び選択を行うための方法は、前出の段落内の参考文献において記載されている方法のように、当技術分野において周知である。G F A Pに対して、特定の結合アフィニティーを有する、本発明の抗体であって、ヒトG F A Pから、特定のK_{off}速度定数により解離する抗体のような抗体を選択するために、所望のK_{off}速度定数を有する抗体を選択するように、当技術分野において公知の表面プラズモン共鳴法が使用されうる。h G F A Pに対する、特定の中和活性を有する、本発明の抗体であって、特定のI C₅₀を伴う抗体のような抗体を選択するために、G F A P活性の阻害を評価するための、当技術分野において公知の標準的方法が使用されうる。

10

【0284】

一態様において、本発明は、ヒトG F A Pに結合する、単離抗体又はこの抗原結合性部分に関する。好ましくは、抗体は、中和抗体である。多様な実施形態において、抗体は、組換え抗体又はモノクローナル抗体である。

【0285】

例えば、抗体はまた、当技術分野において公知である、多様なファージディスプレイ法を使用しても作出されうる。ファージディスプレイ法において、機能的な抗体ドメインは、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示される。このようなファージは、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー（例えば、ヒト又はマウスの）から発現された、抗原結合性ドメインを提示するのに用いられうる。目的の抗原に結合する抗原結合性ドメインを発現するファージは、抗原により、例えば、標識抗原又は固体表面若しくはビーズに結合された、若しくはこれらへと捕捉された抗原を使用して選択又は同定されうる。これらの方法において使用されたファージは典型的に、ファージから発現されたf d結合性ドメイン及びM13結合性ドメインを、組換えにより、ファージ遺伝子IIITアンパク質又はファージ遺伝子VIITアンパク質へと融合させたF a b抗体ドメイン、F v抗体ドメイン又はジスルフィド安定化F v抗体ドメインと共に含む繊維状ファージである。抗体を作るのに使用されうるファージディスプレイ法の例は、Brinkmannら、J. Immunol. Methods、182: 41~50 (1995); Amesら、J. Immunol. Methods、184: 177~186 (1995); Kettleboroughら、Eur. J. Immunol.、24: 952~958 (1994); Persicら、Gene、187: 9~18 (1997); Burtonら、Advances in Immunology、57: 191~280 (1994); PCT公開第92/01047号; PCT公開第90/02809号; PCT公開第91/10737号; PCT公開第92/01047号; PCT公開第92/18619号; PCT公開第93/11236号; PCT公開第95/15982号; PCT公開第95/20401号並びに米国特許第5,698,426号; 同第5,223,409号; 同第5,403,484号; 同第5,580,717号; 同第5,427,908号; 同第5,750,753号; 同第5,821,047号; 同第5,571,698号; 同第5,427,908号; 同第5,516,637号; 同第5,780,225号; 同第5,658,727号; 同第5,733,743号及び同第5,969,108号において開示されているファージディスプレイ法を含む。

20

30

40

【0286】

上記の参考文献において記載された通り、ファージ選択の後、ファージに由来する抗体のコード領域は、単離され、ヒト抗体を含む全抗体又は他の任意の所望の抗原結合性断片を作出するのに使用され、例えば、下記において詳細に記載される通り、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む、任意の所望の宿主内において発現されうる。PCT公開第92/22324号; Mullinaxら、BioTechniques、12(6): 864~869 (1992); Sawaiら、Am. J. Reprod. Immunol.、34: 26~34 (1995)及びBetterら、Science、

50

240:1041~1043(1988)において開示されている方法のような、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば、Fab断片、Fab'断片及びF(ab')₂断片を組換えにより作製する技法もまた利用されうる。単鎖Fv及び抗体を作製するのに使用されうる技法の例は、米国特許第4,946,778号及び同第5,258,498号;Hustonら、Methods in Enzymology、203:46~88(1991);Shuら、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、90:7995~7999(1993)及びSkerreraら、Science、240:1038~1041(1988)において記載されている技法を含む。

【0287】

ファージディスプレイによる組換え抗体ライブラリーのスクリーニングに対する代替法である、大型のコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための、当技術分野において公知である、他の方法も、本発明の抗体の同定へと適用されうる。代替的発現系の1つの種類は、組換え抗体ライブラリーが、RNA-タンパク質融合体として発現された発現系であって、PCT公開第98/31700号(Szostak及びRobertson)並びにRobertson及びSzostak、Proc.Natl.Acad.Sci.USA、94:12297~12302(1997)において記載されている発現系である。3'末端において、ペプチジルアクセプター抗生剤であるピューロマイシンを保有する、合成mRNAのインビトロ翻訳により、この系の、mRNAと、mRNAがコードする、ペプチド又はタンパク質との間において、共有結合的融合が創出される。したがって、特異的mRNAは、抗体又はその部分の、二重特異性抗原への結合のような、コードされたペプチド又はタンパク質、例えば、抗体又はその部分の特性に基づき、mRNAの複合体混合物(例えば、コンビナトリアルライブラリー)から濃縮されうる。このようなライブラリーのスクリーニングから回収された、抗体又はこの部分をコードする核酸配列は、上記された(例えば、哺乳動物の宿主細胞内の)組換え手段により発現され、さらに、突然変異が、当初選択された配列へと導入された、mRNA-ペプチド融合体のスクリーニングのさらなるラウンドにより、又は上記された、インビトロにおける、組換え抗体のアフィニティー成熟のための他の方法により、さらなるアフィニティー成熟にかけられうる。この方法論の好ましい例は、PROFUSIONディスプレイ技術である。

【0288】

別の手法において、抗体はまた、当技術分野において公知の酵母ディスプレイ法を使用して作出されうる。酵母ディスプレイ法において、抗体ドメインを、酵母細胞壁へとテザリングし、それらを、酵母の表面上に提示するのに、遺伝子法が使用される。特に、このような酵母は、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒト又はマウスの)から発現された抗原結合性ドメインを提示するのに用いられうる。抗体を作るのに使用されうる、酵母ディスプレイ法の例は、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第6,699,658号(Witttrupら)において開示された酵母ディスプレイ法を含む。

【0289】

d. 組換えGFAP抗体の作製

抗体は、当技術分野において公知である、多数の技法のうちのいずれかにより作製されうる。例えば、重鎖及び軽鎖をコードする発現ベクターが、標準的技法により、宿主細胞へとトランスフェクトされた、宿主細胞からの発現である。「トランスフェクション」という用語の多様な形態は、外因性DNAの、原核宿主細胞又は真核宿主細胞への導入のために一般に使用されている、多種多様な技法、例えば、電気穿孔、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。本発明の抗体を、原核宿主細胞又は真核宿主細胞において発現させることが可能であるが、そのような真核細胞(特に、哺乳動物の細胞)は、原核細胞より、アセンブルし、適正にフォールディングされ、免疫学的に活性である抗体を分泌する可能性が高いため、抗体の、真核細胞内の発現が好ましく、哺乳動物宿主細胞内の発現が最も好ましい。

【0290】

本発明の組換え抗体を発現させるための、例示的な哺乳動物宿主細胞は、例えば、Kaufman及びSharp、J. Mol. Biol.、159:601~621(1982)において記載されているようにDHFR選択用マーカーと共に使用されるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞(Urlaub及びChasin、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、77:4216~4220(1980)において記載されているdhfr-CHO細胞を含む)、NS0骨髓腫細胞、COS細胞及びSP2細胞を含む。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが、哺乳動物宿主細胞へと導入される場合、抗体は、宿主細胞内の抗体の発現又は、より好ましくは、宿主細胞が増殖される培養培地への抗体の分泌を可能とするのに十分な時間にわたり、宿主細胞を培養することにより作製される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を使用して、培養培地から回収される。

10

【0291】

宿主細胞はまた、Fab断片又はscFv分子のような、機能的抗体断片を作製するのにも使用されうる。上記の手順に対する変動は、実施されることが理解される。例えば、宿主細胞に、本発明の抗体の軽鎖及び/又は重鎖の機能的断片をコードするDNAをトランスフェクトすることが所望されうる。組換えDNA技術はまた、目的の抗原への結合に必要なでない軽鎖及び重鎖の一方又は両方をコードするDNAの一部又は全部を除去するのにも使用されうる。また、このような切断型DNA分子から発現された分子も、本発明の抗体に包含される。加えて、1つの重鎖及び1つの軽鎖が、本発明の抗体(すなわち、ヒトGFAPに結合する抗体)であり、他の重鎖及び軽鎖が、ヒトGFAP以外の抗原に

20

【0292】

本発明の抗体又はこの抗原結合性部分を組換え発現させるための好ましい系において、抗体重鎖及び抗体軽鎖の両方をコードする組換え発現ベクターが、リン酸カルシウム媒介型トランスフェクションにより、dhfr-CHO細胞へと導入される。組換え発現ベクター内において、高レベルの遺伝子の転写を駆動するように、抗体重鎖遺伝子及び抗体軽鎖遺伝子の各々が、CMVエンハンサー/AdMLPプロモーター調節エレメントへと作動的に連結される。組換え発現ベクターはまた、メトトレキサートによる選択/増幅を使用するベクターをトランスフェクトされたCHO細胞の選択を可能とするDHFR遺伝子

30

【0293】

(1) ヒト化抗体

ヒト化抗体は、目的の抗原に免疫特異的に結合し、ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有するフレームワーク(FR)領域及び非ヒト抗体のアミノ酸配列を実質的に有する相補性決定領域(CDR)を含む、抗体又はこの変異体、誘導体、類似体若しくは部分でありうる。ヒト化抗体は、所望の抗原に結合する非ヒト種抗体であって、非ヒト種に由来する、1つ以上の相補性決定領域(CDR)及びヒト免疫グロブリン分子に由来するフレームワーク領域を有する非ヒト種抗体に由来しうる。

40

【0294】

本明細書において使用された、CDRの文脈における「実質的に」という用語は、非ヒト抗体CDRのアミノ酸配列と、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%同一なアミノ酸配列を有するCDRを指す。ヒト化抗体は、少なくとも1つであるが、典型的に2つの可変ドメイン(Fab、Fab'、F(ab')₂)、F

50

a b C、F v)であって、C D R領域の全て又は実質的に全てが、非ヒト免疫グロブリン(すなわち、ドナー抗体)のC D R領域に対応し、フレームワーク領域の全て又は実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のフレームワーク領域である可変ドメインの実質的に全てを含む。一態様に従い、ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域(F c)、典型的に、ヒト免疫グロブリンのF c領域の少なくとも一部も含む。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖、及び重鎖の少なくとも可変ドメインの両方を含有する。抗体はまた、重鎖の、C H 1領域、ヒンジ領域、C H 2領域、C H 3領域及びC H 4領域も含みうる。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化軽鎖だけを含有する。一部の実施形態において、ヒト化抗体は、ヒト化重鎖だけを含有する。具体的な実施形態において、ヒト化抗体は、軽鎖及び/又は重鎖のヒト化可変ドメインだけを含有する。

10

【0295】

ヒト化抗体は、I g M、I g G、I g D、I g A及びI g Eを含む、免疫グロブリンの任意のクラス並びに、限定なしに述べると、I g G 1、I g G 2、I g G 3及びI g G 4を含む、任意のアイソタイプから選択されうる。ヒト化抗体は、1つを超えるクラス又はアイソタイプに由来する配列を含むことが可能であり、特定の定常ドメインは、当技術分野において周知の技法を使用して、所望のエフェクター機能を最適化するように選択されうる。

【0296】

ヒト化抗体のフレームワーク領域及びC D Rは、親配列に正確に対応する必要がない、例えば、ドナー抗体C D R又はコンセンサスフレームワークは、この部位におけるC D R残基又はフレームワーク残基が、ドナー抗体又はコンセンサスフレームワークに対応しないように、少なくとも1つのアミノ酸残基の置換、挿入及び/又は欠失により突然変異誘発されうる。しかし、一実施形態において、このような突然変異は、広範にわたる突然変異ではない。通例、ヒト化抗体残基のうちの、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%又は少なくとも99%は、親のF R配列及びC D R配列の残基に対応する。本明細書において使用された「コンセンサスフレームワーク」という用語は、コンセンサスの免疫グロブリン配列内のフレームワーク領域を指す。本明細書において使用された「コンセンサスの免疫グロブリン配列」という用語は、類縁の免疫グロブリン配列のファミリーにおいて、最も高頻度で発生するアミノ酸(又はヌクレオチド)から形成された配列(例えば、Winnaker、「From Genes to Clones」(Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1987)を参照されたい)を指す。免疫グロブリンのファミリーにおいて、コンセンサス配列内の各位置は、ファミリー内のこの位置において、最も高頻度で発生するアミノ酸により占有されている。2つのアミノ酸が、同等に高頻度で発生する場合、いずれもが、コンセンサス配列内に含まれうる。

20

30

【0297】

ヒト化抗体は、ヒトレシピエントにおける、これらの部分の治療適用の持続時間及び有効性を制限する、抗ヒト齧歯動物抗体に対する、望ましくない免疫応答を最小化するようにデザインされうる。ヒト化抗体は、非ヒトである供給源から、それへと導入された、1つ以上のアミノ酸残基を有しうる。これらの非ヒト残基は、典型的に、可変ドメインから採取された、「インポート」残基と称されることが多い。ヒト化は、超可変領域配列を、ヒト抗体の対応する配列により置換することにより実施されうる。したがって、このような「ヒト化」抗体は、実質的に無傷に満たないヒト可変ドメインが、非ヒト種に由来する、対応する配列により置換されたキメラ抗体である。例えば、その内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第4,816,567号を参照されたい。ヒト化抗体は、一部の超可変領域残基と、おそらく、一部のF R残基とが、齧歯動物抗体内の相似部位に由来する残基により置換されたヒト抗体でありうる。本発明の抗体のヒト化又は操作は、米国特許第5,723,323号;同第5,976,862号;同第5,824,514号;同第5,817,483号;同第5,814,476号;同第5,763,192号;同第5,723,323号;同第5,766,886号;同第5,714,352号

40

50

；同第6，204，023号；同第6，180，370号；同第5，693，762号；同第5，530，101号；同第5，585，089号；同第5，225，539号及び同第4，816，567号において記載されている方法のようであるがこれらに限定されない、任意の公知の方法を使用して実施されうる。

【0298】

ヒト化抗体は、GFAPに対する高アフィニティー及び他の好適な生物学的特性を保持しうる。ヒト化抗体は、親配列及びヒト化配列についての三次元モデルを使用して、親配列及び多様な概念的ヒト化産物を解析する工程により調製されうる。三次元免疫グロブリンモデルは、一般に利用可能である。選択された候補免疫グロブリン配列の、可能な三次元コンフォメーション構造を例示及び提示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検討は、残基の、候補免疫グロブリン配列の機能における、鍵となる役割についての解析、すなわち、候補免疫グロブリンが、その抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基についての解析を可能とする。このようにして、GFAPに対するアフィニティーの上昇のような、所望の抗体特徴が、達成されるように、FR残基が、レシピエント及びインポート配列から選択され、組み合わせられうる。一般に、超可変領域残基は、直接、かつ、最も実質的に、抗原結合への影響に関与しうる。

【0299】

ヒト化に対する代替法として、ヒト抗体（本明細書において、「完全ヒト抗体」ともまた言及された）が作出されうる。例えば、PROfusion及び/又は酵母関連技術を介して、ヒト抗体を、ライブラリーから単離することが可能である。また、トランスジェニック動物（例えば、免疫化すると、内因性の免疫グロブリン産生の非存在下において、ヒト抗体の完全レパートリーを作製することが可能なマウス）を作製することも可能である。例えば、キメラマウス及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける、抗体重鎖接合領域（JH）遺伝子のホモ接合性の欠失は、内因性抗体産生の完全な阻害を結果としてもたらず。ヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子アレイの、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの移入は、抗原投与時における、ヒト抗体の産生を結果としてもたらず。ヒト化抗体又は完全ヒト抗体は、これらの各々の内容が、参照により本明細書に組み込まれた、米国特許第5，770，429号；同第5，833，985号；同第5，837，243号；同第5，922，845号；同第6，017，517号；同第6，096，311号；同第6，111，166号；同第6，270，765号；同第6，303，755号；同第6，365，116号；同第6，410，690号；同第6，682，928号及び同第6，984，720号において記載されている方法に従い調製されうる。

【0300】

e. 抗GFAP抗体

抗GFAP抗体は、上記された技法を使用して、並びに、当技術分野において公知である、規定の技法を使用して作出されうる。一部の実施形態において、抗GFAP抗体は、Dako（型番：M0761）、ThermoFisher Scientific（型番：MA5-12023、A-21282、13-0300、MA1-19170、MA1-19395、MA5-15086、MA5-16367、MA1-35377、MA1-06701又はMA1-20035）、AbCam（型番：ab10062、ab4648、ab68428、ab33922、ab207165、ab190288、ab115898又はab21837）、EMD Millipore（型番：FCMAB257P、MAB360、MAB3402、04-1031、04-1062、MAB5628）、Santa Cruz（型番：sc-166481、sc-166458、sc-58766、sc-56395、sc-51908、sc-135921、sc-71143、sc-65343又はsc-33673）、Sigma-Aldrich（型番：G3893又はG6171）又はSino Biological Inc.（型番：100140-R012-50）から市販されているGFAP抗体のような非コンジュゲートGFAP抗体でありうる。抗GFAP抗体は、ThermoFisher Scientific（型番：A-21295又はA-21294）、EMD Millipore

10

20

30

40

50

(型番: M A B 3 4 0 2 X、M A B 3 4 0 2 B、M A B 3 4 0 2 B 又は M A B 3 4 0 2 C 3) 又は A b C a m (型番: a b 4 9 8 7 4 又は a b 1 9 4 3 2 5) から市販されている、コンジュゲート G F A P 抗体のように、フルオロフォアへとコンジュゲートされうる。
【0301】

9. 方法の変化形

試料中に存在する目的の解析物 (U C H - L 1 及び / 又は G F A P) の存在又は量を決定する、開示された方法は、上記された通りでありうる。本方法はまた、解析物を解析するための他の方法を念頭に置いて、適合させられる場合もある。周知の変化形の例は、酵素による検出 (酵素イムノアッセイ (E I A) 又は酵素免疫測定アッセイ (E L I S A)) を含む、サンドイッチイムノアッセイ (例えば、モノクローナル - ポリクローナルサンドイッチイムノアッセイ)、競合阻害イムノアッセイ (例えば、フォワード競合阻害イムノアッセイ及びリバース競合阻害イムノアッセイ)、酵素多重化イムノアッセイ法 (E M I T)、競合結合アッセイのようなイムノアッセイ、生物発光エネルギー移動 (B R E T)、ワンステップ抗体検出アッセイ、同種アッセイ、異種アッセイ、キャプチャーオンザフライアッセイなどを含むがこれらに限定されない。

【0302】

a. イムノアッセイ

目的の解析物及び / 又はペプチド若しくはこれらの断片 (例えば、U C H - L 1 及び / 若しくは G F A P 並びに / 又はペプチド若しくはこれらの断片、すなわち、U C H - L 1 及び / 又は G F A P 断片) は、U C H - L 1 及び / 又は G F A P 抗体を、イムノアッセイにおいて使用して解析されうる。解析物 (例えば、U C H - L 1 及び / 又は G F A P) の存在又は量は、抗体を使用し、解析物 (例えば、U C H - L 1 及び / 又は G F A P) への特異的結合を検出して決定されうる。例えば、抗体又はこの抗体断片は、解析物 (例えば、U C H - L 1 及び / 又は G F A P) に特異的に結合しうる。所望の場合、抗体のうちの1つ以上は、1つ以上の、市販のモノクローナル / ポリクローナル抗体と組み合わせて使用されうる。このような抗体は、R & D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) 及び Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) のような企業から市販されている。

【0303】

体内試料中に存在する、解析物 (例えば、U C H - L 1 及び / 又は G F A P) の存在又は量は、サンドイッチイムノアッセイ (例えば、放射性同位元素の検出 (ラジオイムノアッセイ (R I A)) 及び酵素による検出 (酵素イムノアッセイ (E I A) 又は酵素免疫測定アッセイ (E L I S A)) (例えば、Quantikine ELISA Assay、R & D Systems、Minneapolis, MN) を含む、モノクローナル - モノクローナルサンドイッチイムノアッセイ、モノクローナル - ポリクローナルサンドイッチイムノアッセイ) のようなイムノアッセイを使用して、たやすく決定されうる。使用されうるポイントオブケアデバイスの例は、i - STAT (登録商標) (Abbott, Laboratories, Abbott Park, IL) である。使用されうる、他の方法は、化学発光マイクロ粒子イムノアッセイ、特に、例として述べると、ARCHITE CT (登録商標) 自動式解析器 (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) を利用する化学発光マイクロ粒子イムノアッセイを含む。他の方法は、例えば、質量分析及び解析物 (例えば、U C H - L 1 及び / 又は G F A P) に対する抗解析物 (例えば、抗 U C H - L 1 及び / 又は抗 G F A P) 抗体 (モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化、ヒトなど) 又はこれらの抗体断片を使用する、免疫組織化学 (例えば、組織生検に由来する切片を伴う) を含む。他の検出法は、例えば、それらの各々が、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、米国特許第 6, 143, 576 号; 同第 6, 113, 855 号; 同第 6, 019, 944 号; 同第 5, 985, 579 号; 同第 5, 947, 124 号; 同第 5, 939, 272 号; 同第 5, 922, 615 号; 同第 5, 885, 527 号; 同第 5, 851, 776 号; 同第 5, 824, 799 号;

同第5, 679, 526号; 同第5, 525, 524号及び同第5, 480, 792号において記載されている検出法を含む。抗体の、解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)への特異的免疫的結合は、抗体へと接合された、蛍光タグ又は発光タグ、金属及び放射性核種のような直接的標識を介して、又はアルカリホスファターゼ又は西洋ワサビペルオキシダーゼのような間接的標識を介して検出されうる。

【0304】

固定化された抗体又はこの断片の使用は、イムノアッセイへと組み込まれうる。抗体は、磁性粒子又はクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレート(マイクロ滴定プレートなど)の表面、固体基質材料の小片などのような、様々な支持体へと固定化されうる。アッセイストリップは、固体支持体上のアレイ内の抗体又は複数の抗体をコーティングすることにより調製されうる。次いで、このストリップは、被験試料へと浸漬させられ、有色スポットのような、測定可能なシグナルを発生させるように、洗浄及び検出ステップを介して、速やかに処理されうる。

【0305】

同種フォーマットが使用されうる。例えば、被験試料が、対象から得られた後に、混合物が調製されうる。混合物は、解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)について評価される被験試料、第1の特異的結合パートナー及び第2の特異的結合パートナーを含有する。混合物を形成するのに、被験試料、第1の特異的結合パートナー及び第2の特異的結合パートナーが添加される順序は、それほど重要ではない。被験試料は、第1の特異的結合パートナー及び第2の特異的結合パートナーと同時に接触される。一部の実施形態において、第1の特異的結合パートナーと、被験試料中に含有された、任意のUCH-L1及び/又はGFAPとは、第1の特異的結合パートナー-解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)抗原複合体を形成することが可能であり、第2の特異的結合パートナーは、第1の特異的結合パートナー-目的の解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)-第2の特異的結合パートナー複合体を形成しうる。一部の実施形態において、第2の特異的結合パートナーと、被験試料中に含有された、任意のUCH-L1及び/又はGFAPとは、第2の特異的結合パートナー-解析物(例えば、UCH-L1 UCH-L1)抗原複合体を形成することが可能であり、第1の特異的結合パートナーは、第1の特異的結合パートナー-目的の解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)-第2の特異的結合パートナー複合体を形成しうる。第1の特異的結合パートナーは、抗解析物抗体(例えば、配列番号1の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗UCH-L1抗体又は配列番号2の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗GFAP抗体)でありうる。第2の特異的結合パートナーは、抗解析物抗体(例えば、配列番号1の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗UCH-L1抗体又は配列番号2の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗GFAP抗体)でありうる。さらに、第2の特異的結合パートナーは、上記された、検出可能な標識により標識されるか、又はこれを含有する。

【0306】

異種フォーマットが使用されうる。例えば、被験試料が、対象から得られた後に、第1の混合物が調製されうる。混合物は、解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)について評価される被験試料及び第1の特異的結合パートナーを含有し、この場合、第1の特異的結合パートナーと、被験試料中に含有された、任意のUCH-L1及び/又はGFAPとは、第1の特異的結合パートナー-解析物(例えば、UCH-L1及び/又はGFAP)抗原複合体を形成する。第1の特異的結合パートナーは、抗解析物抗体(例えば、配列番号1の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗UCH-L1抗体又は配列番号2の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗GFAP抗体)でありうる。混合物を形成するのに、被験試料及び第1の特異的結合パートナーが添加される順序は、それほど重要ではない。

10

20

30

40

50

【0307】

第1の特異的結合パートナーは、固相上に固定化されうる。イムノアッセイにおいて使用される固相（第1の特異的結合パートナー、及び、任意選択的に、第2の特異的結合パートナー）は、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロ滴定プレート、キュベット、膜、足場形成分子、薄膜、濾紙、ディスク及びチップのようであるがこれらに限定されない、当技術分野において公知である、任意の固相でありうる。固相がビーズである実施形態において、ビーズは、磁気ビーズ又は磁性粒子でありうる。磁気ビーズ/磁性粒子は、強磁性、フェリ磁性、常磁性、超常磁性又は磁性流体でありうる。例示的な強磁性材料は、Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO及びNiO/Feを含む。フェリ磁性材料の例は、NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄（又はFeO・Fe₂O₃）を含む。ビーズは、磁性であり、1つ以上の非磁性層により取り囲まれた固体コア部分を有しうる。代替的に、磁性部分は、非磁性コアの周囲の層でありうる。第1の特異的結合メンバーが固定化される固体支持体は、乾燥形態又は液体で保管されうる。磁気ビーズは、第1の特異的結合メンバーが固定化される磁気ビーズを伴う試料と接触させる前に、又はこの後で、磁界下に置かれうる。

10

【0308】

第1の特異的結合パートナー - 解析物（例えば、UCH-L1又はGFAP）抗原複合体を含有する混合物が形成された後に、当技術分野において公知である、任意の技法を使用して、任意の結合していない解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）が、複合体から除去される。例えば、結合していない解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）は、洗浄することにより除去されうる。しかし、被験試料中に存在する、全ての解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）に、第1の特異的結合パートナーが結合するように、第1の特異的結合パートナーは、被験試料中に存在する、任意の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）に対する過剰量において存在することが所望される。

20

【0309】

任意の結合していない解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）が除去された後に、第2の特異的結合パートナーが、混合物へと添加されて、第1の特異的結合パートナー - 目的の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP） - 第2の特異的結合パートナー複合体を形成する。第2の特異的結合パートナーは、抗解析物抗体（例えば、配列番号1の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗UCH-L1抗体又は配列番号2の、少なくとも3連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するエピトープに結合する抗GFAP抗体）でありうる。さらに、第2の特異的結合パートナーは、上記された、検出可能な標識により標識されるか、又はこれを含む。

30

【0310】

固定化された抗体又はこの断片の使用は、イムノアッセイへと組み込まれうる。抗体は、磁性粒子又はクロマトグラフィーマトリックス粒子（磁気ビーズなど）、ラテックス粒子又は表面修飾ラテックス粒子、ポリマー又はポリマー薄膜、プラスチック又はプラスチック薄膜、平面状基質、アッセイプレート（マイクロ滴定プレートなど）の表面、固体基質材料の小片などのような、様々な支持体へと固定化されうる。アッセイストリップは、固体支持体上のアレイ内の抗体又は複数の抗体をコーティングすることにより調製されうる。次いで、このストリップは、被験試料へと浸漬させられ、有色スポットのような、測定可能なシグナルを発生させるように、洗浄及び検出ステップを介して、速やかに処理されうる。

40

【0311】

（1）サンドイッチイムノアッセイ

サンドイッチイムノアッセイは、抗体（すなわち、少なくとも1つの捕捉抗体）と、検出抗体（すなわち、少なくとも1つの検出抗体）とからなる、2つの層の間の抗原の量を測定する。捕捉抗体及び検出抗体は、抗原、例えば、UCH-L1及び/又はGFAPのような、目的の解析物上の、異なるエピトープに結合する。捕捉抗体の、エピトープへの

50

結合は、検出抗体の、エピトープへの結合に干渉しないことが所望される。モノクローナル抗体又はポリクローナル抗体のいずれも、サンドイッチイムノアッセイにおける、捕捉抗体及び検出抗体として使用されうる。

【0312】

一般に、少なくとも2つの抗体が、被験試料中の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を分離及び定量するのに利用される。より具体的に、少なくとも2つの抗体は、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の、ある特定のエピトープに結合し、「サンドイッチ」と称される免疫複合体を形成する。1つ以上の抗体が、被験試料中の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を捕捉する（これらの抗体は、しばしば、「捕捉」抗体（antibody）又は「捕捉」抗体（antibodies）と称する）のに使用される場合があり、1つ以上の抗体が、検出可能な（すなわち、定量可能な）標識を、サンドイッチに結合させるのに使用される（これらの抗体は、しばしば、「検出」抗体（antibody）又は「検出」抗体（antibodies）と称する）。サンドイッチアッセイにおいて、抗体の、そのエピトープへの結合は、アッセイ中の他の任意の抗体の、そのそれぞれのエピトープへの結合により減弱されない。抗体は、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を含有することが推測される被験試料と接触された、1つ以上の第1の抗体が、第2の抗体又は後続の抗体により認識されるエピトープの全部又は一部に結合せず、これにより、1つ以上の第2の検出抗体が、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）に結合する能力に干渉しないように選択される。

【0313】

抗体は、前記イムノアッセイ中の、第1の抗体として使用されうる。抗体は、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）上のエピトープに免疫特異的に結合する。本発明の抗体に加えて、前記イムノアッセイは、第1の抗体により認識されない、又は第1の抗体が結合しないエピトープに免疫特異的に結合する、第2の抗体を含みうる。

【0314】

解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を含有することが推測される被験試料は、少なくとも1つの、第1の捕捉抗体（又は抗体）及び少なくとも1つの、第2の検出抗体と同時に、又は逐次的に接触されうる。サンドイッチアッセイフォーマットにおいて、被験試料を含有することが推測される解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）はまず、第1の抗体-解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）抗原複合体の形成を可能とする条件下で、特定のエピトープに特異的に結合する、少なくとも1つの、第1の捕捉抗体と接触される。1つを超える捕捉抗体が使用される場合、第1の複数の捕捉抗体-UCH-L1及び/又はGFAP抗原複合体が形成される。サンドイッチアッセイにおいて、抗体、好ましくは、少なくとも1つの捕捉抗体は、被験試料に予測される解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の最大量に対するモル過剰量において使用される。例えば、マイクロ粒子コーティング緩衝液1ml当たり約5 µg/ml ~ 約1 mg/mlの抗体が使用されうる。

【0315】

i. 抗UCH-L1捕捉抗体

任意選択的に、被験試料を、少なくとも1つの、第1の捕捉抗体と接触させる前に、少なくとも1つの、第1の捕捉抗体は、第1の抗体-解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）複合体の、被験試料からの分離を容易とする固体支持体に結合されうる。当技術分野において公知である、任意の固体支持体であって、ウェル、チューブ又はビーズ（マイクロ粒子など）の形態のポリマー材料から作られた固体支持体を含むがこれらに限定されない固体支持体を使用されうる。抗体（antibody（又はantibodies））は、そのような結合が、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）に結合する抗体の能力に干渉しないという条件において、吸着により、化学的カップリング剤を使用する共有結合により、又は当技術分野において公知である他の手段により、固体支持体に結合されうる。さらに、必要な場合、固体支持体は、抗体上の多様な官能基と

の反応性を可能とするように、誘導体化されうる。このような誘導体化は、無水マレイン酸、N - ヒドロキシスクシンイミド及び1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドのようであるがこれらに限定されない、ある特定のカップリング剤の使用を必要とする。

【 0 3 1 6 】

その後、解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）を含有することが推測される被験試料は、第 1 の捕捉抗体（又は複数の抗体） - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）複合体の形成を可能とするためにインキュベートされる。インキュベーションは、約 4 . 5 ~ 約 1 0 . 0 の pH、約 2 ~ 約 4 5 の温度において、少なくとも約 1 分間 ~ 約 1 8 時間、約 2 ~ 6 分間、約 7 ~ 1 2 分間、約 5 ~ 1 5 分間又は約 3 ~ 4 分間の時間にわたり実行されうる。

10

【 0 3 1 7 】

i i . 検出抗体

次いで、第 1 の / 複数の捕捉抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）複合体の形成後、複合体は、少なくとも 1 つの、第 2 の検出抗体（第 1 の / 複数の抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）抗原 - 第 2 の抗体複合体の形成を可能とする条件下において）と接触される。一部の実施形態において、被験試料は、捕捉抗体と同時に、検出抗体と接触される。第 1 の抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）複合体が、1 つを超える検出抗体と接触される場合、第 1 の / 複数の捕捉抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP） - 複数の抗体検出複合体が形成される。少なくとも第 2 の（及び後続の）抗体が、第 1 の抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）複合体と接触される場合、第 1 の抗体と同様に、上記された条件と同様の条件下におけるインキュベーション時間が、第 1 の / 複数の抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP） - 第 2 の / 複数の抗体複合体の形成に要求される。好ましくは、少なくとも 1 つの、第 2 の抗体は、検出可能な標識を含有する。検出可能な標識は、第 1 の / 複数の抗体 - 解析物（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP） - 第 2 の / 複数の抗体複合体の形成の前に、これと同時に、又はこの後に、少なくとも 1 つの、第 2 の抗体に結合されうる。当技術分野において公知である、任意の検出可能な標識が使用されうる。

20

【 0 3 1 8 】

化学発光アッセイは、Adamczykら、Anal . Chim . Acta、579 (1) : 61 ~ 67 (2006) において記載されている方法に従い実施されうる。任意の適切なアッセイフォーマットが使用されうるが、マイクロプレート用化学発光測定器（Mithras LB - 940、Berthold Technologies U . S . A . , LLC、Oak Ridge、TN）は、小容量の複数の試料についてのアッセイを、迅速に可能とする。化学発光測定器は、96 ウェル黒色ポリスチレン製マイクロプレート（Costar、型番：3792）を使用する、複数の試薬注入器を装備されうる。各試料が、個別のウェルへと添加されうるのに続き、利用されたアッセイの種類により決定される通り、他の試薬の同時的 / 逐次的な添加がなされうる。酸性化によるように、アクリジニウムアリアルエステルを利用する、中性溶液中又は塩基性溶液中の擬塩基の形成は回避されることが所望される。次いで、化学発光応答が、ウェルごとに記録される。この点で、化学発光応答を記録するための時間は、部分的に、利用された試薬の添加と、特定のアクリジニウムの添加との間の遅延に依存する。

30

40

【 0 3 1 9 】

化学発光アッセイのための混合物を形成するのに、被験試料及び特異的結合パートナーが添加される順序は、それほど重要ではない。第 1 の特異的結合パートナーが、アクリジニウム化合物により、検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第 1 の特異的結合パートナー - 抗原（例えば、UCH - L 1 及び / 又は GFAP）複合体が形成される。代替的に、第 2 の特異的結合パートナーが使用され、第 2 の特異的結合パートナーが、アクリジニウム化合物により、検出可能に標識される場合、検出可能に標識された第 1 の特

50

異的結合パートナー - 解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP） - 第2の特異的結合パートナー複合体が形成される。標識されたものであれ、標識されていないものであれ、結合していない任意の特異的結合パートナーは、洗浄のような、当技術分野において公知である、任意の技法を使用して、混合物から除去されうる。

【0320】

過酸化水素は、混合物中、インサイチューにおいて発生されうる、又は上記されたアクリジニウム化合物の添加の前に、これと同時に、又はこの後に、混合物へと施されうる、若しくは供給されうる。過酸化水素は、当業者に明らかであるような、多数の方式により、インサイチューにおいて発生されうる。

【0321】

代替的に、過酸化水素の供給源は、混合物へと、単純に添加されうる。例えば、過酸化水素の供給源は、過酸化水素を含有することが公知である、1つ以上の緩衝液又は他の溶液でありうる。この点で、過酸化水素の溶液が、単純に添加されうる。

【0322】

少なくとも1つの塩基性溶液を、試料へと、同時に、又はその後において添加したら、検出可能なシグナル、すなわち、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の存在を示す化学発光シグナルが発生する。塩基性溶液は、少なくとも1つの塩基を含有し、10以上、好ましくは、12以上のpHを有する。塩基性溶液の例は、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化アンモニウム、水酸化マグネシウム、ナトリウム炭酸、炭酸水素ナトリウム、水酸化カルシウム、炭酸カルシウム及び重炭酸カルシウムを含むがこれらに限定されない。試料へと添加される塩基性溶液の量は、塩基性溶液の濃度に依存する。使用された塩基性溶液の濃度に基づき、当業者は、試料へと添加される塩基性溶液の量を容易に決定しうる。化学発光標識以外の他の標識も利用されうる。例えば、酵素標識（アルカリホスファターゼを含むがこれに限定されない）が利用されうる。

【0323】

発生した化学発光シグナル又は他のシグナルは、当業者に公知の規定の技法を使用して検出されうる。発生したシグナルの強度に基づき、目的の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の、試料中の量が定量されうる。具体的に、目的の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の、試料中の量は、発生したシグナルの強度に比例する。存在する解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の量は、発生した光の量を、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）についての検量線と比較することにより、又は参照標準物質との比較により定量されうる。検量線は、解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）の公知の濃度の系列希釈液又は溶液を使用して、質量分析、重量測定法及び当技術分野において公知の他の技法により作成されうる。

【0324】

（2）フォワード競合阻害アッセイ

フォワード競合フォーマットにおいて、公知の濃度の、標識された目的の解析物（例えば、蛍光標識、切断可能なリンカーと接合されたタグなどを有する解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP））のアリコートが、被験試料中の目的の解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）と、目的の解析物抗体（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP抗体）への結合について競合するように使用される。

【0325】

フォワード競合アッセイにおいて、固定化された特異的結合パートナー（抗体など）は、被験試料及び標識された目的の解析物、目的の解析物の断片又は目的の解析物の変異体と、逐次的に、又は同時に接触されうる。目的の解析物ペプチド、目的の解析物の断片又は目的の解析物の変異体は、切断可能なリンカーと接合されたタグから構成された、検出可能な標識を含む、任意の検出可能な標識により標識されうる。このアッセイにおいて、抗体は、固体支持体へと固定化されうる。代替的に、抗体は、マイクロ粒子又は平面状基質のような固体支持体上に固定化された、抗分子種抗体のような抗体へとカップリングさ

10

20

30

40

50

れうる。

【0326】

標識された目的の解析物、被験試料及び抗体は、サンドイッチアッセイフォーマットとの関連において、上記で記載された条件と同様の条件下においてインキュベートされる。次いで、抗体 - 目的の解析物複合体の、2つの異なる分子種が作出されうる。具体的に述べると、作出された抗体 - 目的の解析物複合体のうちの1つが、検出可能な標識（例えば、蛍光標識など）を含有するのに対し、他の抗体 - 目的の解析物複合体は、検出可能な標識を含有しない。抗体 - 目的の解析物複合体は、検出可能な標識の定量の前に、残りの被験試料から分離されうるが、そうされなくともよい。次いで、抗体 - 目的の解析物複合体が、残りの被験試料から分離されるのかどうかに関わらず、抗体 - 目的の解析物複体内において検出可能な標識の量が定量される。次いで、目的の解析物（膜に会合した目的の解析物、可溶性の目的の解析物、可溶性の目的の解析物の断片、目的の解析物（膜に会合した目的の解析物又は可溶性の目的の解析物）の変異体又はこれらの任意の組合せなど）の、被験試料中濃度が、例えば、上記で記載された通りに決定されうる。

10

【0327】

（3）リバーズ競合阻害アッセイ

リバーズ競合アッセイにおいて、固定化された目的の解析物（例えば、UCH - L1及び/又はGFAP）は、被験試料及び少なくとも1つの標識された抗体と、逐次的に、又は同時に接触されうる。

【0328】

目的の解析物は、上記においてサンドイッチアッセイフォーマットとの関連において論じられた固体支持体のような固体支持体に結合される。

20

【0329】

固定化された目的の解析物、被験試料及び少なくとも1つの標識された抗体は、サンドイッチアッセイフォーマットとの関連において、上記された条件と同様の条件下においてインキュベートされる。次いで、目的の解析物 - 抗体複合体の2つの異なる分子種が作出されうる。具体的に述べると、作出された目的の解析物 - 抗体複合体のうちの1つが、固定化され、検出可能な標識（例えば、蛍光標識など）を含有するのに対し、他の目的の解析物 - 抗体複合体は、固定化されず、検出可能な標識を含有しない。固定化されなかった目的の解析物 - 抗体複合体及び残りの被験試料は、洗浄のような、当技術分野において公知の技法を介して、固定化された目的の解析物 - 抗体複合体の存在から除去される。次いで、固定化されなかった目的の解析物 - 抗体複合体が除去されたら、タグの切断後に、固定化された、目的の解析物 - 抗体複体内の、検出可能な標識の量が定量される。次いで、目的の解析物の、被験試料中濃度が、上記で記載された通り、検出可能な標識の数量を比較することにより決定されうる。

30

【0330】

（4）ワンステップイムノアッセイ又は「キャプチャーオンザフライ」アッセイ

キャプチャーオンザフライアッセイにおいて、固体基質は、固定化剤によりあらかじめコーティングされている。捕捉剤、解析物（例えば、UCH - L1及び/又はGFAP）及び検出剤が、固体基質へと併せて添加されるのに続き、検出の前に、洗浄ステップがなされる。捕捉剤は、解析物（例えば、UCH - L1及び/又はGFAP）に結合することが可能であり、固定化剤のためのリガンドを含む。捕捉剤及び検出剤は、本明細書において記載された、又は当技術分野で公知である、捕捉又は検出が可能な、抗体又は他の任意の部分でありうる。リガンドは、ペプチドタグを含むことが可能であり、固定化剤は、抗ペプチドタグ抗体を含みうる。代替的に、リガンド及び固定化剤は、キャプチャーオンザフライアッセイのために利用されるように、併せて結合することが可能な薬剤の任意の対（例えば、特異的結合対及び当技術分野で公知であるような他の対）でありうる。1つを超える解析物が測定されうる。一部の実施形態において、固体基質は、抗原によりコーティングされる場合があり、解析される解析物は、抗体である。

40

【0331】

50

ワンステップイムノアッセイ又は「キャプチャーオンザフライ」における、ある特定の、他の実施形態において、固定化剤（ビオチン、ストレプトアビジンなど）によりあらかじめコーティングされた固体支持体（マイクロ粒子など）並びに少なくとも第１の特異的結合メンバー及び第２の特異的結合メンバー（それぞれ、捕捉試薬及び検出試薬として機能する）が使用される。第１の特異的結合メンバーは、固定化剤のためのリガンド（例えば、固体支持体上の固定化剤が、ストレプトアビジンである場合、第１の特異的結合メンバー上のリガンドは、ビオチンでありうる）を含み、また、目的の解析物（例えば、UCH-L1及び／又はGFAP）にも結合する。第２の特異的結合メンバーは、検出可能な標識を含み、目的の解析物（例えば、UCH-L1及び／又はGFAP）に結合する。固体支持体並びに第１の特異的結合メンバー及び第２の特異的結合メンバーは、被験試料へと（逐次的に、又は同時に）添加されうる。第１の特異的結合メンバー上のリガンドは、固体支持体上の固定化剤に結合して、固体支持体／第１の特異的結合メンバー複合体を形成する。試料中に存在する、任意の目的の解析物は、固体支持体／第１の特異的結合メンバー複合体に結合して、固体支持体／第１の特異的結合メンバー／解析物複合体を形成する。第２の特異的結合メンバーは、固体支持体／第１の特異的結合メンバー／解析物複合体に結合し、検出可能な標識が検出される。検出の前に、任意選択の洗浄ステップが利用されうる。ワンステップアッセイにおける、ある特定の実施形態において、１つを超える解析物が測定されうる。ある特定の、他の実施形態において、２つを超える特異的結合メンバーが利用されうる。ある特定の、他の実施形態において、複数の検出可能な標識が添加されうる。ある特定の、他の実施形態において、複数の、目的の解析物が検出されうる、又はこれらの量、レベル若しくは濃度が、測定、決定若しくは評価されうる。

10

20

【０３３２】

キャプチャーオンザフライアッセイの使用は、本明細書において記載され、当技術分野において公知である、様々なフォーマットにおいてなされうる。例えば、フォーマットは、上記されたようなサンドイッチアッセイでありうるが、代替的に、競合アッセイであることも可能であり、単一特異性の結合メンバーを利用しうる、又は公知であるような、他の変化形も使用しうる。

【０３３３】

１０．他の因子

上記された、診断法、予後診断法及び／又は評価法は、診断、予後診断及び評価のための他の因子の使用をさらに含む。一部の実施形態において、外傷性脳損傷は、GCS（Glasgow Coma Scale）又はGOSE（Extended Glasgow Outcome Scale）を使用して診断されうる。他の検査、スケール又は指標もまた、単独で、又はGCS（Glasgow Coma Scale）と組み合わせて使用されうる。例は、RLAS（Rancho Los Amigos Scale）である。RLAS（Rancho Los Amigos Scale）は、意識、認知、行動及び環境との相互作用のレベルを測定する。RLAS（Rancho Los Amigos Scale）は、レベルⅠ：応答なし；レベルⅡ：一般的な応答；レベルⅢ：局所的応答；レベルⅣ：混乱（興奮）；レベルⅤ：混乱（不適切）；レベルⅥ：混乱（適切）；レベルⅦ：自動的（適切）及びレベルⅧ：意図的（適切）を含む。

30

40

【０３３４】

１１．試料

一部の実施形態において、試料は、ヒト対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、１回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部損傷又は他の種類の鈍的外傷を負った後において得られる。一部の実施形態において、ヒト対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後又はこれらへと曝露された後において、試料が得られる。このような化学物質及び／又は毒素の例は、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス（一酸化炭素、硫化水素及びシアン化物など）、有機金属（

50

メチル水銀、テトラエチル鉛及び有機スズなど)及び/又は1つ以上の乱用薬物を含む。一部の実施形態において、試料は、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、1つ以上のウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患うヒト対象から得られる。

【0335】

さらに別の実施形態において、本明細書において記載された方法は、また、下記において記載される抗UCH-L1及び/又は抗GFAP抗体又はこれらの抗体断片を使用して、対象におけるUCH-L1及び/又はGFAPのレベルを決定することにより、対象が、軽度外傷性脳損傷を有するか、又はこれを発症する危険性があるのかどうかを決定するのにも使用されうる試料を使用する。したがって、特定の実施形態において、本開示はまた、本明細書において論じられ、当技術分野において公知である、外傷性脳損傷を有するか、又はこの危険性がある対象が、治療又は処置の候補であるのかどうかを決定するための方法も提示する。一般に、対象は、少なくとも(i)頭部への損傷を受けた対象；(ii)1つ以上の化学物質及び/若しくは毒素を摂取した、及び/若しくはこれらへと曝露された対象；(iii)自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、1つ以上のウイルス、髄膜炎、水頭症を患う、若しくはこれらの任意の組合せを患う対象又は(iv)(i)~(iii)の任意の組合せ若しくはTBIを有するか、又はTBIの危険性があると診断された対象(例えば、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、1つ以上のウイルス、髄膜炎、水頭症若しくはこれらの組合せを患う対象など)及び/又は本明細書において記載された、望ましくない(すなわち、臨床的に所望されない)濃度又は量のUCH-L1及び/若しくはGFAP又はUCH-L1及び/若しくはGFAP断片を顕示した対象である。

10

20

【0336】

a. 被験又は生物学的試料

本明細書において使用された「試料」、「被験試料」、「生物学的試料」とは、UCH-L1及び/又はGFAPを含有するか、又はこれを含有することが推測される体液試料を指す。試料は、任意の適切な供給源に由来しうる。場合によって、試料は、液体、流動性の粒子状固体又は固体粒子の懸濁流体を含みうる。場合によって、試料は、本明細書において記載された解析の前に処理されうる。例えば、試料は、解析の前に、その供給源から、分離又は精製されうるが、ある特定の実施形態において、UCH-L1及び/又はGFAPを含有する非処理試料が、直接的にアッセイされうる。特定の例において、UCH-L1及び/又はGFAPの供給源は、ヒト体内物質(例えば、体液、全血、血清、血漿のような血液、尿、唾液、汗、痰、精液、粘液、涙液、リンパ液、羊水、間質液、肺洗浄液、脳脊髄液、糞便、組織、臓器など)である。組織は、骨格筋組織、肝臓組織、肺組織、腎臓組織、心筋組織、脳組織、骨髄、子宮頸部組織、皮膚などを含みうるがこれらに限定されない。試料は、液体試料又は固体試料の液体抽出物でありうる。ある特定の場合、試料の供給源は、組織の分解/細胞の溶解により可溶化されうる、臓器又は生検試料のような組織でありうる。

30

【0337】

広範にわたる容量の体液試料が解析されうる。少数の例示的な実施形態において、試料容量は、約0.5 nL、約1 nL、約3 nL、約0.01 µL、約0.1 µL、約1 µL、約5 µL、約10 µL、約100 µL、約1 mL、約5 mL、約10 mLなどでありうる。場合によって、体液試料の容量は、約0.01 µL~約10 mLの間、約0.01 µL~約1 mLの間、約0.01 µL~約100 µLの間又は約0.1 µL~約10 µLの間である。

40

【0338】

場合によって、体液試料は、アッセイにおける使用の前に希釈されうる。例えば、UCH-L1及び/又はGFAPの供給源が、ヒト体液(例えば、血液、血清)である実施形態において、体液は、適切な溶媒(例えば、PBS緩衝液のような緩衝液)により希釈されうる。体液試料は、使用の前に、約1倍、約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約10倍、約100倍以上希釈されうる。他の場合に、体液試料は、アッセイにおける使

50

用の前に希釈されない。

【0339】

場合によって、試料は、解析前処理を経る場合がある。解析前処理は、非特異的タンパク質の除去及び／又は効果的であるが廉価で実施可能な混合機能性のような、さらなる機能性をもたらさう。解析前処理の一般的方法は、動電トラッピング、ＡＣ動電現象、表面音響波、等速電気泳動、誘電泳動、電気泳動又は当技術分野において公知である、他の前濃縮法の使用を含みうる。場合によって、体液試料は、アッセイにおける使用の前に濃縮されうる。例えば、UCH-L1及び／又はGFAPの供給源が、ヒト体液（例えば、血液、血清）である実施形態において、体液は、沈殿、蒸発、濾過、遠心分離又はこれらの組合せにより濃縮されうる。体液試料は、使用の前に、約１倍、約２倍、約３倍、約４倍、約５倍、約６倍、約１０倍、約１００倍以上濃縮されうる。

10

【0340】

b. 対照

対照試料を含むことが所望でありうる。対照試料は、上記された通り、対象に由来する試料と共時的に解析されうる。対象試料から得られた結果は、対照試料から得られた結果と比較されうる。試料についてのアッセイ結果が比較されうる、検量線が用意されうる。このような検量線は、マーカーのレベルを、アッセイ単位、すなわち、蛍光標識が使用される場合なら、蛍光のシグナル強度の関数として提示する。複数のドナーから採取された試料を使用して、正常健康組織におけるUCH-L1及び／又はGFAPの基準レベル並びに上記において明示された特徴のうちの１つ以上を有しうるドナーから採取された組織内の、「危険性がある」UCH-L1及び／又はGFAPのレベルについての検量線が用意されうる。

20

【0341】

したがって、上記を念頭に置いて、UCH-L1及び／又はGFAPの、被験試料中の存在、量又は濃度を決定するための方法が提供される。本方法は、例えば、UCH-L1及び／又はGFAP上のエピトープに結合する、少なくとも１つの捕捉抗体及び捕捉抗体に対するエピトープと異なる、UCH-L1及び／又はGFAP上のエピトープに結合する、少なくとも１つの検出抗体を利用するイムノアッセイにより、被験試料を、UCH-L1及び／又はGFAPについてアッセイするステップを含み、任意選択的に、検出可能な標識を含み、UCH-L1及び／又はGFAPの、被験試料中の存在、量又は濃度についての、直接的指標又は間接的指標として、検出可能な標識により発生したシグナルを、UCH-L1及び／又はGFAPの、校正物質中の存在、量又は濃度についての、直接的指標又は間接的指標として発生されたシグナルと比較するステップを含む。校正物質は、任意選択的に、校正物質の各々が、系列内の他の校正物質とUCH-L1及び／又はGFAPの濃度が異なる、校正物質の系列の一部であり、これが好ましい。

30

【0342】

12. キット

本明細書において、被験試料を、UCH-L1及び／若しくはGFAP又はUCH-L1及び／若しくはGFAP断片についてアッセイ又は評価するために使用されうるキットが提示される。キットは、被験試料を、UCH-L1及び／又はGFAPについてアッセイするための、少なくとも１つの構成要素、被験試料を、UCH-L1及び／又はGFAPについてアッセイするための指示書を含む。例えば、キットは、被験試料を、UCH-L1及び／又はGFAPについて、イムノアッセイ、例えば、化学発光マイクロ粒子イムノアッセイによりアッセイするための指示書を含みうる。キット内に含まれる指示書は、パッケージング材料に貼付されうる、又はパッケージの添付文書として含まれうる。指示書は、典型的に、文書又は印刷物でありうるが、このようなものに限定されない。このような指示書を保存し、これらを末端使用者へと通信することが可能な、任意のメディアが、本開示により想定される。このようなメディアは、電子保存メディア（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学メディア（例えば、CD ROM）などを含むがこれらに限定されない。本明細書において使用された「指示書」は、指示書を提

40

50

供するインターネットサイトのアドレスを含みうる。

【0343】

少なくとも1つの構成要素は、UCH-L1及び/又はGFAPに特異的に結合する、1つ以上の単離抗体又はこれらの抗体断片を含む、少なくとも1つの組成物を含みうる。抗体は、UCH-L1及び/若しくはGFAP捕捉抗体並びに/又はUCH-L1及び/若しくはGFAP検出抗体でありうる。

【0344】

代替的に、又は、加えて、キットは、較正物質若しくは対照、例えば、精製され、任意選択的に、凍結乾燥させられたUCH-L1及び/若しくはGFAP並びに/又はアッセイを行うための、少なくとも1つの容器（例えば、抗UCH-L1及び/若しくはGFAPモノクローナル抗体により、あらかじめコーティングされうる、チューブ、マイクロ滴定プレート又はストリップ）並びに/又はそれらのうちの一方が濃縮溶液、検出可能な標識（例えば、酵素標識）のための基質溶液若しくは停止溶液として提供されうる、アッセイ緩衝液若しくは洗浄緩衝液のような緩衝液を含みうる。好ましくは、キットは、アッセイを実施するのに必要な、全ての構成要素、すなわち、試薬、標準物質、緩衝液、希釈剤などを含む。指示書はまた、検量線を作成するための指示書も含みうる。

10

【0345】

キットは、UCH-L1及び/又はGFAPを定量するための参照標準物質をさらに含みうる。参照標準物質は、UCH-L1及び/又はGFAP濃度を内挿及び/又は外挿するための検量線を確認するのに利用されうる。参照標準物質は、高度のUCH-L1及び/又はGFAP濃度レベル、例えば、約100000 pg/mL、約125000 pg/mL、約150000 pg/mL、約175000 pg/mL、約200000 pg/mL、約225000 pg/mL、約250000 pg/mL、約275000 pg/mL、約300000 pg/mL；中程度のUCH-L1及び/又はGFAP濃度レベル、例えば、約25000 pg/mL、約40000 pg/mL、約45000 pg/mL、約50000 pg/mL、約55000 pg/mL、約60000 pg/mL、約75000 pg/mL若しくは約100000 pg/mL及び/又は低度のUCH-L1及び/又はGFAP濃度レベル、例えば、約1 pg/mL、約5 pg/mL、約10 pg/mL、約12.5 pg/mL、約15 pg/mL、約20 pg/mL、約25 pg/mL、約30 pg/mL、約35 pg/mL、約40 pg/mL、約45 pg/mL、約50 pg/mL、約55 pg/mL、約60 pg/mL、約65 pg/mL、約70 pg/mL、約75 pg/mL、約80 pg/mL、約85 pg/mL、約90 pg/mL、約95 pg/mL若しくは約100 pg/mLを含みうる。

20

30

【0346】

キット内に提供される、任意の抗体であって、UCH-L1及び/又はGFAPに特異的な組換え抗体のような抗体は、フルオロフォア、放射性部分、酵素、ビオチン/アビジン標識、発色団、化学発光標識などのような、検出可能な標識を組み込むことが可能である、又はキットは、抗体を標識付けするための試薬若しくは抗体（例えば、検出抗体）を検出するための試薬及び/又は解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を標識付けするための試薬若しくは解析物（例えば、UCH-L1及び/又はGFAP）を検出するための試薬を含みうる。抗体、較正物質及び/又は対照は、個別の容器内に用意されうる、又は適切なアッセイフォーマット、例えば、マイクロ滴定プレートへとあらかじめ分注されうる。

40

【0347】

任意選択的に、キットは、品質管理のための構成要素（例えば、感度パネル、較正物質及び陽性対照）を含む。品質管理試薬の調製は、当技術分野において周知であり、様々な免疫診断用生成物のための添付シート上に記載されている。感度パネルメンバーは、任意選択的に、アッセイ性能の特徴を確認するのに使用され、さらに、任意選択的に、イムノアッセイキット試薬の完全性及びアッセイの標準化についての、有用な指標である。

【0348】

50

キットはまた、任意選択的に、診断的アッセイを行うのに要求される、又は品質管理査定を容易とする、他の試薬であって、緩衝液、塩、酵素、酵素補因子、基質、検出試薬などのような試薬も含みうる。被験試料の単離及び／又は処理のための緩衝液及び溶液（例えば、前処理試薬）のような、他の構成要素もまた、キットに含まれうる。加えて、キットは、1つ以上の他の対照も含みうる。キットの構成要素のうちの1つ以上は、凍結乾燥させられる場合があり、この場合、キットは、凍結乾燥させられた構成要素の復元に適する試薬をさらに含むうる。

【0349】

キットの多様な構成要素は、必要に応じて、任意選択的に、適切な容器、例えば、マイクロ滴定プレートにより提供される。キットは、試料を保持又は保存するための容器（例えば、尿試料、全血試料、血漿試料又は血清試料のための容器又はカートリッジ）をさらに含むうる。適切な場合、キットはまた、任意選択的に、反応槽、混合槽及び試薬又は被験試料の調製を容易とする他の構成要素も含有しうる。キットはまた、シリンジ、ピペット、鉗子、計量スプーンなどのような、被験試料を得る一助となるための、1つ以上の器具も含みうる。

【0350】

検出可能な標識が、少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットは、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキサミド、少なくとも1つのアクリジニウム-9-カルボキシレートアリアルエステル、又はこれらの任意の組合せを含むうる。検出可能な標識が、少なくとも1つのアクリジニウム化合物である場合、キットはまた、緩衝液、溶液及び／又は少なくとも1つの塩基性溶液のような、過酸化水素の供給源も含みうる。所望の場合、キットは、磁性粒子、ビーズ、試験管、マイクロ滴定プレート、キューベット、膜、足場形成分子、薄膜、濾紙、ディスク又はチップのような固相を含有しうる。

【0351】

所望の場合、キットは、単独で、又は被験試料を、外傷性脳損傷又は障害のバイオマーカーのようなバイオマーカーでありうる、別の解析物についてアッセイするための指示書とさらに組み合わせて、1つ以上の構成要素をさらに含むうる。

【0352】

a. キット及び方法の適合

本明細書において記載されたイムノアッセイにより、UCH-L1及び／又はGFAPの、被験試料中濃度を評価又は決定するためのキット（又はこの構成要素）並びに方法は、例えば、米国特許第5,063,081号、米国特許出願公開第2003/0170881号、同第2004/0018577号、同第2005/0054078号及び同第2006/0160164号において記載されており、例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) により、Abbott Point of Care (i-STAT (登録商標) 又はi-STAT Alinity、Abbott Laboratories) として市販されている、様々な自動式システム及び半自動式システム（固相がマイクロ粒子を含むシステムを含む）のほか、米国特許第5,089,424号及び同第5,006,309号において記載されており、例えば、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) により、ARCHITECT (登録商標) 又はAbbott Alinity デバイスのシリーズとして市販されているシステムにおける使用に適合させられうる。

【0353】

自動式システム又は半自動式システムの、非自動式システム（例えば、ELISA）と比較した、一部の差違は、第1の特異的結合パートナー（例えば、解析物抗体又は捕捉抗体）が、接合された基質（サンドイッチの形成及び解析物の反応性に影響を及ぼしうる）並びに捕捉ステップ、検出ステップ及び／又は任意選択の洗浄ステップの長さ及びタイミングを含む。ELISAのような非自動式フォーマットが、試料及び捕捉試薬（例えば、約2時間）を伴う、比較的長いインキュベーション時間を要求しうるのに対し、自動式フォーマット又は半自動式フォーマット（例えば、ARCHITECT (登録商標) 及び任

10

20

30

40

50

意の後継のプラットフォーム、Abbott Laboratories)は、比較的短いインキュベーション時間(例えば、ARCHITECT(登録商標)の場合、約18分間)を有しうる。同様に、ELISAのような非自動式フォーマットが、コンジュゲート試薬のような検出抗体を、比較的長いインキュベーション時間(例えば、約2時間)にわたってインキュベートするのに対し、自動式フォーマット又は半自動式フォーマット(例えば、ARCHITECT(登録商標)及び任意の後継のプラットフォーム)は、比較的短いインキュベーション時間(例えば、ARCHITECT(登録商標)及び任意の後継のプラットフォームの場合、約4分間)を有しうる。

【0354】

Abbott Laboratoriesから市販されている、他のプラットフォームは、ASYM(登録商標)、IMx(登録商標)(例えば、参照によりその全体において本明細書に組み込まれた、米国特許第5,294,404号を参照されたい)、PRISM(登録商標)、EIA(ビーズ)及びQuantum(商標)II並びに他のプラットフォームを含むがこれらに限定されない。加えて、アッセイ、キット及びキットの構成要素は、例えば、電気化学アッセイシステム又は他の携帯型アッセイシステム若しくはポイントオブケアアッセイシステム上の、他のフォーマットにおいて利用されうる。前述の通り、本開示は、例えば、サンドイッチイムノアッセイを実施する、市販の、Abbott Point of Care(i-STAT(登録商標)、Abbott Laboratories)電気化学イムノアッセイシステムに適用可能である。イムノセンサー並びにこれらの製造法及び単回使用のための検査デバイスにおける動作については、例えば、参照によりこれに関するそれらの教示について本明細書に組み込まれた、米国特許第5,063,081号、米国特許出願公開第2003/0170881号、同第2004/0018577号、同第2005/0054078号及び同第2006/0160164号において記載されている。

【0355】

特に、アッセイの、i-STAT(登録商標)システムへの適合に関して、以下の構成が好ましい。微細加工シリコンチップが、金製の電流測定用作業電極及び銀塩化銀基準電極の対と共に作製される。作業電極のうちの1つにおいて、捕捉抗体を固定化されたポリスチレンビーズ(直径を0.2mmとする)が、電極上の、パターン化されたポリビニルアルコールのポリマーコーティングへと接着させられる。このチップが、イムノアッセイに適する流体フォーマットと共に、i-STAT(登録商標)カートリッジへとアセンブルされる。シリコンチップの部分に、それらのうちのいずれも、検出可能に標識されうる、1つ以上のUCH-L1及び/又はGFAP抗体(UCH-L1及び/又はGFAPに結合しうる、1つ以上のモノクローナル/ポリクローナル抗体又はこれらの断片、これらの変異体又はこれらの変異体の断片)又は1つ以上の抗UCH-L1及び/又はGFAP DVD-Ig(又はUCH-L1及び/又はGFAPに結合しうる、これらの断片、これらの変異体又はこれらの変異体の断片)のような、UCH-L1及び/又はGFAPに対する特異的結合パートナーが存在する。カートリッジの流体パウチ内に、p-アミノフェノールホスフェートを含む水性試薬が存在する。

【0356】

作動時に、TBIを患うことが推測される対象に由来する試料が、検査カートリッジの保持チャンバーへと添加され、カートリッジが、i-STAT(登録商標)リーダーへと挿入される。カートリッジ内のポンプエレメントが、試料を、チップを含有する導管へと押し出す。試料は、センサーと接触され、酵素コンジュゲートを、試料へと溶存させる。試料は、センサーにわたり振動させられて、約2~12分間にわたる、サンドイッチの形成を促進する。アッセイの最後から二番目のステップにおいて、試料は、廃液チャンバーへと押し出され、アルカリホスファターゼ酵素に対する基質を含有する洗浄液が、過剰量の酵素コンジュゲート及び試料を、センサーチップから洗い落とすのに使用される。アッセイの最後のステップにおいて、アルカリホスファターゼ標識は、p-アミノフェノールホスフェートと反応して、リン酸基を切断し、作業電極において、遊離p-アミノフェノ

10

20

30

40

50

ールを、電気化学的に酸化させる。測定された電流に基づき、リーダーは、組み込まれたアルゴリズム及び工場において決定された較正曲線により、UCH-L1及び/又はGFAPの、試料中量を計算することが可能となる。

【0357】

本開示の方法における使用のための、本明細書において記載された自動式システム及び半自動式システムは、1つ以上のコンピュータプログラム、ソフトウェア又はアルゴリズムを用いて、イメージング手順を実施する（例えば、陽性結果に基づき）のか、イメージング手順を実施しない（例えば、陰性結果に基づき）のかについての決定（リードアウト）をもたらす。例えば、コンピュータプログラム又はソフトウェア（例えば、アルゴリズムを使用する）は、（1）GFAP及びUCH-L1のレベルが、基準レベル（又はカットオフ）未満である場合、この結果は陰性であることから、イメージング手順が実施されないことを意味する；又は（2）GFAP及び/若しくはUCH-L1のレベルが、基準レベル（又はカットオフ）以上である場合、この結果は陽性であることから、イメージング手順が実施されることを意味するという解釈（1つの試料が使用されるのか、2つ以上の試料が使用されるのかに関わらず）を提示する。コンピュータプログラム又はソフトウェアは、基準レベルが、陽性の頭部CT、頭蓋内病変の存在又は外傷性脳損傷を負っていない、対照の対象と相関するのか、しないのか、TBIを患う対象が、モニタリングされ、かつ/又はTBI処置により処置されるべきであるのかなどのような、他の適切な解釈を提示する。このようなコンピュータプログラム又はソフトウェアは、当技術分野において周知である。

【0358】

本明細書において記載された方法及びキットは、必然的に、イムノアッセイを実行するための、他の試薬及び方法を包含する。例えば、当技術分野において公知であり、かつ/又は、コンジュゲート希釈剤及び/若しくは較正物質希釈剤として、例えば、洗浄用に、たやすく調製若しくは最適化され利用されうる、多様な緩衝液が包含される。例示的なコンジュゲート希釈剤は、ある特定のキット（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）において利用され、2-（N-モルホリノ）エタンスルホン酸（MES）、塩、タンパク質ブロッキング剤、抗微生物剤及び界面活性剤を含有する、ARCHITECT（登録商標）コンジュゲート希釈剤である。例示的な較正物質希釈剤は、MES、他の塩、タンパク質ブロッキング剤及び抗微生物剤を含有する緩衝液を含む、ある特定のキット（Abbott Laboratories、Abbott Park、IL）において利用された、ARCHITECT（登録商標）ヒト較正物質希釈剤である。加えて、2008年12月31日に出願された、米国特許出願第61/142,048号において記載されている通り、シグナル発生の改善は、例えば、シグナル増幅剤としてのシグナル抗体へと連結された核酸配列を使用する、i-STAT（登録商標）カートリッジフォーマットにおいて得られうる。

【0359】

本明細書の、ある特定の実施形態は、外傷性脳損傷のような疾患を評価するのに利用されると有利であるが、アッセイ及びキットはまた、適宜、任意選択的に、他の疾患、障害及び状態におけるUCH-L1及び/又はGFAPを評価するのににも利用されうる。

【0360】

アッセイ法はまた、外傷性脳損傷のような疾患を改善する化合物を同定するのににも使用されうる。例えば、UCH-L1及び/又はGFAPを発現する細胞は、候補化合物と接触されうる。本明細書において記載されたアッセイ法を使用して、化合物と接触された細胞内の、UCH-L1及び/又はGFAPの発現レベルは、対照細胞内の発現レベルと比較されうる。

【実施例】

【0361】

本発明は、以下の非限定例により例示された、複数の態様を有する。

【0362】

10

20

30

40

50

13. 実施例

当業者に、本明細書において記載された、本開示の方法の、他の適切な改変及び適合は、たやすく適用可能かつ認識可能であり、本開示の範囲又は本明細書において開示された態様及び実施形態から逸脱しない限りにおいて、適切な同等物を使用してなされうることが容易に明らかとなる。さて、本開示について詳細に記載してきたが、これは、本開示の実施形態の、一部の態様を例示することだけを意図するものであり、本開示の範囲に対して限定的であると考えられるべきではない、以下の例を参照することにより、より明確に理解される。本明細書において言及された、全ての雑誌の参考文献、米国特許及び刊行物の開示は、参照によりそれらの全体において本明細書に組み込まれている。

【0363】

本発明は、以下の非限定例により例示された、複数の態様を有する。

【0364】

[実施例 1]

i - STAT (登録商標) UCH - L1 アッセイ

i - STAT (登録商標) UCH - L1 アッセイを、TBI 患者集団研究において使用した。捕捉モノクローナル抗体としての抗体 A 及び検出モノクローナル抗体としての抗体 B 及び抗体 C のようなモノクローナル抗体対を使用した。抗体 A は、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 社内において開発された、例示的な抗 UCH - L1 抗体である。抗体 B 及び抗体 C は、UCH - L1 の異なるエピトープを認識し、Banyan Biomarkers (Alachua, Florida) に
20
より開発された、試料中の抗原の検出を増強する。Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 社内において開発された、他の抗体もまた、捕捉抗体又は検出抗体として、多様な組合せにおいて、併せて使用された場合に、同様のシグナルの増強を示す、又はこれを示すことが期待されている。UCH - L1 アッセイデザインを、鍵となる性能属性に対して査定した。カートリッジ構成は、抗体構成：抗体 A (捕捉抗体) / 抗体 B + C (検出抗体)；試薬条件：0.8% の固体、125 µg / mL の Fab アルカリホスファターゼクラスターコンジュゲート及び試料注入口の印字：UCH - L1 標準物質であった。アッセイ時間は、10 ~ 15 分間 (試料捕捉時間を 7 ~ 12 分間とする) であった。

【0365】

[実施例 2]

i - STAT (登録商標) GFAP アッセイ

i - STAT (登録商標) GFAP アッセイを、TBI 患者集団研究において使用した。捕捉モノクローナル抗体としての抗体 A 及び検出モノクローナル抗体としての抗体 B のようなモノクローナル抗体対を使用した。抗体 A 及び抗体 B は、Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 社内において開発された、例示的な抗 GFAP 抗体である。GFAP アッセイデザインを、鍵となる性能属性に対して査定した。カートリッジ構成は、抗体構成：抗体 A (捕捉抗体) / 抗体 B (検出抗体)；試薬条件：0.8% の固体、250 µg / mL の Fab アルカリホスファターゼクラスターコンジュゲート及び試料注入口の印字：GFAP 特異的であった。アッセイ時間は、10 ~ 15 分間 (試料捕捉時間を 7 ~ 12 分間とする) であった。
40

【0366】

[実施例 3]

TBI 集団研究 (TRACK - TBI)

Transforming Research and Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury (TRACK - TBI) 研究とは、大規模かつ複雑なプロジェクトである。その機関間連携及び官民連携は、11 の臨床施設、7 つのコア、のべ約 50 の共同研究機関、共同研究企業及び支援団体から構成される。3 つの臨床施設からの臨床データに基づく、初期の TRACK - TBI パイロット研究は、TBI Common Data Elements を精緻化する一助となり
50

10

20

30

40

50

、TRACK-TBI研究のための、TBI Information Commonsの原型を創出した。

【0367】

対象群：合計2,700～3000例のTBI患者を、3つの臨床群：1.救急科において査定され、退院した患者(ED)；2.入院したが、ICU入院ではない患者(ADM)及び3.ICUへの入院患者(ICU)間に、均等に登録し、クリニカルケアパスにより細分化した。頭蓋外外傷を伴うが、TBIを伴わない、臨床群1つ当たりのさらなる患者100例(n=300)を、対照として登録して、患者の全登録数3000例とした。この層別化計画は、比較有効性研究(CER)解析を容易とし、従来の「軽度TBI/中等度TBI/重度TBI」への細分化による制約を受けなかった。データ収集は、クリニカルケアパス(ED、ADM、ICU)及び各目的の要件に依存した。各群内の患者を、収集されるデータの範囲を規定する、3つのコホートへと層別化した。

10

【0368】

対照は、以下の基準を満たした、成人の整形外科外傷患者であった：1.これらの四肢末端及び/又は骨盤損傷及び/又は肋骨骨折について、略式損傷スコアが4であること(非致死性のスコア)；2.推測される頭部損傷について、EDにおいて、CT又はMRIを受けたという基準が該当しなかったことを除き、TBI対象と同じ組入れ基準及び除外基準を満たしたこと。意識喪失(LOC)、意識障害及び外傷後貧血(PTA)/RAについての潜在的なコントロールについてインタビューすることにより、TBIを、進行中の損傷として除外した；3.各施設が、TBIコホートに由来する年齢及び性別の分布に従い、標的に対する対照の数についての計画を提供されたこと；及び4.MRI来院を完了させることができなかった場合、対照は、追跡のためのCA-MRIコホートへと登録され、2週間後における総合評価(CA)へと送られたこと。

20

【0369】

対象の適格性：American Congress of Rehabilitation Medicine (ACRM) Criteriaに従う急性TBIの履歴を伴って救急科(ED)を訪れる全ての年齢の成人患者であって、以下：任意の期間にわたる意識喪失(LOC)；事故の直前又は直後における、任意の記憶喪失事象(例えば、健忘症)；事故時における、精神状態の任意の異変(放心、方向喪失及び/又は意識混濁の感覚)；及び/又は永続性の場合もあり、永続性でない場合もある、局所神経障害のうちの1つにより顕示された外傷誘導性の脳機能の生理学的破壊を負った成人患者を登録した。外傷誘導性は、頭部が殴打されること、頭部を物体にぶつけること又は外部からの、頭部への、直接的な外傷を伴わずに、脳が加速/減速運動を受けること(例えば、むち打ち状態)を含んだ。

30

【0370】

使用された組入れ/除外基準を、表2に示す。

【0371】

40

【表 2】

表 2

基準	データ源	コメント
組入れ基準		
1. 0～100 歳	カルテ	
2. 記録/検証された TBI (ACRM 基準)	カルテ、 問診	
3. 損傷は、<24 時間前に生じた	カルテ、 問診	
4. 臨床ケアのための急性脳 CT	カルテ	対象は、脳 CT スキャンを施されていない
5. 検査に十分な視力/聴力	カルテ、 問診	
6. 英語又はスペイン語に流暢である	カルテ、 問診	検査バッテリー又は検査人員の稼働可否
7. 説明同意文書を提出できること	問診	
除外基準		
1. 追跡及び転帰評価に抵触する、著明な多 発外傷	カルテ	著明な身体外傷は、TBI 転帰の検査を交絡 させうる。
2. 囚人又は拘留中の患者	カルテ、 問診	
3. 女性対象における妊娠	カルテ、 問診	
4. 精神科措置入院中の患者 (例えば、5150 節、5250 節)	カルテ	
5. 追跡及び転帰評価の妥当性に抵触する、 ベースラインの、主要な消耗性の精神保健障 害 (例えば、統合失調症又は双極性障害)	カルテ、 問診	消耗性の精神障害は、追跡の信頼性に著明 に影響を及ぼし、かつ/又はインデックス TBI への帰属に困難をもたらす
6. ベースラインの意識認知又は追跡及び 転帰評価の妥当性を損なう、主要な消耗性の 神経疾患 (例えば、脳卒中、CVA、認知症、 腫瘍)	カルテ、 問診	ベースラインの、記録された消耗性の認知 機能障害は、同意可能性が完全でないこと に加えて、転帰評価を交絡させる。
7. 追跡及び転帰評価に抵触する既に存在 する状態の著明な履歴 (例えば、同意に抵触 しうる、物質乱用、アルコール中毒、 HIV/AIDS、主要な伝染性疾患、末期がん、 学習障害、精神発達障害)	カルテ、 問診	
8. MRI に対する禁忌 (CA+MRI コホートの場合)	MRI スクリーニング	
9. 追跡の可能性が小さいこと (例えば、無関 心を表す参加者又は家族、別の州又は国にお ける居住、ホームレス状態又は信頼できる連 絡先の欠如)	問診	

10. 介入的試験 (例えば、薬物試験、機器試 験、行動学的試験) に現在参加中であること	カルテ、 問診	Resuscitation Outcomes Consortium Prehospital Tranexamic Acid for TBI Study に参加している施設について、同時 登録除外に対する例外措置が取られる
11. 穿通性 TBI	カルテ	
12. ASIA スコアが C 以下の脊髄損傷	カルテ	

3つの臨床群（すなわち、ED、ADM及びICU）の各々について、対象を、3つの異なる評価コホート：略式評価（BA）コホート、圧縮評価（CA）コホート又は総合評価＋MRI（CA＋MRI）コホートのうちの1つに入れた。追跡率を80%とするマイルストーン計画について、表3を参照されたい。

【0373】

【表3】

表3

群	1年目			2年目			3年目			4年目	合計
	CA+MRI	CA	例数	CA+MRI	CA	例数	CA	BA	例数	BA	例数
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
対照	0	99	99	0	66	66	135	0	135	0	300
合計	450	360	810	150	240	390	600	300	900	900	3000

【0374】

略式評価（BA）コホートは、ED群、ADM群及びICU群について、400例ずつの対象を伴う、合計1200例の対象を含んだ。BAコホートについて、以下のデータ：人口学的データ及び全臨床経過データ；1日目（損傷から<24時間）における、血清、血漿、DNA及びRNAのための採血；1日目におけるベースラインの回収から3～6時間以内における、血清のための採血の反復（この構成要素を含むことは、施設に応じて、任意選択的である）；入院経過の一部として、1日目から取得された臨床脳CTスキャン；並びにNINDS CDEウェブサイト上に公開されている、NIH TBI-CDEV.2.0のCore転帰尺度を使用して、組織化された電話インタビューを介して、2週間後、3、6及び12カ月後において収集された転帰データを収集した。

【0375】

圧縮評価（CA）コホートは、ED群、ADM群及びICU群について、300例ずつの対象＋100例ずつの対照を伴う、合計1200例の対象を含んだ。CAコホートについて、以下のデータ：人口学的データ及び全臨床経過データ；ADM群及びICU群についての、高密度の、毎日の臨床データ；1日目（損傷から<24時間）における、血清、血漿、RNA及びDNAのための採血；1日目におけるベースラインの回収から3～6時間以内における、血清のための採血の反復（この構成要素を含むことは、施設に応じて、任意選択的である）；ADM及びICUについての、3日目（48～72時間後）及び5日目（96～120時間後）の、血清、血漿及びRNAのための採血；1～5日目における脳脊髄液の回収（この構成要素を含むことは、施設に応じて、任意選択的である）；入院経過の一部として取得された、全ての臨床脳CTスキャン；2週間後及び6カ月間後における、血清、血漿及びRNAのための採血；並びにNIH TBI-CDEV.2.0のCore転帰尺度、Basic転帰尺度及びSupplemental転帰尺度を使用して、組織化された対面インタビューを介して、2週間後、6及び12カ月後において収集され、組織化された電話インタビューを介して、3カ月後において収集された転帰データを収集した。

【0376】

総合評価＋MRI（CA＋MRI）コホートは、ED群、ADM群及びICU群について、200例ずつを伴う、合計600例の対象を含んだ。CA＋MRIコホートについて、以下のデータ：人口学的データ及び全臨床経過データ；ADM群及びICU群についての、高密度の、毎日の臨床データ；1日目（損傷から<24時間）における、血清、血漿、RNA及びDNAのための採血；1日目におけるベースラインの回収から3～6時間以内における、血清のための採血の反復（この構成要素を含むことは、施設に応じて、任意

選択的である) ; A D M 及び I C U についての、3 日目 (4 8 ~ 7 2 時間後) 及び 5 日目 (9 6 ~ 1 2 0 時間後) における、血清、血漿及び R N A のための採血 ; 1 ~ 5 日目における脳脊髄液の回収 (この構成要素を含むことは、施設に応じて、任意選択的である) ; 入院経過の一部として取得された、全ての臨床頭部 C T スキャン ; 2 週間後及び 6 カ月間後における、血清、血漿及び R N A のための採血 ; 2 週間後及び 6 カ月間後において取得された、3 T 精査のための M R I ; 並びに N I H T B I - C D E v . 2 . 0 の C o r e 転帰尺度、B a s i c 転帰尺度及び S u p p l e m e n t a l 転帰尺度を使用して、組織化された対面インタビューを介して、2 週間後、6 及び 1 2 カ月後において収集され、組織化された電話インタビューを介して、3 カ月後において収集された転帰データを収集した。

10

【 0 3 7 7 】

登録した後、院内において、データ収集が始まった。C A + M R I 患者について、2 週間後の M R I は、損傷日から 1 4 日 ± 4 日後に完了させた。対応する、2 週間後の転帰は、2 週間後の M R I から ± 3 日後に完了させた。C A 患者及び B A 患者について、2 週間後の転帰は、損傷日から 1 4 日後の ± 4 日後に完了させた。3 カ月後の転帰は、損傷日から 9 0 日後の ± 7 日後に完了させた。C A + M R I 患者について、6 カ月後の M R I は、損傷日から 1 8 0 日後の ± 1 4 日後に完了し、対応する 6 カ月後の転帰は、6 カ月後の M R I から ± 1 4 日後に完了させた。C A 患者及び B A 患者について、6 カ月後の転帰は、損傷日から 1 8 0 日後の ± 1 4 日後に完了させた。B T A C T (B r i e f T e s t o f A d u l t C o g n i t i o n b y T e l e p h o n e) は、転帰から ± 7 日後 (しかし、同じ日ではなく、損傷から 2 0 1 日後以下である) に完了させるものとする。1 2 カ月後の転帰は、損傷日から 3 6 0 日後の ± 3 0 日後に完了させた。

20

【 0 3 7 8 】

U C H - L 1 及び G F A P を、i - S T A T アッセイフォーマットの、5 9 例という、小さな標本サイズの T R A C K T B I 患者において測定した (表 4) 。

【 0 3 7 9 】

30

40

50

【表 4】

表4:CTスキャン及びMRIの結果による対象の特徴

対象の特徴	合計 (n = 59)	CT又はMRIの陽性 ^a (n = 46, 77.97%)	CT及びMRIの陰性 ^a (n = 13, 22.03%)	P値
年齢	46.0 [24.0 to 60.0]	45.5 [23.0 to 60.0]	50.0 [39.0 to 57.0]	0.7419
性別				
男性	50 / 59 (85%)	39 / 46 (85%)	11 / 13 (85%)	1.0000
女性	9 / 59 (15%)	7 / 46 (15%)	2 / 13 (15%)	
人種/民族				
アフリカ系アメリカ人又はアジア人	6 / 58 (10%)	4 / 45 (9%)	2 / 13 (15%)	0.2398
白人	48 / 58 (83%)	39 / 45 (87%)	9 / 13 (69%)	
ヒスパニック あり (LOGを伴う)	4 / 58 (7%)	2 / 45 (4%)	2 / 13 (15%)	
TBI履歴				
あり (LOGを伴わない)	9 / 56 (16%)	3 / 43 (7%)	6 / 13 (46%)	0.0037
あり (LOGを伴う)	8 / 56 (14%)	6 / 43 (14%)	2 / 13 (15%)	
以前にTBIなし	39 / 56 (70%)	34 / 43 (79%)	5 / 13 (38%)	
EDへの来院				
意識喪失				
なし	6 / 58 (10%)	2 / 45 (4%)	4 / 13 (31%)	0.0227
あり	47 / 58 (81%)	38 / 45 (84%)	9 / 13 (69%)	
不明	5 / 58 (9%)	5 / 45 (11%)		
GCS (Glasgow Coma Scale)	15.0 [3.0 to 15.0]	14.0 [3.0 to 15.0]	15.0 [15.0 to 15.0]	0.0162
GCS (Glasgow Coma Scale) による分類				
重度 (3~8)	16 / 59 (27%)	16 / 46 (35%)		0.0177
中等度 (9~22)	3 / 59 (5%)	3 / 46 (7%)		
軽度 (13~15)	40 / 59 (68%)	27 / 46 (59%)	13 / 13 (100%)	
損傷の機構				
自動車 (運転手/通行人)	10 / 59 (17%)	9 / 46 (20%)	1 / 13 (8%)	0.2975
オートバイ/ATV/ゴルフ場のカート (運転手/通行人)	5 / 59 (8%)	3 / 46 (7%)	2 / 13 (15%)	
任意の種類の車両にぶつけられた個体 (自転車/スクーター/馬など)	3 / 59 (5%)	2 / 46 (4%)	1 / 13 (8%)	
動く物体からの落下 (自転車/スクーター/馬など)	3 / 59 (5%)	3 / 46 (7%)		
静止する物体からの落下 (屋根/梯子など)	27 / 59 (46%)	20 / 46 (43%)	7 / 13 (54%)	
攻撃	10 / 59 (17%)	9 / 46 (20%)	1 / 13 (8%)	
攻撃ではなく、頭部への物体による打撃 (木など)	1 / 59 (2%)		1 / 13 (8%)	
アルコールレベル (g/dL)	0.1 [0.0 to 0.2]	0.1 [0.0 to 0.2]	0.0 [0.0 to 0.0]	0.1588
薬物スクリーン				
陰性	51 / 59 (86%)	41 / 46 (89%)	10 / 13 (77%)	0.3567
陽性	8 / 59 (14%)	5 / 46 (11%)	3 / 13 (23%)	
バイオマーカー結果				
損傷後の回収時間 (分)	771.0 (+/- 339.8)	779.4 (+/- 296.8)	743.0 (+/- 468.7)	0.7383
GFAP (pg/mL)	643.8 [188.6 to 2138.6]	876.6 [519.7 to 2409.5]	31.3 [26.3 to 166.2]	< 0.0001
UCH-L1 (pg/mL)	342.5 [102.8 to 718.3]	514.0 [167.2 to 859.8]	62.4 [44.5 to 136.8]	< 0.0001
予後診断スコア				
GOS (Glasgow Outcome Scale) (3ヵ月後)	6.0 [5.0 to 7.0]	5.5 [4.0 to 7.0]	7.0 [7.0 to 7.0]	0.0130
GOS (Glasgow Outcome Scale) (6ヵ月後)	6.0 [5.0 to 7.0]	6.0 [4.0 to 7.0]	7.0 [5.5 to 7.5]	0.1941
GOS (Glasgow Outcome Scale) (12ヵ月後)	7.0 [5.0 to 8.0]	6.5 [5.0 to 8.0]	7.0 [6.0 to 8.0]	0.4412
リバーミート 質問票の最初の3項目 (6ヵ月後)	0.0 [0.0 to 2.0]	0.0 [0.0 to 2.5]	0.0 [0.0 to 2.0]	0.8378
リバーミート 質問票の最後の13項目 (6ヵ月後)	9.0 [4.0 to 15.0]	8.5 [4.0 to 15.0]	13.0 [0.0 to 27.0]	0.5449
WAIS-III処理速度指数 (6ヵ月後)	30.0 [5.0 to 55.0]	30.0 [5.0 to 50.0]	43.0 [18.0 to 77.0]	0.3235
SWLS (Satisfaction with Life Scale) (6ヵ月後)	21.5 (+/- 6.2)	21.7 (+/- 5.7)	20.4 (+/- 8.5)	0.6205
機能的自立度評価法 (6ヵ月後)	126.0 [125.0 to 126.0]	126.0 [124.0 to 126.0]	126.0 [126.0 to 126.0]	0.2958

^a24例の対象がMRIを受けた。

連続変数は、中央値 [四分位数範囲間の25~75%] として提示され、ウイコクソンの順位和検定を使用して比較される、又は平均値 (±SD) として提示され、データの分布に対するt検定を使用して比較される。

カテゴリ変数は、数/合計 (パーセント) として提示され、カイ二乗検定又はフィッシャーの正確検定を使用して比較される。

【 0 3 8 0 】

脳損傷から24時間以内における採血に加えて、各患者に、頭部CT、神経精神医学的検査、GCS (Glasgow Coma Scale) スコアを含む、広範な医学的査定を施し、また、多くの患者に、損傷の2週間以内に、追跡MRIも施した。細心の標準化採血プロトコール及び処理に続き、血漿試料を、-80℃における保存のためにアリコート分割し、その後、融解させ、調べた。各試料を、二連の試行にかけ、列挙された結果は、2回の試行の平均とした。図1A及び1Bは、例示的な対象のサブセットにおいて、UCH-L1レベル (図1A) 及びGFAPレベル (図1B) が、損傷後、最初の24時間を通して、損傷と関連したことを示す (範囲: 約2~23時間)。ETOH消費は、TB

I、特に、重度TBIと関連することが多いので、表4は、エタノール（ETOH）レベルが、バイオマーカーレベルと相関しなかったことを示す（ピアソン相関＝0.023、p値＝0.89）。

【0381】

表5は、100pg/mL及び300pg/mLのUCH-L1カットオフレベル及びGFAPカットオフレベルを、イメージング結果と比較して使用する結果を示す。

【0382】

【表5】

表5:イメージング結果と比較した、UCH-L1及びGFAPについての、バイオマーカーカットオフ(基準レベル)

10

イメージング法	バイオマーカー カットオフ (pg/mL)	イメージング法	バイオマーカーの 組合せ		感度	特異度	PPV	NPV
			陽性	陰性	(95%信頼区間)	(95%信頼区間)	(95% CI)	(95% CI)
CT	100	陽性	44 (A)	11 (B)	100.00% (44/44) (91.96%, 100.00%)	26.67% (4/15) (7.79%, 55.10%)	80.00% (44/55) (67.03%, 89.57%)	100.00% (4/4) (39.76%, 100.00%)
		陰性	0 (C)	4 (D)				
MRI又はCT	100	陽性	46 (A)	9 (B)	100.00% (46/46) (92.29%, 100.00%)	30.77% (4/13) (9.09%, 61.43%)	83.64% (46/55) (71.20%, 92.23%)	100.00% (4/4) (39.76%, 100.00%)
		陰性	0 (C)	4 (D)				
CT	300	陽性	41 (A)	2 (B)	93.18% (41/44) (81.34%, 98.57%)	86.67% (13/15) (59.54%, 98.34%)	95.35% (41/43) (84.19%, 99.43%)	81.25% (13/16) (54.35%, 95.95%)
		陰性	3 (C)	13 (D)				
MRI又はCT	300	陽性	42 (A)	1 (B)	91.30% (42/46) (79.21%, 97.58%)	92.31% (12/13) (63.97%, 99.81%)	97.67% (42/43) (87.71%, 99.94%)	75.00% (12/16) (47.62%, 92.73%)
		陰性	4 (C)	12 (D)				

20

感度 = $A/(A+C) \times 100$

特異度 = $D/(B+D) \times 100$

PPV = $A/(A+B) \times 100$

NPV = $D/(C+D) \times 100$

* 注:本明細書の上記の表において、「バイオマーカーカットオフ」と、「バイオマーカー基準レベル」とは、互換的に使用されている。

【0383】

30

MRI:図2A及び2Bは、時点による、全ての対象についての、MRIを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベル(図2A; 0.815のAUC)及びGFAPレベル(図2B; 0.835のAUC)に対する、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す。図3Aは、MRIを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関する、UCH-L1レベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、第1の時点(「時点1」)におけるUCH-L1レベル~第2の時点(「時点2」)におけるUCH-L1レベルの間の変化)(AUC=0.715)に対する、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す。図3Bは、MRIを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベルの絶対量(「絶対デルタ」)(すなわち、第1の時点(「時点1」)におけるGFAPレベル~第2の時点(「時点2」)におけるGFAPレベルの間の変化)(AUC=0.592)に対する、ROC(receiver operating characteristic)解析を示す。ROC曲線に基づく、基準レベルの感度及び特異度を、表6及び7に示す。

40

【0384】

50

【表 6】

表 6

バイオマーカー	レベル (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	88	83.24	30.37
	97	80.35	33.25
	117	75.43	40.31
GFAP	24	94.8	30.89
	44	91.04	40.05
	57	90.17	45.55
	79	87.57	50
	115	85.26	60.73
	185	80.06	70.68

10

【 0 3 8 5 】

【表 7】

表 7

バイオマーカー	絶対量 (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	35	81.75	31.25
	48	77.78	37.5
	62	73.02	40.63
GFAP	18	94.44	31.25
	34	91.27	40.63
	60	88.89	50
	135	80.16	62.5

20

【 0 3 8 6 】

ＣＴスキャン：図４Ａ及び４Ｂは、時点による、全ての対象についてのＣＴスキャンを使用する、検出された頭蓋内病変の存在又は非存在の結果と相関させた、UCH-L1レベル（図４Ａ）及びGFAPレベル（図４Ｂ）についてのROC解析を示す。図５Ａは、ＣＴスキャンを使用する、検出された頭蓋内病変の存在又は非存在の結果と相関させた、UCH-L1レベルの絶対量（「絶対デルタ」）（すなわち、第１の時点（「時点１」）におけるUCH-L1レベル～第２の時点（「時点２」）におけるUCH-L1レベルの間の変化）についてのROC解析を示す。図５Ｂは、ＣＴスキャンを使用する、検出された頭蓋内病変の存在又は非存在の結果と相関させた、GFAPレベルの絶対量（「絶対デルタ」）（すなわち、第１の時点（「時点１」）におけるGFAPレベル～第２の時点（「時点２」）におけるGFAPレベルの間の変化）についてのROC解析を示す。

30

【 0 3 8 7 】

ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャン：図６Ａ及び６Ｂは、時点での全ての対象についての、ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベル（図６Ａ；AUC＝0.683）及びGFAPレベル（図６Ｂ；AUC＝0.847）についてのROC解析を示す。図７Ａは、ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、UCH-L1レベルの絶対量（「絶対デルタ」）（すなわち、第１の時点（「時点１」）におけるUCH-L1レベル～第２の時点（「時点２」）におけるUCH-L1レベルの間の変化）（AUC＝0.668）についてのROC解析を示す。図７Ｂは、ＭＲＩスキャン又はＣＴスキャンを使用して検出された、頭蓋内病変結果の存在又は非存在と相関させた、GFAPレベルの絶対量（「絶対デルタ」）（すなわち、第１の時点（「時点１」）におけるGFAPレベル～第２の時点（「時点２」）におけるGFAPレベル

40

50

の間の変化) ($AUC = 0.799$) についてのROC解析を示す。ROC曲線に基づく、基準レベルの感度及び特異度を、表8及び9に示す。

【0388】

【表8】

表8

バイオマーカー	レベル (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	87	84.07	30.77
	96	80.16	33.24
GFAP	22	95.04	30.77
	40	91.65	40.11
	63	89.56	50
	100	85.64	60.17
	156	81.98	70.06

10

【0389】

【表9】

表9

バイオマーカー	絶対量 (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	46	76.98	31.25
	66	70.5	42.19
GFAP	11	96.4	31.25
	21	93.53	40.63
	42	89.21	50
	90	84.17	60.94
	124	80.58	65.63

20

【0390】

MRI (ただし、CTスキャンは陰性) : 図8A及び8Bは、時点による、MRIを使用するが、CTスキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、UCH-L1レベル (図8A ; 0.620のAUC) 及びGFAPレベル (図8B ; 0.768のAUC) についてのROC解析を示す。試料は、頭部損傷から24時間以内に採取される。図9Aは、MRIを使用するが、CTスキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、UCH-L1レベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点2におけるUCH-L1レベルと、時点1におけるUCH-L1レベルとの絶対差) ($AUC = 0.626$) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。図9Bは、MRIを使用するが、CTスキャンは陰性である、頭蓋内病変結果の存在と相関させた、GFAPレベルの絶対量 (「絶対デルタ」) (すなわち、時点2におけるGFAPレベルと、時点1におけるGFAPレベルとの絶対差) ($AUC = 0.775$) についての、ROC (receiver operating characteristic) 解析を示す。時点1における試料が、頭部損傷から24時間以内に採取されるのに対し、時点2における試料は、時点1試料が採取された約3～約6時間後に採取される。ROC曲線に基づく、基準レベルの感度及び特異度を、表10及び11に示す。

30

40

【0391】

50

【表 1 0】

表 10

バイオマーカー	レベル (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	84	84.06	30.03
	93	80.44	33.23
	114	76.09	40.26
GFAP	22	89.86	30.35
	42	84.78	40.58
	66	83.33	50.48
	81	81.16	53.67

10

【 0 3 9 2】

【表 1 1】

表 11

バイオマーカー	絶対量 (pg/mL)	感度	特異度
UCH-L1	46	83.33	31.58
	61	80.56	36.84
	82	75	47.37
GFAP	14	91.67	31.58
	21	91.67	42.11
	34	86.11	49.12
	62	80.56	57.9

20

【 0 3 9 3】

GFAPとUCH-L1との組合せについて、CTが陰性である患者であって、MRIによる頭蓋内病変結果が陽性である患者において解析した。GFAP及びUCH-L1の基準レベルについての感度及び特異度を、表 1 2 に示す。

【 0 3 9 4】

【表 1 2】

30

表 12: GFAP 又は UCH-L1 (カットオフ以上の)

GFAP のカットオフ (pg/mL)	UCH-L1 のカットオフ (pg/mL)	感度	特異度
22	84	97.83	14.43
22	93	97.1	15.74
22	114	97.1	19.02
22	180	94.2	24.26
22	250	92.75	26.23
22	350	91.3	28.52
42	84	96.38	18.36
42	93	95.65	20.33
42	114	96.65	23.93
42	180	91.3	30.16
42	250	88.41	33.44
42	350	86.96	37.38
50	180	90.58	33.44

40

【 0 3 9 5】

GFAPとUCH-L1との組合せについて、CTが陰性である患者であって、MRI

50

による頭蓋内病変結果も陰性である患者において解析した。GFAP及びUCH-L1の基準レベルについての感度及び特異度を、表13に示す。

【0396】

【表13】

表13: GFAP又はUCH-L1(カットオフ以上の)

GFAPのカットオフ (pg/mL)	UCH-L1のカットオフ (pg/mL)	感度	特異度
450	400	57.25	80.66
450	500	52.9	83.61
450	600	52.17	87.21
450	700	49.28	87.54
650	400	44.93	84.26
650	500	40.58	87.54
650	600	39.86	91.15
650	700	36.96	91.48

10

【0397】

前出の詳細な記載及び付属の実施例は、例示的なものであるに過ぎず、併載の特許請求の範囲及びそれらの均等物だけによって規定される、本発明の範囲に対する限定として理解されないものとするのが理解される。

20

【0398】

開示された実施形態に対する、多様な変化及び改変が、当業者に明らかである。この精神及び範囲から逸脱しない限りにおいて、限定せずに述べると、化学構造、置換基、誘導体、中間体、合成、組成物、製剤又は本発明の使用法に関する変化及び改変を含む、このような変化及び改変がなされうる。

【0399】

完全さの理由のために、本発明の多様な態様は、以下の番号付けされた条項に明示される。

【0400】

条項1．頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法であって、a)推測される頭部への損傷後約24時間以内に、対象から得られた試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ1(UCH-L1)、グリア原線維性酸性タンパク質(GFAP)又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定するステップ及びb)早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含み、基準レベルが、(a)少なくとも約70%~約100%の間の感度及び少なくとも約30%~約100%の間の特異度を有するアッセイにより決定される；又は(b)少なくとも約20pg/mL~約200pg/mLの間である方法。

30

40

【0401】

条項2．基準レベルが、少なくとも約80%の感度及び少なくとも約30%の特異度を有するアッセイにより決定される、条項1に記載の方法。

【0402】

条項3．基準レベルが、少なくとも約80pg/mL~約150pg/mLの間である、条項1に記載の方法。

【0403】

条項4．対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージン

50

グ手順を受けている、条項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 0 4 】

条項 5 . 対象が、イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、条項 4 に記載の方法。

【 0 4 0 5 】

条項 6 . イメージング手順が、磁気共鳴イメージング又は頭部コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンである、条項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 0 6 】

条項 7 . 基準レベルが、陽性の M R I スキャン又は陽性の C T スキャンと相関する、条項 6 に記載の方法。

【 0 4 0 7 】

条項 8 . 基準レベルが、頭蓋内病変の存在と相関する、条項 7 に記載の方法。

【 0 4 0 8 】

条項 9 . 基準レベルが、頭部損傷を負っていない、対照の対象と相関する、条項 1 に記載の方法。

【 0 4 0 9 】

条項 1 0 . G F A P についての基準レベルが、約 2 0 p g / m L ~ 約 2 0 0 p g / m L の間である、条項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 0 】

条項 1 1 . U C H - L 1 についての基準レベルが、約 8 0 p g / m L ~ 約 1 5 0 p g / m L の間である、条項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 1 】

条項 1 2 . 試料が、推測される頭部への損傷後、約 0 ~ 約 1 2 時間以内に採取される、条項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 2 】

条項 1 3 . 頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法であって、 a) 推測される損傷後、2 4 時間以内に対象から採取された第 1 の試料及び第 1 の試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に対象から採取された第 2 の試料である、対象から得られた少なくとも 2 つの試料に対して、アッセイを実施するステップ; b) 少なくとも 2 つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1) 、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ; 並びに c) 早期バイオマーカーのレベルが第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む方法。

【 0 4 1 3 】

条項 1 4 . 対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージング手順を受けている、条項 1 3 に記載の方法。

【 0 4 1 4 】

条項 1 5 . 対象が、イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、条項 1 4 に記載の方法。

【 0 4 1 5 】

条項 1 6 . イメージング手順が、磁気共鳴イメージング又は頭部コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンである、条項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 1 6 】

条項 1 7 . 絶対量が、陽性の M R I スキャン又は陽性の C T スキャンと相関する、条項 1 6 に記載の方法。

【 0 4 1 7 】

条項 1 8 . 絶対量が、頭蓋内病変の存在と相関する、条項 1 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【 0 4 1 8 】

条項 1 9 . 絶対量が、少なくとも約 7 0 % ~ 1 0 0 % の間の感度及び少なくとも約 3 0 % ~ 1 0 0 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される、条項 1 8 に記載の方法。

【 0 4 1 9 】

条項 2 0 . 絶対量が、(a) 少なくとも約 8 0 % の感度及び少なくとも約 3 0 % の特異度又は (b) 少なくとも約 7 5 % の感度及び少なくとも約 4 0 % の特異度を有するアッセイにより決定される、条項 1 9 に記載の方法。

【 0 4 2 0 】

条項 2 1 . 絶対量が、少なくとも約 1 0 p g / m L ~ 少なくとも約 1 5 0 p g / m L の間である、条項 1 9 又は 2 0 に記載の方法。

10

【 0 4 2 1 】

条項 2 2 . 早期バイオマーカーが、U C H - L 1 であり、絶対量が、少なくとも約 3 0 p g / m L ~ 約 1 0 0 p g / m L の間である、早期バイオマーカーが、G F A P であり、絶対量が、少なくとも約 1 0 p g / m L ~ 約 1 5 0 p g / m L の間である、又はこれらの組合せである、条項 2 3 に記載の方法。

【 0 4 2 2 】

条項 2 3 . 第 1 の試料が、推測される頭部への損傷後、約 0 ~ 約 1 2 時間以内に採取される、条項 1 3 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 2 3 】

条項 2 4 . 第 2 の試料が、第 1 の試料後、約 3 時間 ~ 約 6 時間の間に、対象から採取される、条項 1 3 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 4 2 4 】

条項 2 5 . U C H - L 1 のレベルを測定するステップが、イムノアッセイ又は臨床化学アッセイを実施することによりなされる、条項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 2 5 】

条項 2 6 . U C H - L 1 のレベルを測定するステップが、A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、(1) U C H - L 1 上又は U C H - L 1 断片上のエピトープに結合して U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原複合体を形成する U C H - L 1 捕捉抗体、及び (2) 検出可能な標識を含み、U C H - L 1 捕捉抗体が結合していない U C H - L 1 上のエピトープに結合して U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複合体を形成する U C H - L 1 検出抗体と接触させて、U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複合体を形成すること、並びに B . U C H - L 1 の、試料中量又は試料中濃度を、U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定することを含む、条項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 4 2 6 】

条項 2 7 . G F A P のレベルを測定するステップが、イムノアッセイ又は臨床化学アッセイを実施することによりなされる、条項 1 ~ 2 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 2 7 】

条項 2 8 . G F A P のレベルを測定するステップが、A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、(1) G F A P 上又は G F A P 断片上のエピトープに結合して G F A P 捕捉抗体 - G F A P 抗原複合体を形成する G F A P 捕捉抗体、及び (2) 検出可能な標識を含み、G F A P 捕捉抗体が結合していない G F A P 上のエピトープに結合して G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複合体を形成する G F A P 検出抗体と接触させて、G F A P 捕捉抗体 - G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複合体を形成すること、並びに B . G F A P の、試料中量又は試料中濃度を、G F A P 捕捉抗体 - G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定することを含む、条項 1 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

40

【 0 4 2 8 】

条項 2 9 . 試料が、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選

50

択される、条項 1 ~ 2 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 2 9 】

条項 3 0 . 対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、1 回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部への損傷又は他の種類の鈍力外傷を負った後において、試料が得られる、条項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 0 】

条項 3 1 . 試料が、対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した後、又はこれらへと曝露された後において得られる、条項 1 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 4 3 1 】

条項 3 2 . 化学物質又は毒素が、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの 1 つ以上の組合せである、条項 3 1 に記載の方法。

【 0 4 3 2 】

条項 3 3 . 前記試料が、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られる、条項 1 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 3 】

条項 3 4 . 対象の臨床状態、対象の検査値、軽度、中等度、重度、又は中等度 ~ 重度の外傷性脳損傷の罹患についての対象の分類、対象による低レベル又は高レベルの U C H - L 1 の呈示、及び前記対象が頭部への損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意の対象に対して実行されうる、条項 1 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 4 3 4 】

条項 3 5 . 対象を、軽度外傷性脳損傷処置により処置するステップをさらに含む、条項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 5 】

条項 3 6 . 対象をモニタリングするステップをさらに含む、条項 1 ~ 3 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 4 3 6 】

条項 3 7 . 試料が、全血試料である、条項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 7 】

条項 3 8 . 試料が、血清試料である、条項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 8 】

条項 3 9 . 試料が、血漿試料である、条項 1 ~ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 3 9 】

条項 4 0 . アッセイが、イムノアッセイである、条項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 0 】

条項 4 1 . アッセイが、臨床化学アッセイである、条項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【 0 4 4 1 】

条項 4 2 . アッセイが、単一分子検出アッセイである、条項 3 7 ~ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 2 】

条項 4 3 . 頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法であって、

a) 推測される頭部への損傷後約 2 4 時間以内に対象から採取された試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1

50

)、グリア原線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定又は検出するステップ; 及び

b) 対象に対して、イメージング手順を実施するのかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しないステップ

を含み、

基準レベルが、(a) 少なくとも約 70 % ~ 約 100 % の間の感度及び少なくとも約 30 % ~ 約 100 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される; 又は (b) 少なくとも約 20 pg / mL ~ 約 200 pg / mL の間である

方法。

【 0 4 4 3 】

条項 4 4 . ヒト対象を査定して、頭部損傷についてのイメージング手順を実施するのかどうかを決定する方法であって、

a) 推測される頭部への損傷後約 24 時間以内に、対象から得られた試料に対するアッセイを実施して、試料中の、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L1 (U C H - L1)、グリア原線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む早期バイオマーカーの試料中レベルを測定するステップ及び

b) 対象に対して、イメージング手順を実施するのかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより高い場合、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーの試料中レベルが、早期バイオマーカーの基準レベルより低い場合、対象に対するイメージング手順を実施しないステップ

を含み、

基準レベルが、(a) 少なくとも約 70 % ~ 約 100 % の間の感度及び少なくとも約 30 % ~ 約 100 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される; 又は (b) 少なくとも約 20 pg / mL ~ 約 200 pg / mL の間である

方法。

【 0 4 4 4 】

条項 4 5 . 基準レベルが、少なくとも約 80 % の感度及び少なくとも約 30 % の特異度を有するアッセイにより決定される、条項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【 0 4 4 5 】

条項 4 6 . 基準レベルが、少なくとも約 80 pg / mL ~ 約 150 pg / mL の間である、条項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【 0 4 4 6 】

条項 4 7 . 対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージング手順を受けている、条項 4 3 ~ 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 7 】

条項 4 8 . 対象が、イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、条項 4 7 に記載の方法。

【 0 4 4 8 】

条項 4 9 . イメージング手順が、磁気共鳴イメージング (M R I) 又は頭部コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンである、条項 4 3 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 4 9 】

条項 5 0 . 基準レベルが、陽性の M R I スキャン又は陽性の C T スキャンと相関する、条項 4 9 に記載の方法。

【 0 4 5 0 】

条項 5 1 . 基準レベルが、頭蓋内病変の存在と相関する、条項 5 0 に記載の方法。

【 0 4 5 1 】

10

20

30

40

50

条項 5 2 . 基準レベルが、頭部損傷を負っていない、対照の対象と相関する、条項 4 3 又は 4 4 に記載の方法。

【 0 4 5 2 】

条項 5 3 . G F A P についての基準レベルが、約 2 0 p g / m L ~ 約 2 0 0 p g / m L の間である、条項 4 3 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 5 3 】

条項 5 4 . U C H - L 1 についての基準レベルが、約 8 0 p g / m L ~ 約 1 5 0 p g / m L の間である、条項 4 3 ~ 5 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 5 4 】

条項 5 5 . 試料が、推測される頭部への損傷後、約 0 ~ 約 1 2 時間以内に採取される、条項 4 3 ~ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 4 5 5 】

条項 5 6 . 頭部への損傷を負った、又は負った可能性があるヒト対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかの決定の一助となる方法であって、

a) 推測される損傷後、2 4 時間以内に対象から採取された第 1 の試料及び第 1 の試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に対象から採取された第 2 の試料である、対象から得られた少なくとも 2 つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；

b) 少なくとも 2 つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1)、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ；並びに

20

c) 対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーのレベルが第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む方法。

【 0 4 5 6 】

条項 5 7 . ヒト対象を査定して、頭部損傷についてのイメージング手順を実施するかどうかを決定する方法であって、

a) 推測される損傷後、2 4 時間以内に対象から採取された第 1 の試料及び第 1 の試料が採取された約 3 ~ 約 6 時間後に対象から採取された第 2 の試料である、対象から得られた少なくとも 2 つの試料に対して、アッセイを実施するステップ；

30

b) 少なくとも 2 つの試料中において、ユビキチンカルボキシ末端ヒドロラーゼ L 1 (U C H - L 1)、グリア細胞線維性酸性タンパク質 (G F A P) 又はこれらの組合せを含む外傷性脳損傷の早期バイオマーカーを検出するステップ；並びに

c) 対象に対して、イメージング手順を実施するかどうかを決定するステップであって、早期バイオマーカーのレベルが第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇をする場合に、対象に対するイメージング手順を実施し、早期バイオマーカーのレベルの第 1 の試料から第 2 の試料へ少なくとも絶対量の低下又は上昇が見られない場合に、対象に対するイメージング手順を実施しないステップを含む方法。

40

【 0 4 5 7 】

条項 5 8 . 対象が、アッセイが実施される前に、又は実施された後において、イメージング手順を受けている、条項 5 6 又は 5 7 に記載の方法。

【 0 4 5 8 】

条項 5 9 . 対象が、イメージング手順に基づき、外傷性脳損傷を有すると推測される、条項 5 8 に記載の方法。

【 0 4 5 9 】

条項 6 0 . イメージング手順が、磁気共鳴イメージング又は頭部コンピュータ断層撮影 (C T) スキャンである、条項 5 6 ~ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

【 0 4 6 0 】

条項 6 1 . 絶対量が、陽性の M R I スキャン又は陽性の C T スキャンと相関する、条項 6 0 に記載の方法。

【 0 4 6 1 】

条項 6 2 . 絶対量が、頭蓋内病変の存在と相関する、条項 6 1 に記載の方法。

【 0 4 6 2 】

条項 6 3 . 絶対量が、少なくとも約 7 0 % ~ 1 0 0 % の間の感度及び少なくとも約 3 0 % ~ 1 0 0 % の間の特異度を有するアッセイにより決定される、条項 6 2 に記載の方法。

【 0 4 6 3 】

条項 6 4 . 絶対量が、(a) 少なくとも約 8 0 % の感度及び少なくとも約 3 0 % の特異度又は (b) 少なくとも約 7 5 % の感度及び少なくとも約 4 0 % の特異度を有するアッセイにより決定される、条項 6 3 に記載の方法。

10

【 0 4 6 4 】

条項 6 5 . 絶対量が、少なくとも約 1 0 p g / m L ~ 少なくとも約 1 5 0 p g / m L の間である、条項 6 3 又は 6 4 に記載の方法。

【 0 4 6 5 】

条項 6 6 . 早期バイオマーカーが、U C H - L 1 であり、絶対量が、少なくとも約 3 0 p g / m L ~ 約 1 0 0 p g / m L の間である、早期バイオマーカーが、G F A P であり、絶対量が、少なくとも約 1 0 p g / m L ~ 約 1 5 0 p g / m L の間である、又はこれらの組合せである、条項 6 5 に記載の方法。

20

【 0 4 6 6 】

条項 6 7 . 第 1 の試料が、推測される頭部への損傷後、約 0 ~ 約 1 2 時間以内に採取される、条項 5 6 ~ 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 6 7 】

条項 6 8 . 第 2 の試料が、第 1 の試料後、約 3 時間 ~ 約 6 時間の間に採取される、条項 5 6 ~ 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 6 8 】

条項 6 9 . U C H - L 1 のレベルを測定するステップが、イムノアッセイ又は臨床化学アッセイを実施することによりなされる、条項 4 3 ~ 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 6 9 】

30

条項 7 0 . U C H - L 1 のレベルを測定するステップが、

A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) U C H - L 1 上又は U C H - L 1 断片上のエピトープに結合して U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原複合体を形成する U C H - L 1 捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、U C H - L 1 捕捉抗体が結合していない U C H - L 1 上のエピトープに結合して U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複合体を形成する U C H - L 1 検出抗体

と接触させて、U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複合体を形成すること並びに

B . U C H - L 1 の、試料中量又は試料中濃度を、U C H - L 1 捕捉抗体 - U C H - L 1 抗原 - U C H - L 1 検出抗体複体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定すること

40

を含む、条項 4 3 ~ 6 9 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 0 】

条項 7 1 . G F A P のレベルを測定するステップが、イムノアッセイ又は臨床化学アッセイを実施することによりなされる、条項 4 3 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 1 】

条項 7 2 . G F A P のレベルを測定するステップが、

A . 試料を、同時に、又は逐次的に、任意の順序において、

(1) G F A P 上又は G F A P 断片上のエピトープに結合して G F A P 捕捉抗体 - G

50

F A P 抗原複合体を形成する G F A P 捕捉抗体、及び

(2) 検出可能な標識を含み、G F A P 捕捉抗体が結合していない G F A P 上のエピトープに結合して G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複合体を形成する G F A P 検出抗体と接触させて、G F A P 捕捉抗体 - G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複合体を形成すること並びに

B . G F A P の、試料中量又は試料中濃度を、G F A P 捕捉抗体 - G F A P 抗原 - G F A P 検出抗体複合体内の検出可能な標識により発生したシグナルに基づき測定することを含む、条項 4 3 ~ 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 2 】

条項 7 3 . 試料が、全血試料、血清試料、脳脊髄液試料及び血漿試料からなる群から選択される、条項 4 3 ~ 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

10

【 0 4 7 3 】

条項 7 4 . 対象が、物理的振盪、閉鎖性頭部外傷若しくは開放性頭部外傷をもたらす外部の機械的力若しくは他の力、1 回以上の転倒、爆発若しくは爆破による鈍的衝撃により引き起こされた頭部への損傷又は他の種類の鈍力外傷を負った後において、試料が得られる、条項 4 3 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 4 】

条項 7 5 . 対象が、化学物質、毒素又は化学物質と毒素との組合せを摂取した、又はこれらへと曝露された後において、試料が得られる、条項 4 3 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【 0 4 7 5 】

条項 7 6 . 化学物質又は毒素が、火、カビ、アスベスト、害虫駆除剤、殺虫剤、有機溶剤、塗料、糊、ガス、有機金属、乱用薬物又はこれらの 1 つ以上の組合せである、条項 7 5 に記載の方法。

【 0 4 7 6 】

条項 7 7 . 試料が、自己免疫疾患、代謝性障害、脳腫瘍、低酸素症、ウイルス、髄膜炎、水頭症又はこれらの組合せを患う対象から得られる、条項 4 3 ~ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 7 】

条項 7 8 . 対象の臨床状態、対象の検査値、軽度、中等度、重度又は中等度 ~ 重度の外傷性脳損傷の罹患についての対象の分類、対象による低レベル又は高レベルの U C H - L 1 の呈示、及び前記対象が頭部への損傷を負った可能性がある任意の事象のタイミングからなる群から選択される因子に関わらず、任意の対象に対して実行されうる、条項 4 3 ~ 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

30

【 0 4 7 8 】

条項 7 9 . 対象を、軽度外傷性脳損傷処置により処置するステップをさらに含む、条項 4 3 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 7 9 】

条項 8 0 . 対象をモニタリングするステップをさらに含む、条項 4 3 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【 0 4 8 0 】

条項 8 1 . 試料が、全血試料である、条項 4 3 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 1 】

条項 8 2 . 試料が、血清試料である、条項 4 3 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 2 】

条項 8 3 . 試料が、血漿試料である、条項 4 3 ~ 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 3 】

条項 8 4 . アッセイが、イムノアッセイである、条項 8 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 4 】

50

条項 8 5 . アッセイが、臨床化学アッセイである、条項 8 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 5 】

条項 8 6 . アッセイが、単一分子検出アッセイである、条項 8 1 ~ 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 6 】

条項 8 7 . 自動式システム又は半自動式システムにおける使用に適合させられる、条項 1 ~ 8 6 のいずれか一項に記載の方法。

【 0 4 8 7 】

条項 8 8 . 自動式システム又は半自動式システムが、コンピュータプログラムを用いて、対象に対して、イメージング手順を実施するのか、対象に対して、イメージング手順を実施しないのかを決定する、条項 8 7 に記載の方法。

10

【 0 4 8 8 】

条項 8 9 . イメージング手順が、実施される必要があるという、コンピュータプログラムによる決定が、陽性の結果として示される、条項 8 8 に記載の方法。

【 0 4 8 9 】

条項 9 0 . イメージング手順が、実施される必要がないという、コンピュータプログラムによる決定が、陰性の結果として示される、条項 8 8 に記載の方法。

20

30

40

50

【図面】

【図 1 A】

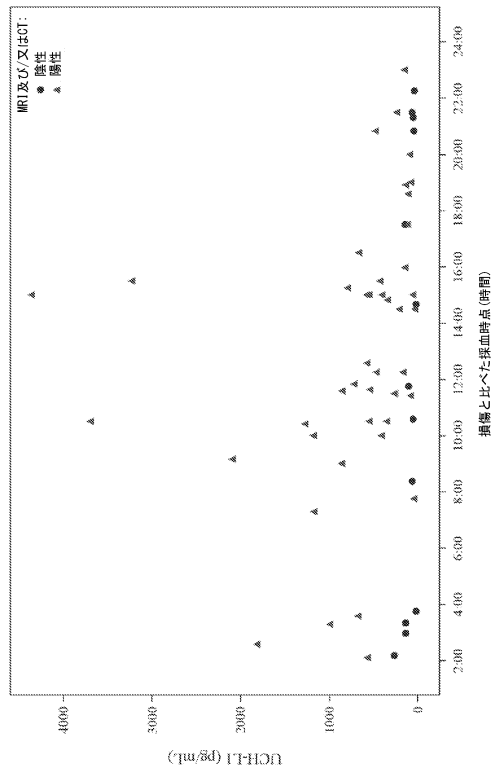


FIG. 1A

【図 1 B】

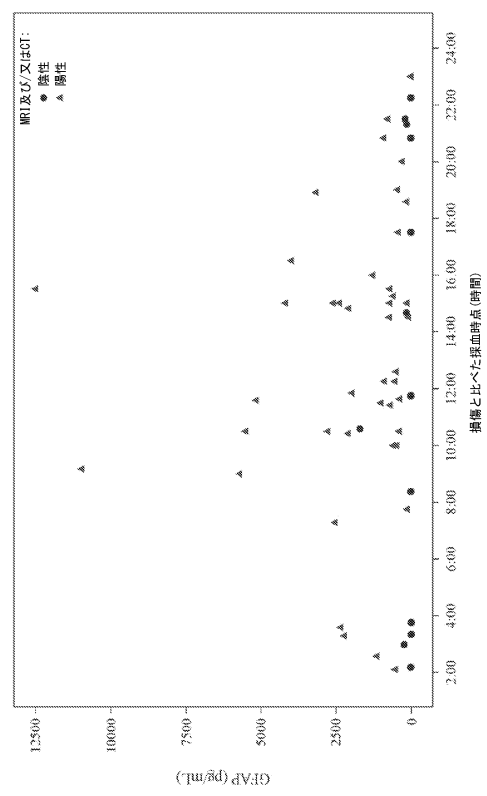


FIG. 1B

【図 2 A】

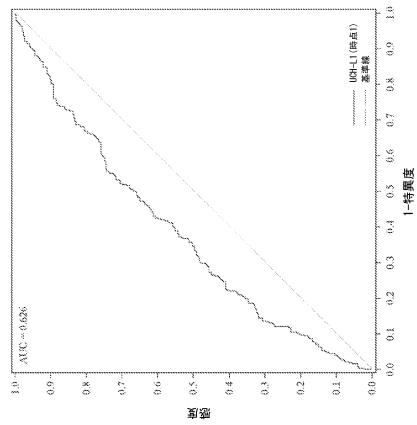


FIG. 2A

【図 2 B】

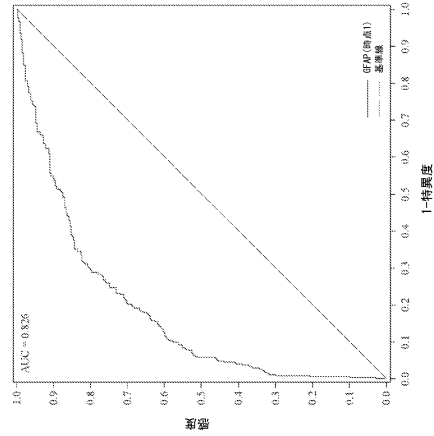


FIG. 2B

10

20

30

40

50

【図 3 A】

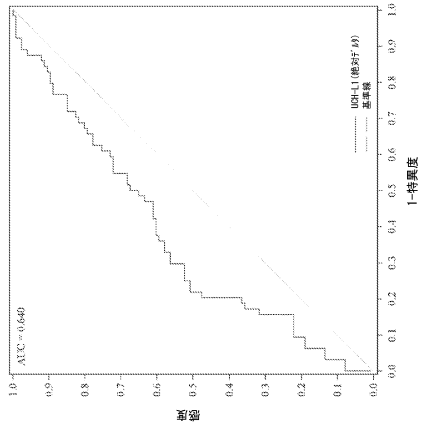


FIG. 3A

【図 3 B】

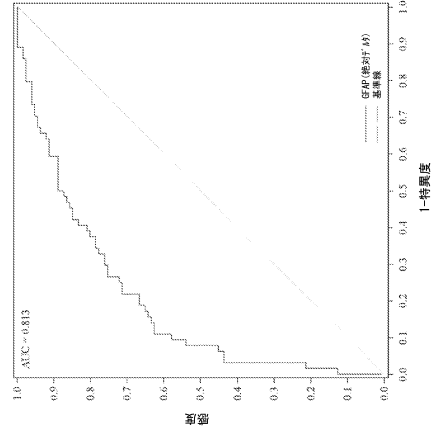


FIG. 3B

【図 4 A】

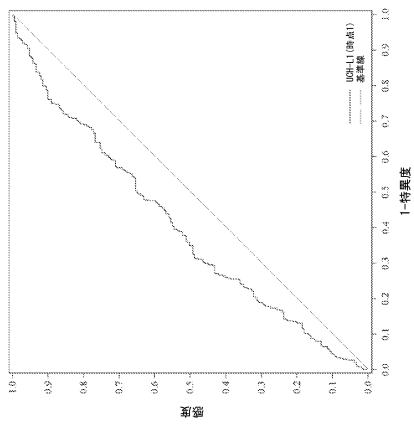


FIG. 4A

【図 4 B】

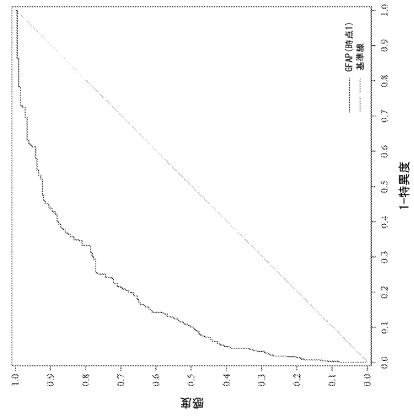


FIG. 4B

10

20

30

40

50

【図 5 A】

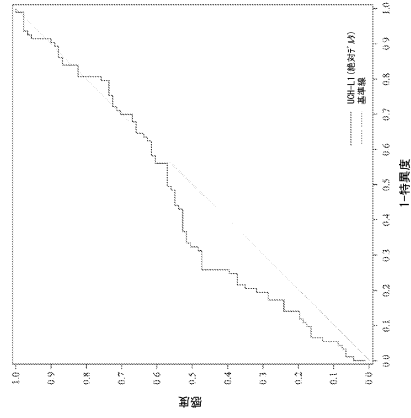


FIG. 5A

【図 5 B】

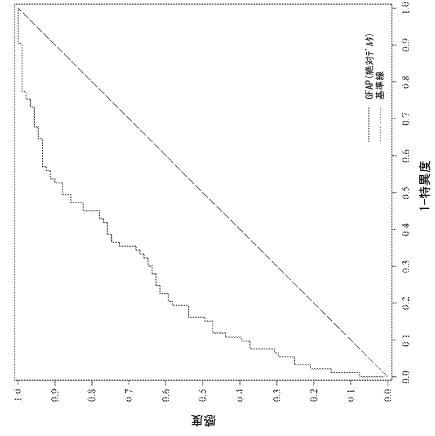


FIG. 5B

10

【図 6 A】

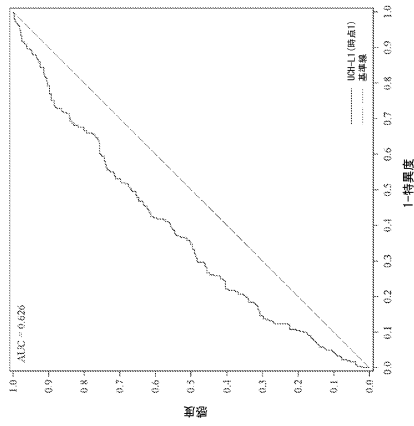


FIG. 6A

【図 6 B】

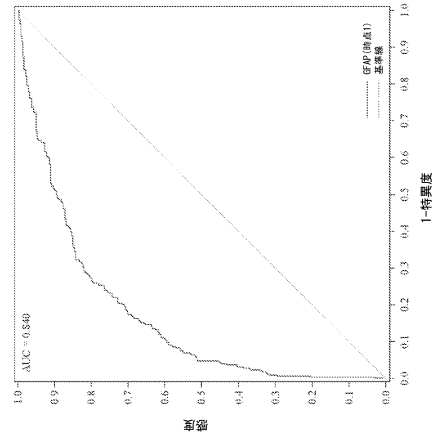


FIG. 6B

20

30

40

50

【図 7 A】

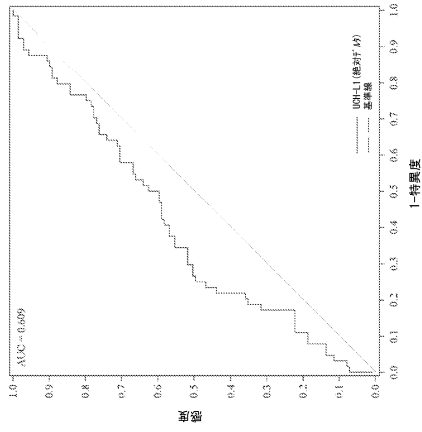


FIG. 7A

【図 7 B】

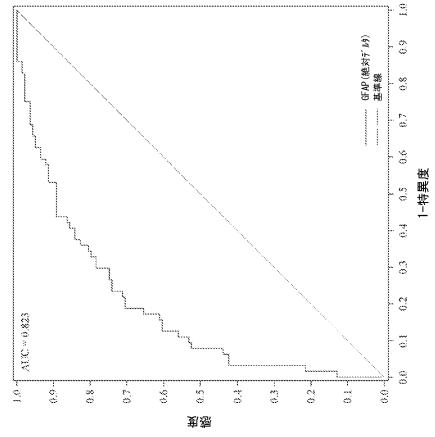


FIG. 7B

【図 8 A】

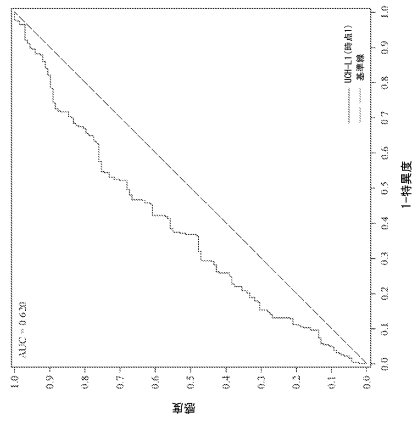


FIG. 8A

【図 8 B】

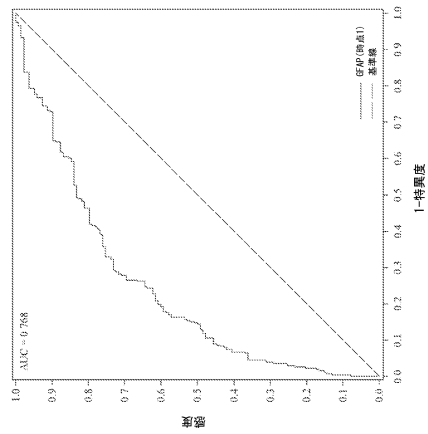


FIG. 8B

10

20

30

40

50

【図 9 A】

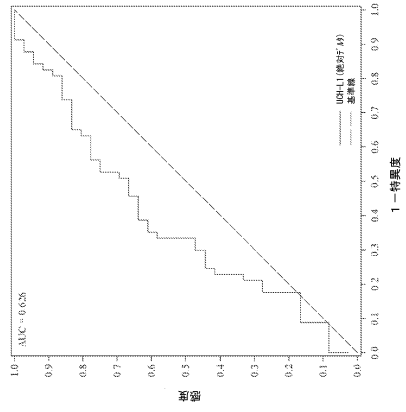


FIG. 9A

【図 9 B】

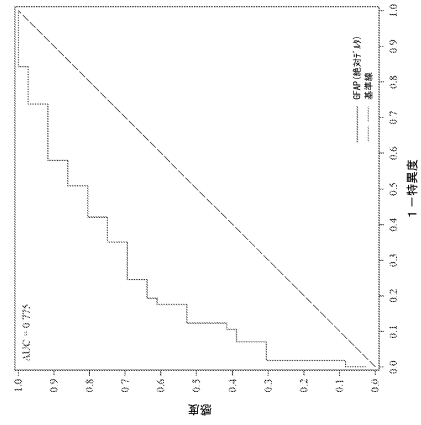


FIG. 9B

【配列表】

0007416625000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- ・ロード・１００、アボット・ラボラトリーズ気付
- (72)発明者 マリノ, ジェイミー
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・１００、アボット・ラボラトリーズ気付
- (72)発明者 チャンドラ, ラージ
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・１００、アボット・ラボラトリーズ気付
- (72)発明者 ジャン, テアミン
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・１００、アボット・ラボラトリーズ気付
- (72)発明者 ダトワイラー, ソール
アメリカ合衆国、イリノイ・６００６４、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・１００、アボット・ラボラトリーズ気付
- 審査官 海野 佳子
- (56)参考文献 国際公開第２０１６／０５５１４８（ＷＯ，Ａ２）
特表２０１１－５１１３０１（ＪＰ，Ａ）
特表２０１６－５３３４９９（ＪＰ，Ａ）
特表２０１２－５００３８８（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２０１７／００２３５９１（ＵＳ，Ａ１）
特表２０２０－５００５０８（ＪＰ，Ａ）
KOU, Z. et al. , Combining Biochemical and Imaging Markers to Improve Diagnosis and Characterization of Mild Traumatic Brain Injury in the Acute Setting: Results from a Pilot Study , PLOS ONE , 2013年11月 , Vol.8, No.11 , pp.1-14
DOUGLAS-ESCOBAR M. V. et al. , UCH-L1 and GFAP serum levels in neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy: a single center pilot study , frontiers in NEUROLOGY , 2014年12月19日 , Vol.5, Article 273 , pp.1-7
PAPA, L. et al. , Time Course and Diagnostic Accuracy of Glial and Neuronal Blood Biomarkers GFAP and UCH-L1 in a Large Cohort of Trauma Patients With and Without Mild Traumatic Brain Injury , JAMA Neurology , 2016年05月 , vol.73, No.5 , pp.551-560
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
A 6 1 B 6 / 0 0 - 6 / 1 4
A 6 1 B 5 / 0 5 5
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S (S T N)
医中誌WEB