



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110651190 A

(43)申请公布日 2020.01.03

(21)申请号 201880032730.6

(22)申请日 2018.05.25

(30)优先权数据

62/511,126 2017.05.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/034694 2018.05.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/218169 EN 2018.11.29

(71)申请人 雅培实验室

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 B·麦奎斯顿 J·罗杰斯

J·马力诺 R·钱德拉 T·张

S·德特维勒

(74)专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

代理人 杨黎峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

A61B 5/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书89页 附图11页

(54)发明名称

用早期生物标记物帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人受试者执行成像的方法

(57)摘要

本文公开了使用早期生物标记物如泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部损伤的人类受试者执行成像,诸如磁共振成像(MRI)或计算机断层(CT)扫描的方法。这些方法涉及在人类受试者已遭受或可能已遭受对头部损伤后24小时内的时间点取自所述受试者的样品中检测UCH-L1和/或GFAP的水平变化。

1. 一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法,所述方法包括:

a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

b) 确定是否当所述样品中早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时对所述受试者执行成像程序,且当所述样品中早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者执行成像程序。

其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或 (b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述参考水平是通过具有至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性的测定法确定的。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述参考水平在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中基于所述成像程序,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述成像程序是磁共振成像 (MRI) 或头部计算机断层 (CT) 扫描。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中将所述参考水平与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中将所述参考水平与颅内病变的存在相关联。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中将所述参考水平与未遭受头部损伤的对照受试者相关联。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中GFAP的所述参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法,其中UCH-L1的所述参考水平在约80pg/mL与约150pg/mL之间。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得所述样品。

13. 一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法,所述方法包括:

a) 对获自所述受试者的至少两种样品进行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自所述受试者的第一样品和在取得所述第一样品后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;

b) 检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

c) 确定是否当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平降低或

增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中基于所述成像程序,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

16. 根据权利要求13至15中任一项所述的方法,其中所述成像程序是磁共振成像或头部计算机断层(CT)扫描。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中将所述绝对量与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中将所述绝对量与颅内病变的存在相关联。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述绝对量是通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述绝对量是通过具有以下的测定法测定的:
(a) 至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性;或 (b) 至少约75%的敏感性和至少约40%的特异性。

21. 根据权利要求19或20所述的方法,其中所述绝对量在至少约10pg/mL与至少约150pg/mL之间。

22. 根据权利要求23所述的方法,其中所述早期生物标记物为UCH-L1且所述绝对量在至少约30pg/mL至约100pg/mL之间,所述早期生物标记物为GFAP且所述绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间,或其组合。

23. 根据权利要求13至22中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得所述第一样品。

24. 根据权利要求13至23中任一项所述的方法,其中所述第二样品在所述第一样品后约3小时至约6小时取自所述受试者。

25. 根据权利要求1至24中任一项所述的方法,其中测量所述UCH-L1的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

26. 根据权利要求1至25中任一项所述的方法,其中测量所述UCH-L1的水平包括:

A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

(1) UCH-L1捕获抗体,其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物,和

(2) UCH-L1检测抗体,其包括可检测标记并结合UCH-L1上不被所述UCH-L1捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,

使得形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,以及

B. 基于通过所述UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中UCH-L1的量或浓度。

27. 根据权利要求1至26中任一项所述的方法,其中测量所述GFAP的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的方法,其中测量所述GFAP的水平包括:

A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触：

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

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

使得形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物，以及

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

29. 根据权利要求1至28中任一项所述的方法，其中所述样品选自由以下组成的组：全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法，其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的对头部的损伤之后获得所述样品。

31. 根据权利要求1至30中任一项所述的方法，其中在所述受试者已摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

32. 根据权利要求31所述的方法，其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

33. 根据权利要求1至29中任一项所述的方法，其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的方法，其中所述方法可以对任何受试者进行，而不考虑选自由以下组成的组中的因素：所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高UCH-L1水平的表现，以及其中所述人类受试者可能已遭受对头部的损伤的任何事件的时序。

35. 根据权利要求1至34中任一项所述的方法，所述方法进一步包括用轻度创伤性脑损伤疗法治疗所述受试者。

36. 根据权利要求1至34中任一项的方法，其进一步包括监测所述受试者。

37. 根据权利要求1至36中任一项所述的方法，其中所述样品是全血样品。

38. 根据权利要求1至36中任一项所述的方法，其中所述样品是血清样品。

39. 根据权利要求1至36中任一项所述的方法，其中所述样品是血浆样品。

40. 根据权利要求37-39中任一项所述的方法，其中所述测定是免疫测定法。

41. 根据权利要求37-39中任一项所述的方法，其中所述测定是临床化学测定法。

42. 根据权利要求37-39中任一项所述的方法，其中所述测定是单分子检测测定法。

用早期生物标记物帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部 损伤的人受试者执行成像的方法

[0001] 相关申请信息

[0002] 本申请要求于2017年5月25日提交的美国申请号62/511,126的优先权,其内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过检测在人类受试者已遭受或可能已遭受对头部的损伤之后24小时内的时间点取自所述受试者的样品中早期生物标记物,诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合的水平变化,来帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像,诸如磁共振成像 (MRI) 或头部计算机断层 (CT) 扫描的方法。

背景技术

[0004] 仅在美国,每年就有超过500万例轻度创伤性脑损伤 (TBI) 发生。目前,没有简单、客观、准确的测量法可用于帮助患者评估。事实上,许多的TBI评价和诊断均是基于主观数据。不幸的是,诸如头部CT和格拉斯哥昏迷评分 (GCS) 的客观测量法在评价轻度TBI时不够全面或敏感。此外,头部CT对于轻度TBI的绝大多数时间来说是未见的,是昂贵的,并且使患者暴露于不必要的辐射。另外,阴性头部CT并不意味着患者已排除脑震荡;相反,它仅意味着某些干预措施,诸如手术是不保险的。临床医生和患者需要客观可靠的信息来准确评价这种情况,以促进适当的分诊和康复。迄今为止,可用于在急症护理环境中使用UCH-L1和GFAP帮助患者评价和管理的数据有限。

[0005] 轻度TBI或脑震荡更难以客观地检测并且在全球的紧急护理病房中呈现日常挑战。脑震荡通常不会引起大体病理,诸如出血,并且在大脑的常规计算机断层扫描中没有异常,而是快速发作的神经元功能障碍,其在几天到几周内以自发的方式消退。大约15%的轻度TBI患者罹患持续性认知功能障碍。对于在现场、在急诊室和诊所中、在体育区中和在军事活动(例如战斗)中的轻度TBI受害者而言存在尚未满足的需求。

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

[0007] 此外,当前的脑损伤试验还依赖于诸如扩展格拉斯哥结局的结果测量,其可捕捉全局现象,但无法评估结果的细微差异。因此,连续30次针对脑损伤治疗剂的试验失败了。需要敏感的结果测量来确定患者从脑损伤中恢复的状况,以便测试治疗方法和预防措施。

发明内容

[0008] 在一个方面,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像程序的方法。该方法包括:对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;且当所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者执行成像程序(“纳入”执行成像程序),并且当所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者执行成像程序(“排除”执行成像程序)。所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或(b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

[0009] 在另一方面,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像程序的方法。该方法包括:对获自所述受试者的至少两种样品执行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自受试者的第一样品和在取得第一样品之后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且当从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时,对所述受试者执行成像程序(“纳入”执行成像程序),且当从第一样品至第二样品的早期生物标记物水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序(“排除”执行成像程序)。

[0010] 在仍另一方面,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像程序的方法。该方法包括:

[0011] a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0012] b) 确定是否当所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者执行成像程序,且当所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者执行成像程序。

[0013] 其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或(b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。在早期生物标记物水平等于参考水平的情况下,将结果视为阴性,意味着不执行成像。

[0014] 在上述方法中,参考水平是通过具有至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,参考水平在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间。更具体而言,在一些实施方式中,GFAP的参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。在其它实施方式中,UCH-L1的参考水平为约80pg/mL和约150pg/mL。

[0015] 在上述用于确定或评价是否进行成像的方法中,基于已经进行的成像程序,诸如像MRI或CT扫描(意指在进行测定之前),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行成像程序(诸如MRI或CT扫描)以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种

成像程序(诸如MRI或CT扫描)。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的成像程序(诸如一次或多次MRI或CT扫描)以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。

[0016] 在上述方法的某些实施方式中,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有轻度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有重度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度至重度TBI。另外,基于MRI,受试者可能疑似未患TBI。

[0017] 在上述方法的某些实施方式中,所使用的参考水平与阳性MRI相关或相对应。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与阳性头部CT扫描相关或相对应。在另外其它实施方式中,参考水平与颅内病变相关或相对应。例如,参考水平可以与具有阳性MRI的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另选地,参考水平可以与具有阳性头部CT扫描的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另外,参考水平可以与具有颅内病变的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与未遭受任何TBI的对照受试者相关或相对应。

[0018] 在上述方法中,可在疑似头部损伤后约0至约12小时内取得样品。例如,可在疑似头部损伤后约5分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约10分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约12分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤15分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约20分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤30分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤60分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤1.5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤2小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤3小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤4小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤6小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤7小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤8小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤9小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤10小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤11小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤12小时内取得样品。

[0019] 在一个实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有轻度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有重度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度至重度TBI。在又另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为未患TBI。

[0020] 上述方法可以进一步包括用针对TBI的治疗(例如手术治疗、治疗性治疗或其组合)治疗被评估或评价为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的人类受试者。可以使用本领域已知的并且在本文中进一步描述的任何这类治疗。此外,在另一实施方式中,被针对TBI治疗的任何受试者还可以任选地在任何疗程期间和之后进行监测。另选地,所述方法可以进一步包括监测被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的受试者(诸如迄今为止可能仍未接受任何治疗的那些)。

[0021] 在上述方法中,样品可以选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品

或血浆样品。在一些实施方式中,样品是全血样品。在一些实施方式中,样品是血浆样品。在又其它实施方式中,样品是血清样品。这种样品可以以多种方式获得。例如,可以在受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。另选地,可以在受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。化学物质或毒素的实例是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。仍进一步地,样品可以从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0022] 任何上述方法可以对任何人类受试者进行,而不考虑选自以下组成的组中的因素:人类受试者的临床病状、人类受试者的实验室值、人类受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度TBI的分类、人类受试者的低或高UCH-L1、GFAP和或UCH-L1和GFAP水平的表现,以及其中人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0023] 在上述方法中,测定为免疫测定法。在一些实施方式中,测定法为定点照护测定法。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血浆。

[0024] 在又另一方面,本发明涉及一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法。该方法包括以下步骤:

[0025] a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0026] b) 确定是否当所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者执行成像程序,且当所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者执行成像程序。

[0027] 其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或 (b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。在早期生物标记物水平等于参考水平的情况下,将结果视为阴性,意味着不执行成像。

[0028] 在上述方法中,参考水平是通过具有至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,参考水平在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间。更具体而言,在一些实施方式中,GFAP的参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。在其它实施方式中,UCH-L1的参考水平为约80pg/mL和约150pg/mL。

[0029] 在上述用于确定或评价是否进行成像的方法中,基于已经进行的成像程序,诸如像MRI或CT扫描(意指在进行测定之前),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行成像程序(诸如MRI或CT扫描)以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种成像程序(诸如MRI或CT扫描)。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的成像程序(诸如一次或多次MRI或CT扫描)以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。

[0030] 在上述方法的某些实施方式中,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有轻度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有重度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度至重度TBI。另外,基于MRI,受试者可能疑似未患TBI。

[0031] 在上述方法的某些实施方式中,所使用的参考水平与阳性MRI相关或相对应。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与阳性头部CT扫描相关或相对应。在另外其它实施方式中,参考水平与颅内病变相关或相对应。例如,参考水平可以与具有阳性MRI的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另选地,参考水平可以与具有阳性头部CT扫描的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另外,参考水平可以与具有颅内病变的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与未遭受任何TBI的对照受试者相关或相对应。

[0032] 在上述方法中,可在疑似头部损伤后约0至约12小时内取得样品。例如,可在疑似头部损伤后约5分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约10分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约12分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤15分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约20分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤30分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤60分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤1.5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤2小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤3小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤4小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤6小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤7小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤8小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤9小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤10小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤11小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤12小时内取得样品。

[0033] 在一个实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有轻度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有重度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度至重度TBI。在又另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为未患TBI。

[0034] 上述方法可以进一步包括用针对TBI的治疗(例如手术治疗、治疗性治疗或其组合)治疗被评估或评价为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的人类受试者。可以使用本

领域已知的并且在本文中进一步描述的任何这类治疗。此外,在另一实施方式中,被针对TBI治疗的任何受试者还可以任选地在任何疗程期间和之后进行监测。另选地,所述方法可以进一步包括监测被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的受试者(诸如迄今为止可能仍未接受任何治疗的那些)。

[0035] 在上述方法中,样品可以选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品或血浆样品。在一些实施方式中,样品是全血样品。在一些实施方式中,样品是血浆样品。在又其它实施方式中,样品是血清样品。这种样品可以以多种方式获得。例如,可以在受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。另选地,可以在受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。化学物质或毒素的实例是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。仍进一步地,样品可以从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0036] 上述方法可以对任何人类受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:人类受试者的临床病状、人类受试者的实验室值、人类受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度TBI的分类、人类受试者的低或高UCH-L1、GFAP和或UCH-L1和GFAP水平的表现,以及其中人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0037] 在上述方法中,测定为免疫测定法。在一些实施方式中,测定法为定点照护测定法。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血浆。

[0038] 在仍另一方面,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像程序的方法。该方法包括:

[0039] a) 对获自所述受试者的至少两种样品进行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自所述受试者的第一样品和在取得所述第一样品后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;

[0040] b) 检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0041] c) 确定是否当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程

序。

[0042] 在上述方法中,绝对量是通过具有至少约70%之间的敏感性和至少约100%的特异性以及在至少约30%至100%的敏感性的测定法确定的。在一些实施方式中,绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间。更具体而言,在一些实施方式中,GFAP的绝对量在约30pg/mL与约100pg/mL之间。在其它实施方式中,UCH-L1的绝对量为约10pg/mL和约150pg/mL。

[0043] 在上述方法中,测量UCH-L1的水平包括:

[0044] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0045] (1) UCH-L1捕获抗体,其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物,和

[0046] (2) UCH-L1检测抗体,其包括可检测标记并结合UCH-L1上不被所述UCH-L1捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,

[0047] 使得形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,并且

[0048] B. 基于通过所述UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中UCH-L1的量或浓度。

[0049] 另选地,在上述方法中,测量GFAP的水平包括:

[0050] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0051] (1) GFAP捕获抗体,其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物,和

[0052] (2) GFAP检测抗体,其包括可检测标记并结合GFAP上不被所述GFAP捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,

[0053] 使得形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,并且

[0054] B. 基于通过所述GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中GFAP的量或浓度。

[0055] 在上述用于确定或评价是否进行成像的方法中,基于已经进行的成像程序,诸如像MRI或CT扫描(意指在进行测定之前),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行成像程序(诸如MRI或CT扫描)以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种成像程序(诸如MRI或CT扫描)。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的成像程序(诸如一次或多次MRI或CT扫描)以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。

[0056] 在上述方法的某些实施方式中,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有轻度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有重度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度至重度TBI。另外,基于MRI,受试者可能疑似未患TBI。

[0057] 在上述方法的某些实施方式中,所使用的参考水平与阳性MRI相关或相对应。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与阳性头部CT扫描相关或相对应。在另外其它实施方

式中,参考水平与颅内病变相关或相对应。例如,参考水平可以与具有阳性MRI的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另选地,参考水平可以与具有阳性头部CT扫描的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另外,参考水平可以与具有颅内病变的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与未遭受任何TBI的对照受试者相关或相对应。

[0058] 在上述方法中,可在疑似头部损伤后约0至约12小时内取得样品。例如,可在疑似头部损伤后约5分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约10分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约12分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤15分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约20分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤30分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤60分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤1.5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤2小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤3小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤4小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤6小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤7小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤8小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤9小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤10小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤11小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤12小时内取得样品。

[0059] 在一个实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有轻度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有重度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度至重度TBI。在又另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为未患TBI。

[0060] 上述方法可以进一步包括用针对TBI的治疗(例如手术治疗、治疗性治疗或其组合)治疗被评估或评价为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的人类受试者。可以使用本领域已知的并且在本文中进一步描述的任何这类治疗。此外,在另一实施方式中,被针对TBI治疗的任何受试者还可以任选地在任何疗程期间和之后进行监测。另选地,所述方法可以进一步包括监测被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的受试者(诸如迄今为止可能仍未接受任何治疗的那些)。

[0061] 在上述方法中,样品可以选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品或血浆样品。在一些实施方式中,样品是全血样品。在一些实施方式中,样品是血浆样品。在又其它实施方式中,样品是血清样品。这种样品可以以多种方式获得。例如,可以在受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。另选地,可以在受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。化学物质或毒素的实例是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。仍进一步地,样品可以从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0062] 上述方法可以对任何人类受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:人类受试者的临床病状、人类受试者的实验室值、人类受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度TBI的分类、人类受试者的低或高UCH-L1、GFAP和或UCH-L1和GFAP水平的表

现,以及其中人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0063] 在上述方法中,测定为免疫测定法。在一些实施方式中,测定法为定点照护测定法。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血浆。

[0064] 在又另一方面,本公开涉及一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法。该方法包括以下步骤:

[0065] a) 对获自所述受试者的至少两种样品进行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自所述受试者的第一样品和在取得所述第一样品后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;

[0066] b) 检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0067] c) 确定是否当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序。

[0068] 在上述方法中,绝对量是通过具有至少约70%之间的敏感性和至少约100%的特异性以及在至少约30%至100%的敏感性的测定法确定的。在一些实施方式中,绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间。更具体而言,在一些实施方式中,GFAP的绝对量在约30pg/mL与约100pg/mL之间。在其它实施方式中,UCH-L1的绝对量为约10pg/mL和约150pg/mL。

[0069] 在上述方法中,测量UCH-L1的水平包括:

[0070] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0071] (1) UCH-L1捕获抗体,其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物,和

[0072] (2) UCH-L1检测抗体,其包括可检测标记并结合UCH-L1上不被所述UCH-L1捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,

[0073] 使得形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,并且

[0074] B. 基于通过所述UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中UCH-L1的量或浓度。

[0075] 另选地,在上述方法中,测量GFAP的水平包括:

[0076] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0077] (1) GFAP捕获抗体,其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物,和

[0078] (2) GFAP检测抗体,其包括可检测标记并结合GFAP上不被所述GFAP捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,

[0079] 使得形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,并且

[0080] B. 基于通过所述GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中GFAP的量或浓度。

[0081] 在上述用于确定或评价是否进行成像的方法中,基于已经进行的成像程序,诸如像MRI或CT扫描(意指在进行测定之前),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,根据受试者的医疗状况(诸如如果患者失去意识),可在受试者到达急诊室、创伤中心或其它场所后不久进行成像程序(诸如MRI或CT扫描)以评估和/或评价受试者是否患有TBI。可以在进行用于证实和确定受试者是否患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的测定之前进行这种成像程序(诸如MRI或CT扫描)。在进行测定之后,可以基于测定结果进行一次或多次随后的成像程序(诸如一次或多次MRI或CT扫描)以作为医师(或其它医务人员)对TBI管理的一部分(诸如以确定是否可能需要手术和/或药物干预)。

[0082] 在上述方法的某些实施方式中,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有创伤性脑损伤。例如,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有轻度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有重度TBI。另选地,基于成像程序(诸如MRI或CT扫描),受试者可能疑似患有中度至重度TBI。另外,基于MRI,受试者可能疑似未患TBI。

[0083] 在上述方法的某些实施方式中,所使用的参考水平与阳性MRI相关或相对应。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与阳性头部CT扫描相关或相对应。在另外其它实施方式中,参考水平与颅内病变相关或相对应。例如,参考水平可以与具有阳性MRI的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另选地,参考水平可以与具有阳性头部CT扫描的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。另外,参考水平可以与具有颅内病变的受试者相关或相对应(诸如通过参考水平的增加或减少)。在上述方法的其它实施方式中,参考水平与未遭受任何TBI的对照受试者相关或相对应。

[0084] 在上述方法中,可在疑似头部损伤后约0至约12小时内取得样品。例如,可在疑似头部损伤后约5分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约10分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约12分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤15分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤约20分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤30分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤60分钟内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤1.5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤2小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤3小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤4小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤5小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤6小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤7小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤8小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤9小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤10小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤11小时内取得样品。另选地,可在疑似头部损伤12小时内取得样品。

[0085] 在一个实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有轻度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有重度TBI。在另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为患有中度至重度TBI。在又另一实施方式中,使用上述方法,受试者被评估或评价为未患TBI。

[0086] 上述方法可以进一步包括用针对TBI的治疗(例如手术治疗、治疗性治疗或其组合)治疗被评估或评价为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的人类受试者。可以使用本领域已知的并且在本文中进一步描述的任何这类治疗。此外,在另一实施方式中,被针对TBI治疗的任何受试者还可以任选地在任何疗程期间和之后进行监测。另选地,所述方法可以进一步包括监测被评估为患有轻度、中度、重度或中度至重度TBI的受试者(诸如迄今为止可能仍未接受任何治疗的那些)。

[0087] 在上述方法中,样品可以选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品或血浆样品。在一些实施方式中,样品是全血样品。在一些实施方式中,样品是血浆样品。在又其它实施方式中,样品是血清样品。这种样品可以以多种方式获得。例如,可以在受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的头部损伤之后获得样品。另选地,可以在受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得样品。化学物质或毒素的实例是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。仍进一步地,样品可以从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0088] 上述方法可以对任何人类受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:人类受试者的临床病状、人类受试者的实验室值、人类受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度TBI的分类、人类受试者的低或高UCH-L1、GFAP和或UCH-L1和GFAP水平的表现,以及其中人类受试者可能已遭受头部损伤的任何事件的时序。

[0089] 在上述方法中,测定为免疫测定法。在一些实施方式中,测定法为定点照护测定法。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为全血。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血清。在又其它实施方式中,测定法为免疫测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为定点照护测定法,受试者为人类且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为临床化学测定法,且样品为血浆。在又其它实施方式中,测定法为单分子检测测定法,且样品为血浆。

附图说明

[0090] 图1A显示示例性受试者子组中相对于距损伤的时间的生物标记物UCH-L1结果。

[0091] 图1B显示示例性受试者子组中相对于距损伤的时间的生物标记物GFAP结果。

[0092] 图2A和2B显示对与使用时间点的MRI的存在或不存在颅内病变结果相关的UCH-L1水平(图2A)和GFAP水平(图2B)的接受者操作特征(ROC)分析。样品在头部损伤24小时内取得。

[0093] 图3A示出了对与使用MRI的存在或不存在颅内病变结果相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0094] 图3B示出了对与使用MRI的存在或不存在颅内病变相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的GFAP水平与时间点1处的GFAP水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0095] 图4A和4B显示对与使用时间点的CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关的UCH-L1水平(图4A)和GFAP水平(图4B)的接受者操作特征(ROC)分析。样品在头部损伤24小时内取得。

[0096] 图5A示出了对与使用CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0097] 图5B示出了对与使用CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的GFAP水平与时间点1处的GFAP水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0098] 图6A和6B显示对与使用时间点的MRI或CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关的UCH-L1水平(图6A)和GFAP水平(图6B)的接受者操作特征(ROC)分析。样品在头部损伤24小时内取得。

[0099] 图7A示出了对与使用MRI或CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0100] 图7B示出了对与使用MRI或CT扫描的存在或不存在颅内病变结果相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的GFAP水平与时间点1处的GFAP水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0101] 图8A和8B显示对与使用时间点的MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关的UCH-L1水平(图8A)和GFAP水平(图8B)的接受者操作特征(ROC)分析。样品在头部损伤24小时内取得。

[0102] 图9A示出了对与使用MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对

差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

[0103] 图9B示出了对与使用MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”)(即时间点2处的GFAP水平与时间点1处的GFAP水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析。时间点1处的样品在头部损伤24小时内取得,而时间点2处的样品在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得。

具体实施方式

[0104] 本公开涉及基于早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的水平,帮助确定已遭受或可能已遭受对头部的损伤的受试者是否将受益于并因此接受成像程序,诸如磁共振成像(MRI)或头部计算机断层(CT)扫描的方法。这些方法涉及检测在对头部损伤或疑似头部损伤约24小时内的时间点(例如0至12小时)取自人类受试者的一个或多个样品中的早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)水平。在对头部损伤或疑似损伤后约前24小时内检测到早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)高于早期生物标记物的参考水平帮助确定人类受试者是否应该接受成像程序,即“纳入”成像程序。例如,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的水平高于早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平的人类受试者也可以鉴定为可能具有阳性头部CT扫描或阳性MRI,即存在颅内病变,(例如因此指示潜在TBI)且因此受益于具有头部CT扫描或MRI。另选地,早期生物标记物的某些水平可用于“排除”对成像程序的需要。例如,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的水平低于早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平的人类受试者也可以鉴定为可能具有阴性头部CT扫描或阴性MRI,即不存在颅内病变,且因此将不需要或执行头部CT扫描或MRI。

[0105] 本发明涉及参与检测在对头部损伤或疑似头部损伤24小时内的不同时间点取自人类受试者的一个或多个样品中的早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)水平的方法。在对头部损伤或疑似损伤后约前24小时内检测到早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的水平增加或升高,可能之后为早期生物标记物水平的后续降低,这帮助确定人类受试者是否应该接受成像程序,诸如MRI或头部CT扫描。例如,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)至少增加或降低绝对量的人类受试者也可能鉴定为可能具有阳性头部CT扫描或阳性MRI,即存在颅内病变(例如因此指示潜在TBI)且因此受益于具有头部CT扫描或MRI,即“纳入”成像程序。另选地,没有降低或增加早期生物标记物的至少绝对量可用于“排除”对成像程序的需要。例如,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的水平变化小于绝对量的人类受试者也可以鉴定为可能具有阴性头部CT扫描或阴性MRI,即不存在颅内病变,且因此将不需要或执行头部CT扫描或MRI。

[0106] 为避免任何疑问,在约24小时内的时间点处从人类受试者取得一个或多个样品是指在该所述24小时时段获得所述样品且执行测定的事实。

[0107] 如本章节和本文的整个公开中使用的章节标题仅用于组织目的并且不旨在是限制性的。

[0108] 1. 定义

[0109] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员

通常所理解的相同的含义。当发生冲突时,以本文件(包括定义)为准。虽然在本发明的实践或测试中可以使用与本文所描述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但以下描述了优选的方法和材料。本文提及的所有公开、专利申请、专利以及其它参考文献以全文引用并入。本文公开的材料、方法和实例仅是示例性的并且不旨在是限制性的。

[0110] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”、“有”、“可以”、“含有”以及其变化形式意图是不排除另外行为或结构的可能性的开放式连接词、术语或词语。除非上下文另外清楚地说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数引用。本公开还涵盖“包括本文所呈现的实施方式或要素”、“由本文所呈现的实施方式或要素组成”以及“主要由本文所呈现的实施方式或要素组成”的其它实施方式,无论是否明确地提出。

[0111] 对于本文数值范围的叙述来说,明确地涵盖具有相同精确度的介于其间的每个中间数字。例如,对于范围6-9,除6和9之外还涵盖数字7和8,并且对于范围6.0-7.0,明确涵盖数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9和7.0。

[0112] “亲和力成熟抗体”在本文用于指在一个或多个CDR中具有一个或多个变化的抗体,所述变化导致所述抗体与不具有所述变化的亲本抗体相比对于靶抗原的亲和力(即 K_D 、 k_d 或 k_a)提高。示例性亲和力成熟抗体将对于靶抗原具有纳摩尔浓度或甚至皮摩尔浓度的亲和力。用于产生亲和力成熟抗体的多种程序在本领域中是已知的,包括对使用生物展示制备的组合抗体文库的筛选。例如,Marks等人,BioTechnology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机诱变由以下描述:Barbas等人,Proc.Nat.Acad.Sci.USA,91:3809-3813(1994);Schier等人,Gene,169:147-155(1995);Yelton等人,J.Immunol.,155:1994-2004(1995);Jackson等人,J.Immunol.,154(7):3310-3319(1995);和Hawkins等人,J.Mol.Biol.,226:889-896(1992)。在选择性诱变位置和/或在接触或超突变位置由活性增强氨基酸残基进行的选择性突变描述于美国专利号6,914,128B1。

[0113] 如本文所用的“一种抗体”和“多种抗体”是指单克隆抗体、多特异性抗体、人类抗体、人源化抗体(完全或部分人源化的)、动物抗体诸如但不限于鸟(例如鸭或鹅)、鲨鱼、鲸鱼和哺乳动物(包括非灵长类动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔子、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠、小鼠等)或非人灵长类动物(例如猴子、黑猩猩等))、重组抗体、嵌合抗体、单链Fv(“scFv”)、单链抗体、单结构域抗体、Fab片段、F(ab')片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv(“sdFv”)和抗独特型(“抗Id”)抗体、双结构域抗体、双可变结构域(DVD)或三可变结构域(TVD)抗体(双可变结构域免疫球蛋白及其制备方法描述于Wu,C等人,Nature Biotechnology,25(11):1290-1297(2007)和PCT国际申请W0 2001/058956,其各自内容通过引用并入本文),以及任何上述抗体的功能活性的表位结合片段。具体地,抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性片段,即含有分析物结合位点的分子。免疫球蛋白分子可具有任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。为简单起见,针对分析物的抗体在本文中通常称为“抗分析物抗体”或仅仅是“分析物抗体”(例如抗UCH-L1抗体或UCH-L1抗体)。

[0114] 如本文所用的“抗体片段”是指包含抗原结合位点或可变区的完整抗体的一部分。所述部分不包括完整抗体Fc区的恒定重链结构域(即CH2、CH3或CH4,取决于抗体同种型)。抗体片段的实例包括但不限于Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab')₂片段、Fd片段、Fv

片段、双抗体、单链Fv (scFv) 分子、仅含有一个轻链可变结构域的单链多肽、含有轻链可变结构域的三个CDR的单链多肽、仅含有一个重链可变区的单链多肽,以及含有重链可变区的三个CDR的单链多肽。

[0115] “曲线下面积”或“AUC”是指ROC曲线下的面积。ROC曲线下的AUC是精确度的度量。AUC为1表示完美测试,而AUC为0.5表示无意义的测试。优选的AUC可以是至少大约0.700、至少大约0.750、至少大约0.800、至少大约0.850、至少大约0.900、至少大约0.910、至少大约0.920、至少大约0.930、至少大约0.940、至少大约0.950、至少大约0.960、至少大约0.970、至少大约0.980、至少大约0.990、或至少大约0.995。

[0116] “珠粒”和“颗粒”在本文中可互换使用,并且是指基本上球形的固体支持物。珠粒或颗粒的一个实例是微粒。可用于本文的微粒可以是本领域中已知的任何类型。例如,珠粒或颗粒可以是磁性珠粒或磁性颗粒。磁性珠粒/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁性的、超顺磁性的或铁磁流体的。示例性铁磁材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO以及NiO/Fe。亚铁磁材料的实例包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄ (或FeO·Fe₂O₃)。珠粒可以具有磁性的实心核心部分并且被一个或多个非磁性层包围。另选地,磁性部分可以是围绕非磁性核心的层。微粒可具有在本文所述方法中起作用的任何尺寸,例如,约0.75至约5nm、或约1至约5nm、或约1至约3nm。

[0117] “结合蛋白”在本文中用于指与结合配偶体结合并与其形成复合物的单体或多聚体蛋白质,诸如像多肽、抗原、化学化合物或其它分子、或任何种类的底物。结合蛋白特异性结合结合配偶体。结合蛋白包括抗体,以及其抗原结合片段和其本领域中已知的和下文所述的其它各种形式和衍生物,以及包含一个或多个结合抗原分子或抗原分子上的特定位点(表位)的抗原结合域的其它分子。因此,结合蛋白包括但不限于抗体、四聚体免疫球蛋白、IgG分子、IgG1分子、单克隆抗体、嵌合抗体、CDR嫁接抗体、人源化抗体、亲和力成熟抗体、和任何此类抗体的保留结合抗原的能力的片段。

[0118] “双特异性抗体”在本文中用于指通过以下技术产生的全长抗体:四源杂交瘤技术(参见Milstein等人,Nature,305 (5934):537-540 (1983));通过两个不同单克隆抗体的化学缀合(参见Staerz等人,Nature,314 (6012):628-631 (1985));或通过在Fc区中引入突变的钮-入-孔法或类似方法(参见Holliger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90 (14):6444-6448 (1993)),所述方法产生多种不同免疫球蛋白物质,其中仅一者是功能性双特异性抗体。双特异性抗体在其两个结合臂的一者(一对HC/LC)上结合一种抗原(或表位),且其第二臂(一对不同的HC/LC)上结合不同的抗原(或表位)。根据这个定义,双特异性抗体具有两个不同抗原结合臂(在特异性和CDR序列两方面),并且对于其结合的各抗原而言是单价的。

[0119] “CDR”在本文中用于指抗体可变结构序列内的“互补决定区”。在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDR。对于每个可变区,从重链或轻链的N末端开始,这些区域表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。如本文所用的术语“CDR组”是指存在于单一可变区中的结合抗原的三个CDR的组。因此,抗原结合位点可以包括六个CDR,其包含来自重链和轻链可变区中的每一个的CDR组。包含单个CDR (例如CDR1、CDR2或CDR3) 的多肽可以称为“分子识别单元”。抗原-抗体复合物的晶体学分析已证明CDR的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3。因此,分子识别单元可能主要负责抗原结合位点的特异性。总体上,CDR残基直接地并且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0120] 这些CDR的精确边界已根据不同系统加以不同界定。由Kabat (Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 和 (1991)) 所述的系统不仅提供可适用于抗体的任何可变区的明确残基编号系统, 而且也提供界定三个CDR的精确残基边界。这些CDR可以称为“Kabat CDR”。Chothia和同事 (Chothia和Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987) 以及Chothia等人, Nature 342:877-883 (1989)) 发现尽管在氨基酸序列的层面上具有巨大多样性, 但Kabat CDR内的某些子部分采用几乎相同的肽骨架构象。这些子部分被指定为“L1”、“L2”和“L3”或“H1”、“H2”和“H3”, 其中“L”和“H”分别表示轻链区和重链区。这些区域可称为“Chothia CDR”, 其具有与Kabat CDR重叠的边界。界定与Kabat CDR重叠的CDR的其它边界已由Padlan, FASEB J., 9:133-139 (1995) 和MacCallum, J. Mol. Biol., 262 (5):732-745 (1996) 描述。其它CDR边界定义可能不严格遵循本文中系统之一, 但将仍然与Kabat CDR重叠, 但鉴于特定残基或残基群组或甚至整个CDR不会显著影响抗原结合的预测或实验发现而可将它们缩短或延长。本文所用的方法可利用根据这些系统中的任一个定义的CDR, 但某些实施方式使用Kabat或Chothia定义的CDR。

[0121] “组分”、“多种组分”或“至少一种组分”通常指可以包括在用于根据本文所述的方法和本领域中已知的其它方法测定测试样品 (诸如患者尿液、全血、血清或血浆样品) 的试剂盒中的捕获抗体、检测物或缀合物、校准物、对照、敏感性组、容器、缓冲液、稀释剂、盐、酶、酶的辅因子、检测试剂、预处理试剂/溶液、底物 (例如作为溶液)、终止液等。一些组分可以在溶液中或被冻干以进行重构用于在测定中使用。

[0122] 如本文所用的“与…相关”是指比较。

[0123] 如本文所用的“CT扫描”是指计算机断层 (CT) 扫描。CT扫描组合了从不同角度拍摄的一系列X射线图像, 并且使用计算机处理来创建您体内骨骼、血管和软组织的横截面图像或切片。CT扫描可以使用X射线CT、正电子发射断层扫描 (PET)、单光子发射计算机断层扫描 (SPECT)、计算机轴向断层扫描 (CAT扫描) 或计算机辅助断层扫描。CT扫描可以是常规CT扫描或螺旋/螺旋式CT扫描。在常规的CT扫描中, 逐个切片地进行扫描, 并且在每个切片之后扫描停止并向下移动到下一个切片, 例如, 从腹部的顶部向下移动到骨盆。常规的CT扫描要求患者屏住呼吸以避免运动伪影。螺旋/螺旋式CT扫描是连续扫描, 其以螺旋方式拍摄, 并且是其中扫描图像是连续的更快过程。

[0124] “通过测定法确定的”在本文中用于指通过任何适当的测定法对参考水平的确定。参考水平的确定在一些实施方式中可以通过与待应用于来自受试者的样品的测定法相同类型的测定法来实现 (例如通过免疫测定法、临床化学测定法、单分子检测测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析法、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法或色谱或光谱法, 诸如高效液相色谱法 (HPLC) 或液相色谱-质谱法 (LC/MS))。参考水平的确定在一些实施方式中可以通过与待应用于来自受试者的样品的测定法相同类型的测定法和在相同的测定条件下实现。如本文所指出的, 本公开提供了示例性参考水平 (例如通过比较不同时间点的参考水平计算)。基于本公开提供的描述针对其它测定法修改本文的公开以获得用于那些其它测定法的测定法特异性参考水平是完全在本领域普通技术人员的能力范围内的。例如, 一组训练样品, 包括从已知已遭受对头部的损伤的人类受试者获得的样品 (且更具体

地,从已知已遭受(i)轻度TBI;和/或(ii)中度、重度或中度至重度TBI的人类受试者获得的样品和从已知未遭受对头部的损伤的人类受试者获得的样品)可用于获得测定法特异性参考水平。应当理解,“通过测定法确定的”并具有所列举的“敏感性”和/或“特异性”水平的参数水平在本文中用于指这样的参考水平,所述参考水平已经被确定当在本发明的方法中采用时提供所列举的敏感性和/或特异性的方法。例如通过对使用多个不同的可能参考水平的测定数据的重复统计分析确定与本发明方法中给定参考水平相关的敏感性和特异性是完全在本领域普通技术人员的能力范围内的。

[0125] 实际上,当区分受试者为患有创伤性脑损伤或未患创伤性脑损伤或受试者为患有轻度与中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤时,熟练人员将平衡提高敏感性和特异性的截止值的影响。升高或降低截止值将对敏感性和特异性以及其它标准统计测量产生明确且可预测的影响。众所周知,提高截止值将改善特异性,但可能会恶化敏感性(与那些测试呈阳性的疾病患者成比例)。相比之下,降低截止值将改善特异性,但将会恶化敏感性(与测试呈阴性的未患疾病的那些成比例)。用于检测创伤性脑损伤或确定轻度相对中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的后果对于本领域技术人员而言将是显而易见的。在区分受试者是否患有创伤性脑损伤或轻度相对中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤时,截止值越高,特异性越高,因为更多的真阴性数(即未患创伤性脑损伤、未患轻度创伤性脑损伤、未患中度创伤性脑损伤、未患重度创伤性脑损伤或未患中度至重度创伤性脑损伤的受试者)与患有创伤性脑损伤、轻度创伤性脑损伤、中度创伤性脑损伤、重度创伤性脑损伤或中度至重度创伤性脑损伤的那些区分开来。但是同时,提高截止值会减少鉴别为总体上阳性的病例数,以及真阳性的病例数,因此敏感性必然降低。相反地,截止值越低,敏感性越高,因为更多的真阳性数(即患有创伤性脑损伤、患有轻度创伤性脑损伤、患有中度创伤性脑损伤、患有重度创伤性脑损伤或患有中度至重度创伤性脑损伤的受试者)与未患创伤性脑损伤、轻度创伤性脑损伤、中度创伤性脑损伤、重度创伤性脑损伤或中度至重度创伤性脑损伤的那些区分开来。但是同时,降低截止值会增加鉴别为总体上阳性的病例数,以及假阳性的数目,因此特异性必然降低。

[0126] 通常,高敏感性值有助于技术人员排除疾病或病状(诸如创伤性脑损伤、轻度创伤性脑损伤、中度创伤性脑损伤、重度创伤性脑损伤或中度至重度创伤性脑损伤)且高特异性值有助于技术人员纳入疾病或病状。技术人员是要排除疾病还是要纳入疾病取决于每种错误类型对患者的后果。因此,在不完全公开有关如何选择值的基础信息的情况下,无法知道或预测用于得出测试截止值的精确平衡。敏感性对特异性及其它因素之间的平衡将基于情况而不同。这就是为什么有时优选提供替代的截止值(例如参考值),以便医师或医生可以选择。

[0127] 如本文所用的抗体的“衍生物”可以是指与真正或亲本抗体相比具有对其氨基酸序列的一个或多个修饰的抗体并且表现出修饰的结构域结构。衍生物仍然可以能够采用天然抗体中发现的典型结构域配置,以及能够特异性结合靶标(抗原)的氨基酸序列。抗体衍生物的典型实例是与其它多肽偶联的抗体、重排的抗体结构域、或抗体片段。衍生物还可以包含至少一种其它化合物,例如蛋白质结构域,所述蛋白质结构域通过共价或非共价键连接。根据本领域中已知的方法,连接可以基于遗传融合。存在于包含抗体的融合蛋白中的另外的结构域可优选地通过柔性接头、有利地是肽接头连接,其中所述肽接头包含多个亲水

的肽键合的氨基酸,其长度足以跨越另外的蛋白质结构域的C末端与抗体的N末端之间的距离,反之亦然。抗体可以与效应分子连接,所述效应分子具有适于生物活性或选择性结合例如固体支持物、生物活性物质(例如细胞因子或生长激素)、化学试剂、肽、蛋白质或药物的构象。

[0128] “滥用药物”在本文中用于指由于非医学原因(诸如娱乐和/或改变心智的效果)而摄取的一种或多种添加剂物质(诸如药物)。过度沉溺、使用或依赖此类滥用药物常常被称为“药物滥用”。滥用药物的实例包括酒精、巴比妥类药物、苯二氮卓类药物、大麻、可卡因、致幻剂(诸如氯胺酮、墨斯卡灵(mescaline)(皮约特(peyote))、PCP、裸盖菇素、DMT和/或LSD)、甲喹酮、阿片类药物、安非他明(amphetamine)(包括甲基苯丙胺)、合成代谢类固醇、吸入剂(即含有具有作用于精神的特性的挥发性物质的物质,诸如亚硝酸盐、喷雾涂料、清洁液、标记物、胶水等)及其组合。

[0129] “双重特异性抗体”在本文中用于指可在其两个结合臂中的每一个(一对HC/LC)中结合两种不同抗原(或表位)的全长抗体(参见PCT公开W002/02773)。因此,双重特异性结合蛋白具有两个具备相同特异性和相同CDR序列的相同抗原结合臂,且对于其结合的每种抗原而言是二价的。

[0130] “双重可变结构域”在本文中用于指结合蛋白上的两个或更多个抗原结合位点,所述结合蛋白可以为二价的(两个抗原结合位点)、四价的(四个抗原结合位点)或多价结合蛋白。DVD可以为单特异性的,即能够结合一种抗原(或一个特异性表位)、或多特异性的,即能够结合两种或更多种抗原(即相同靶抗原分子的两个或更多个表位或不同靶抗原的两个或更多个表位)。优选的DVD结合蛋白包含两条重链DVD多肽和两条轻链DVD多肽并且被称为“DVD免疫球蛋白”或“DVD-Ig”。这样的DVD-Ig结合蛋白因此是四聚体的并且类似于IgG分子,但提供比IgG分子更多的抗原结合位点。因此,四聚体DVD-Ig分子的每一半都类似于IgG分子的一半,并且包含重链DVD多肽和轻链DVD多肽,但与IgG分子的提供单抗原结合结构域的一对重链和轻链不同,DVD-Ig的一对重链和轻链提供两个或更多个抗原结合位点。

[0131] DVD-Ig结合蛋白的每个抗原结合位点可以源自供体(“亲本”)单克隆抗体,因此包含具有每个抗原结合位点均参与抗原结合的总共六个CDR的重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)。因此,结合两个不同表位的DVD-Ig结合蛋白(即两个不同抗原分子的两个不同表位或相同抗原分子的两个不同表位)包含源自第一亲本单克隆抗体的抗原结合位点和第二亲本单克隆抗体的抗原结合位点。

[0132] 在PCT公开号W0 2007/024715、美国专利号7,612,181和Wu等人,Nature Biotech.,25:1290-1297(2007)中提供了对DVD-Ig结合分子的设计、表达和表征的描述。此类DVD-Ig分子的优选实例包含含有结构式VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的重链,其中VD1是第一重链可变结构域,VD2是第二重链可变结构域,C是重链恒定结构域,X1是接头(前提条件是它不是CH1,X2是Fc区),且n是0或1,但优选1;和含有式VD1-(X1)_n-VD2-C-(X2)_n的轻链,其中VD1是第一轻链可变结构域,VD2是第二轻链可变结构域,C是轻链恒定结构域,X1是接头(前提条件是它不是CH1,且X2不包含Fc区);且n是0或1,但优选1。这种DVD-Ig可以包含两条这样的重链和两条这样的轻链,其中每条链包含串联连接的可变结构域,而在可变区之间没有间插的恒定区,其中重链和轻链缔合形成串联功能性抗原结合位点,并且一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链缔合形成具有四个功能性抗原结合位点的四聚体结合蛋白。

在另一个实例中,DVD-Ig分子可以包含这样的重链和轻链,每个所述重链和轻链包含串联连接的三个可变结构域(VD1、VD2、VD3),而在可变结构域之间没有间插恒定区,其中一对重链和轻链可以缔合形成三个抗原结合位点,并且其中一对重链和轻链可以与另一对重链和轻链缔合形成具有六个抗原结合位点的四聚体结合蛋白。

[0133] 在优选的实施方式中,DVD-Ig结合蛋白不仅结合由其亲本单克隆抗体结合的相同靶分子,而且还具有一种或多种其亲本单克隆抗体中的一种或多种所需特性。优选地,这种另外的特性是亲本单克隆抗体中的一者或多者的抗体参数。可以从其亲本单克隆抗体中的一种或多种促成DVD-Ig结合蛋白的抗体参数包括但不限于抗原特异性、抗原亲和力、效力、生物学功能、表位识别、蛋白质稳定性、蛋白质溶解性、产生效率、免疫原性、药代动力学、生物利用度、组织交叉反应性和直系同源抗原结合。

[0134] DVD-Ig结合蛋白结合UCH-L1的至少一个表位。DVD-Ig结合蛋白的非限制性实例包括结合UCH-L1的一个或多个表位的DVD-Ig结合蛋白、结合人类UCH-L1的表位和另一物种(例如小鼠)的UCH-L1的表位的DVD-Ig结合蛋白、和结合人类UCH-L1的表位和另一靶分子的表位的DVD-Ig结合蛋白。

[0135] 如本文所用的“动态范围”是指测定读数与被分析样品中的靶分子或分析物的量成比例的范围。

[0136] “表位”或“多个表位”或“感兴趣表位”是指任何分子上被识别并且可以结合其特异性结合配偶体上的互补位点的位点。分子和特异性结合配偶体是特异性结合对的一部分。例如,表位可以是在多肽、蛋白质、半抗原、糖类抗原(诸如但不限于糖脂、糖蛋白或脂多糖)或多糖。其特异性结合配偶体可以是但不限于抗体。

[0137] 如本文所用的“片段抗原结合片段”或“Fab片段”是指抗体的片段,其结合抗原并且含有一个抗原结合位点、一条完整的轻链、和一条重链的一部分。Fab是由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段。Fab由重链和轻链中的每一个的一个恒定结构域和一个可变结构域组成。可变结构域含有互补位(抗原结合位点),其包含在单体的氨基末端的一组互补决定区。因此Y的每个臂结合抗原上的表位。Fab片段可以如本领域已描述的那样产生,例如,使用酶木瓜蛋白酶,其可以用于将免疫球蛋白单体裂解成两个Fab片段和Fc片段,或者可以通过重组方法产生。

[0138] 如本文所用的“F(ab')₂片段”是指通过胃蛋白酶消化整个IgG抗体以除去大部分Fc区,同时使一些铰链区完整而产生的抗体。F(ab')₂片段具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合F(ab)部分,因此是二价的,分子量为约110kDa。二价抗体片段(F(ab')₂片段)小于整个IgG分子并且能够更好地渗透到组织中,从而促进免疫组织化学中更好的抗原识别。F(ab')₂片段的使用还避免了对活细胞上的Fc受体或蛋白A/G的非特异性结合。F(ab')₂片段可以结合并沉淀抗原。

[0139] 如本文所用的“框架”(FR)或“框架序列”可以意指可变区减去CDR的剩余序列。因为CDR序列的精确界定可通过不同系统(例如参见上文)来确定,所以框架序列的含义易受相应不同解释。六个CDR(轻链的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3以及重链的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)也将轻链和重链上的框架区分成各链上的四个子区域(FR1、FR2、FR3和FR4),其中CDR1位于FR1与FR2之间,CDR2位于FR2与FR3之间,并且CDR3位于FR3与FR4之间。在不将特定子区指定为FR1、FR2、FR3或FR4的情况下,如其它所提及的框架区表示单一天然存在的免疫球蛋

白链的可变区内的组合FR。如本文所用,FR表示四个子区域中的一个,并且FR表示构成框架区的四个子区域中的两个或更多个。

[0140] 人类重链和轻链FR序列在本领域是已知的,其可被用作重链和轻链“接受者”框架序列(或者简单的说是“接受者”序列)以使用本领域中已知的技术来人源化非人类抗体。在一个实施方式中,人类重链和轻链接受者序列选自在公众可获得的数据库如V-base (hypertext transfer protocol://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/) 或国际 ImMunoGeneTics® (IMGT®) 信息系统(hypertext transfer protocol://imgt.cines.fr/texts/IMGTrepertoire/LocusGenes/) 中列出的框架序列。

[0141] 如本文所用的“功能性抗原结合位点”可以意指结合蛋白(例如抗体)上能够结合靶抗原的位点。抗原结合位点的抗原结合亲和力可以不如与抗原结合位点所源自的亲本结合蛋白,例如亲本抗体一样强,但结合抗原的能力必须是可使用已知用于评价蛋白质,例如抗体与抗原结合的多种方法中的任一者测量。此外,本文中的多价蛋白质,例如多价抗体的每个抗原结合位点的抗原结合亲和力无需在数量上相同。

[0142] “GFAP”在本文中用于描述胶质细胞原纤维酸性蛋白。GFAP是由人类中的GFAP基因编码,并且可以产生(例如通过重组方式,在其它物种中)的蛋白质。

[0143] “GFAP状态”可以意指在某个时间点的GFAP的水平或量(诸如使用GFAP的单个测量值)、与监测相关的GFAP的水平或量(诸如对受试者进行重复测试以鉴定GFAP量的增加或减少)、与创伤性脑损伤(无论是原发性脑损伤和/或继发性脑损伤)的治疗相关的GFAP的水平或量或其组合。

[0144] 如本文所用的“格拉斯哥昏迷量表”或“GCS”是指用于基于总体社交能力或对其它的依赖来估计和分类脑损伤结果的15分量表。所述测试使用以下值测量运动反应、言语反应和睁眼反应:I.运动反应(6-完全服从命令;5-伤害性刺激时定位;4-从伤害性刺激缩回;3-异常屈曲,即去皮层状态;2-伸展反应,即去脑状态;和1-无反应);II.言语反应(5-警觉且定向;4-说话混乱,但连贯;3-字词不恰当且由字词组成的短语混乱;2-难以理解的声音;和1-没有声音);和III.睁眼(4-自发睁眼;3-说话时睁眼;2-疼痛时睁眼;和1-不睁眼)。通过添加I+II+III的值来确定最终评分。最终评分可分为四个可能的生存水平,较低的数字指示更严重的损伤和更差的预后:轻度(13-15);中度失能(9-12)(意识丧失超过30分钟;可能或可能消退的身体或认知障碍;并从康复中获益);重度失能(3-8)(昏迷:无意识状态。没有有意义的反应,没有自愿活动);和植物状态(小于3)(睡醒周期;觉醒,但没有与环境的相互作用;对疼痛没有定位反应)。中度脑损伤定义为导致意识丧失20分钟至6小时且格拉斯哥昏迷量表为9至12分的脑损伤。重度脑损伤定义为导致意识丧失大于6小时且格拉斯哥昏迷量表为3至8的脑损伤。

[0145] 如本文所用,“格拉斯哥结局量表”是指用于功能性结局的全球量表,其将患者状态评定为以下五个类别之一:死亡、植物人状态、重度失能、中度失能或恢复良好。

[0146] 如本文中可互换使用的“扩展的格拉斯哥结局量表”或“GOSE”通过将重度失能、中度失能和良好恢复的类别细分为表1中的低级类别和高级类别来提供更详细的八种分类。

[0147] 表1

[0148]

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

[0149] “人源化抗体”在本文中用于描述包含来自非人类物种(例如小鼠)的重链和轻链可变区序列但其中VH和/或VL序列中的至少一部分已变得更“类人”，即与人类生殖系可变序列更相似的抗体。“人源化抗体”为抗体或其变体、衍生物、类似物或片段，其免疫特异性地结合感兴趣抗原且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的框架(FR)区和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。如本文所用，在CDR的背景下的术语“基本上”是指氨基酸序列与非人抗体CDR的氨基酸序列至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR。人源化抗体包含至少一个且通常两个可变结构域的基本上全部(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)，其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的那些CDR区并且全部或基本上全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。在一个实施方式中，人源化抗体也包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。在一些实施方式中，人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方式中，人源化抗体仅含有轻链和/或人源化重链的人源化可变结构域。

[0150] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别，包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE，以及任何同种型，包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列，并且可以使用本领域中熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能。

[0151] 人源化抗体的框架区和CDR无需精确对应于亲本序列，例如可以通过取代、插入或/或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体CDR或共有框架进行诱变以使该位点处的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而，在优选的实施方式中，此类突变将不是广泛的。通常，至少80%、优选至少85%、更优选至少90%、且最优选至少95%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文所用，术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用，术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1987))。因此，“共有免疫球蛋白序列”可以包含“共有框架区”和/或“共有CDR”。在免疫球蛋白家族中，共有序列中的每个位置由家族中最常出现在

那个位置的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现,那么共有序列中可包括任一者。

[0152] 如本文在两种或更多种多肽或多核苷酸序列的背景下所使用的“相同的”或“同一性”可意指序列在指定区域上具有指定百分比的相同残基。可通过以下来计算所述百分比:最佳地比对两个序列、在指定区域比较两个序列、确定在两个序列中相同的残基的位置的数量以产生匹配位置的数量、以匹配位置的数量除以在指定区域内的位置的总数量,并且将结果乘以100以产生序列同一性的百分比。在两个序列具有不同长度或比对产生一个或多个交错末端并且比较的指定区域仅包含单个序列的情况下,单个序列的残基包括于计算的分母而不是分子中。

[0153] 如本文所用的“成像程序”是指允许看到身体内部以便诊断、治疗和监测健康状况的医疗测试。成像程序可以是非侵袭性程序,允许在不侵入的情况下诊断疾病和损伤。成像程序的示例包括MRI、CT扫描、X射线、正电子发射断层(PET)扫描、单光子发射计算机断层扫描(SPECT)和弥散张量成像(DTI)扫描。

[0154] 如本文中可互换使用的“对头部的损伤”或“头部损伤”是指对头皮、颅骨或大脑的任何创伤。此类损伤可能包括颅骨上的仅轻微的撞击或可能是严重的脑损伤。此类损伤包括大脑的原发性损伤和/或大脑的继发性损伤。原发性脑损伤发生在最初的侵害期间,并且由大脑的物理结构的移位引起。更具体地,原发性脑损伤是在创伤事件期间发生的对实质(组织、血管)的物理伤害,导致对周围脑组织的剪切和压迫。继发性脑损伤发生在原发性损伤之后,并且可能涉及一系列细胞过程。更具体地,继发性脑损伤是指在原发性脑损伤后的一段时间(从数小时到数天)内发展出的变化。它包括促成进一步破坏脑组织的大脑中细胞、化学、组织或血管变化的整个级联。

[0155] 对头部的损伤可以是闭合性的或开放性的(穿透性的)。闭合性头部损伤是指其中颅骨没有被撞击物体穿透的头皮、颅骨或大脑的创伤。开放性头部损伤是指其中颅骨被撞击物体穿透的头皮、颅骨或大脑的创伤。对头部的损伤可以由人的身体摇动、由导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械或其它力(例如,诸如汽车、飞机、火车等情况下的交通事故;诸如用棒球棒或来自枪械的头部猛击)产生的钝性冲击、脑血管意外(例如中风)、一次或多次跌倒(例如,如运动或其它活动)、爆炸或冲击波(统称为“冲击波伤”)以及由其它类型的钝力创伤引起的。另选地,对头部的损伤可能由摄入和/或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合引起。此类化学物质和/或毒素的实例包括火、霉菌、石棉、杀虫剂和杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体(诸如一氧化碳、硫化氢和氰化物)、有机金属(诸如甲基汞、四乙基铅和有机锡)和/或一种或多种滥用药物。另选地,对头部的损伤可能是由于受试者罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水、缺氧或其任何组合引起的。在一些情况下,无法确定是否发生过任何此类事件或损伤。例如,患者或受试者可能没有病史,受试者可能无法说话,受试者可能知道他们所经历的事件,等等。此类情况在本文中被描述为受试者“可能已遭受头部受伤。”在本文的某些实施方式中,闭合性头部损伤不包括并且特别地排除脑血管意外,诸如中风。

[0156] 如本文所用的“颅内病变”是指大脑内的损伤区域。颅内病变可以是在成像程序或脑成像测试(例如MRI或CT扫描)中看到的异常。在CT或MRI扫描中,脑病变可能表现为看起来不像正常脑组织的暗点或亮点。

[0157] 如本文所用的“分离的多核苷酸”可以意指多核苷酸(例如基因组、cDNA或合成来

源或其组合的多核苷酸),根据其来源,所述多核苷酸不与“分离的聚核苷酸”见于自然界中所处的多核苷酸的全部或一部分缔合;可操作地连接至其在自然界中不连接的多核苷酸;或不作为较大序列的一部分存在于自然界中。

[0158] 如本文所用的“标记”和“可检测标记”是指附接至抗体或分析物,以使抗体与分析物之间的反应可检测的部分,并且如此标记的抗体或分析物被称为“可检测地标记的”。标记可以产生可通过视觉或仪器手段检测到的信号。各种标记包括产生信号的物质,诸如发色团、荧光化合物、化学发光化合物、放射性化合物等。标记的代表性实例包括产生光的部分,例如吖啶鎓化合物,和产生荧光的部分,例如荧光素。本文描述了其它标记。在这方面,所述部分本身可以是不可检测的,但在与另一部分反应时可以变得可检测。术语“可检测地标记的”的使用旨在涵盖这种标记。

[0159] 可使用如在本领域中已知的任何适合的可检测标记。例如,可检测标记可为放射性标记(诸如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 和 ^{153}Sm)、酶标记(诸如辣根过氧化物酶、碱性过氧化物酶、葡萄糖6-磷酸脱氢酶等)、化学发光标记(诸如吖啶酯、硫酯或磺酰胺;鲁米诺、异鲁米诺、菲啶鎓酯等)、荧光标记(诸如荧光素(例如5-荧光素、6-羧基荧光素、3'-6-羧基荧光素、5(6)-羧基荧光素、6-六氯-荧光素、6-四氯荧光素、异硫氰酸荧光素等)、若丹明、藻胆蛋白、R-藻红素、量子点(例如硫化锌封盖的硒化镉)、测温标记或免疫聚合酶链反应标记。标记、标记程序和标记检测的绪论见于Polak和Van Noorden, *Introduction to Immunocytochemistry*, 第2版, Springer Verlag, N.Y. (1997); 和Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* (1996) (其是由Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon出版的组合手册和目录)中。荧光标记可用于FPIA中(参见例如美国专利号5,593,896、5,573,904、5,496,925、5,359,093和5,352,803,其通过引用整体并入本文)。吖啶化合物可在均质化学发光测定法中用作可检测标记(参见例如Adamczyk等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16:1324-1328 (2006); Adamczyk等人, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 4:2313-2317 (2004); Adamczyk等人, *Biorg. Med. Chem. Lett.* 14:3917-3921 (2004); 和Adamczyk等人, *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003))。

[0160] 在一个方面,吖啶化合物是吖啶-9-甲酰胺。用于制备吖啶-9-甲酰胺的方法描述于Mattingly, *J. Biolumin. Chemilumin.* 6:107-114 (1991); Adamczyk等人, *J. Org. Chem.* 63:5636-5639 (1998); Adamczyk等人, *Tetrahedron* 55:10899-10914 (1999); Adamczyk等人, *Org. Lett.* 1:779-781 (1999); Adamczyk等人, *Bioconjugate Chem.* 11:714-724 (2000); Mattingly等人, *In Luminescence Biotechnology: Instruments and Applications*; Dyke, K.V. 编辑; CRC Press: Boca Raton, 第77-105页 (2002); Adamczyk等人, *Org. Lett.* 5:3779-3782 (2003); 和美国专利号5,468,646、5,543,524和5,783,699(其各自通过引用整体并入本文用于其在关于该方面的教导)中。

[0161] 吖啶化合物的另一个实例是吖啶-9-羧酸芳基酯。具有式II的吖啶-9-羧酸芳基酯的一实例是10-甲基-9-(苯氧基羰基)吖啶氟磺酸酯(可购自Cayman Chemical, Ann Arbor, MI)。用于制备吖啶-9-羧酸芳基酯的方法描述于McCapra等人, *Photochem. Photobiol.* 4:1111-21 (1965); Razavi等人, *Luminescence* 15:245-249 (2000); Razavi等人, *Luminescence* 15:239-244 (2000); 和美国专利号5,241,070(其各自通过引用整体并入本文用于其在关于该方面的教导)中。此类吖啶-9-羧酸芳基酯是针对在由至少一种氧化酶氧

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

[0162] “连接序列”或“连接肽序列”是指与一种或多种感兴趣多肽序列(例如,全长、片段等)连接的天然或人工多肽序列。术语“连接的”是指连接序列与感兴趣多肽序列的接合。此类多肽序列优选地通过一个或多个肽键接合。连接序列可以具有约4至约50个氨基酸的长度。优选地,连接序列的长度为约6至约30个氨基酸。可以通过氨基酸取代、添加或缺失来修饰天然连接序列以产生人工连接序列。连接序列可用于许多目的,包括用于重组Fab中。示例性连接序列包括但不限于:(i)组氨酸(His)标签,诸如6X His标签,其具有HHHHHHH(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列,可用作连接序列以有利于分离和纯化感兴趣多肽和抗体;(ii)肠激酶裂解位点,如His标签,用于分离和纯化感兴趣的蛋白质和抗体。常常,将肠激酶裂解位点与His标签一起用于分离和纯化感兴趣的蛋白质和抗体。各种肠激酶裂解位点在本领域中是已知的。肠激酶裂解位点的实例包括但不限于DDDDK(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列及其衍生物(例如ADDDDK(SEQ ID NO:5)等);(iii)杂项序列可用于链接或连接(connect)单链可变区片段的轻链和/或重链可变区。其它连接序列的实例可见于Bird等人, Science 242: 423-426 (1988); Huston等人, PNAS USA 85:5879-5883 (1988); 和McCafferty等人, Nature 348:552-554 (1990)中。还可以修饰连接序列以用于另外的功能,诸如药物的附接或附接于固体支持物。在本公开的上下文中,单克隆抗体例如可以含有连接序列,诸如His标签、肠激酶裂解位点或两者。

[0163] 如在本文中可互换使用的“磁共振成像”或“MRI”是指在放射学中用于形成身体在健康和疾病中的解剖结构和生理过程的图片的医学成像技术(例如,在本文中可互换地称为“MRI”、“MRI程序”或“MRI扫描”)。MRI是医学成像的一种形式,测量身体组织的原子核在强磁场中时对高频无线电波的响应,并产生内部器官的图像。基于核磁共振(NMR)科学的MRI扫描仪使用强磁场、无线电波和场梯度来生成身体内部的图像。

[0164] 如本文所用的“单克隆抗体”是指自基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成所述群体的个别抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定子。本文的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的对应序列相同或同源,而所述链的剩余部分与源自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体以及这类抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要它们表现出所需的生

物性。

[0165] 术语“多价结合蛋白”在本文中用于指包含两个或更多个抗原结合位点(在本文中也称为“抗原结合结构域”)的结合蛋白。多价结合蛋白优选地被工程化以具有三个或更多个抗原结合位点,并且通常不是天然存在的抗体。术语“多特异性结合蛋白”是指可以结合两个或更多个相关或不相关靶标的结合蛋白,包括能够结合相同靶分子的两个或更多个不同表位的结合蛋白。

[0166] 如本文中可互换使用的“阴性预测值”或“NPV”是指假定它们具有阴性测试结果时受试者具有阴性结局的概率。

[0167] 如本文所用的“参考水平”是指用于评估诊断、预后或治疗功效的测定临界值,在本文中已将其与各种临床参数(例如疾病的存在、疾病阶段、疾病严重性、疾病的进展、未进展或改善等)联系起来或相关联。如本文所用的“绝对量”是指在不同时间点取得或取样的至少两种测定结果之间的变化或差值的绝对值,并且与参考水平类似,已将其与各种临床参数(例如疾病的存在、疾病阶段、疾病严重性、疾病的进展、未进展或改善等)联系起来或相关联。如本文所用的“绝对值”是指实数(诸如像两个比较水平(例如在第一时间点取得的水平与在第二时间点取得的水平))之间的差值的大小,而不考虑它的符号,即不管它是正的还是负的。

[0168] 本公开提供了示例性参考水平和绝对量(例如通过比较不同时间点的参考水平计算)。然而,众所周知,参考水平和绝对量可以根据免疫测定法的性质(例如使用的抗体、反应条件、样品纯度等)而变化,并且可以比较和标准化测定法。基于本公开提供的描述针对其它免疫测定法修改本文的公开以获得用于那些其它免疫测定法的免疫测定法特异性参考水平和绝对量进一步完全在本领域普通技术人员的能力范围内。尽管参考水平和绝对量的精确值可以在测定法之间变化,但是如本文所述的发现应是普遍适用的并且能够外推至其它测定法。

[0169] “定点照护装置”是指用于在定点照护处或附近(即在实验室外)、在患者护理的时间和地方(诸如,在医院、医师办公室、紧急或其它医疗护理机构、患者家、养老院和/或长期护理和/或临终关怀设施中)提供医学诊断测试的装置。定点照护装置的实例包括由Abbott Laboratories (Abbott Park, IL)生产的装置(例如i-STAT和i-STAT Alinity, Universal Biosensors (Rowville, Australia) (参见US 2006/0134713)、Axis-Shield PoC AS (Oslo, Norway)和Clinical Lab Products (Los Angeles, USA)。

[0170] 如本文中可互换使用的“阳性预测值”或“PPV”是指假定它们具有阳性测试结果时受试者具有阳性结局的概率。

[0171] 在本文所述的免疫测定法和试剂盒的背景下的“质量控制试剂”包括但不限于校准物、对照物和敏感性组。通常使用“校准物”或“标准物”(例如一种或多种,诸如复数种)来建立校正(标准)曲线以内插分析物(诸如抗体或分析物)的浓度。另选地,可以使用接近参考水平或对照水平(例如“低”、“中等”或“高”水平)的单一校准物。可联合使用多种校准物(即多于一种的校准物或不同量的校准物)以构成“敏感性组”。

[0172] “接受者操作特征”曲线或“ROC”曲线是指说明二元分类系统在其鉴别阈变化时的性能的图形绘图。例如,ROC曲线可以是对于诊断测试的不同可能截止点的真阳性率相比于假阳性率的绘图。它是通过在各种阈值设置下将阳性中的真阳性分数(TPR=真阳性率)相

对于阴性中的假阳性分数 (FPR=假阳性率) 进行绘图产生的。TPR也称为敏感性,并且FPR是一减去特异性或真阴性率。ROC曲线展示了敏感性与特异性之间的权衡(敏感性的任何增加都伴随着特异性的降低);曲线越紧密地沿着ROC空间的左边界,然后是顶部边界,测试越准确;曲线越靠近ROC空间的45度对角线,测试越不准确;截止点处的切线斜率给出该测试值的似然率(LR);并且曲线下面积是文本准确度的度量。

[0173] “重组抗体”和“多种重组抗体”是指通过一个或多个步骤制备的抗体,包括通过重组技术将编码一种或多种单克隆抗体的全部或部分的核酸序列克隆到适当的表达载体中,并随后在适当的宿主细胞中表达抗体。所述术语包括但不限于重组产生的单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体(全部或部分人源化)、由抗体片段形成的多特异性或多价结构、双功能抗体、异源缀合Ab、DVD-Ig®和如本文(i)中描述的其它抗体。(双可变结构域免疫球蛋白及其制备方法描述于Wu,C等人,Nature Biotechnology,25:1290-1297(2007)中)。如本文中使用的术语“双功能抗体”是指包括对一个抗原位点具有特异性的第一臂和对不同抗原位点具有特异性的第二臂的抗体,即双功能抗体具有双重特异性。

[0174] 如本文所用的对受试者(例如患者)的“风险评估”、“风险分类”、“风险鉴定”或“风险分层”是指评价包括生物标记物的因素,以预测包括疾病发作或疾病进展的未来事件发生的风险,以便可以在更加知情的基础上做出关于受试者的治疗决策。

[0175] “样品”、“测试样品”、“样本”、“来自受试者的样品”和“患者样品”可以在本文中交换使用并且可以是血液(诸如全血)样品、组织、尿、血清、血浆、羊水、脑脊髓液、胎盘细胞或组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞。在一些实施方式中,样品是全血样品。在一些实施方式中,样品是血清样品。在又其它实施方式中,样品是血浆样品。样品可以如从患者获得地直接使用,或者可预处理,诸如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心、对干扰组分进行灭活、添加试剂等,从而以如本文中讨论的或如其它本领域已知的一些方式来修改样品的特征。

[0176] 可以利用多种细胞类型、组织或体液来获得样品。此类细胞类型、组织和流体可以包括组织切片,诸如活检和尸检样品、取得用于组织学目的的冷冻切片、血液(例如全血)、血浆、血清、红细胞、血小板、间质液、脑脊髓液等。细胞类型和组织还可以包括淋巴液、脑脊髓液、由组织或细胞类型收集的流体可以通过从人类和非人动物中除去细胞样品来提供,但也可以通过使用先前分离的细胞(例如通过其它人分离的、在其它时间、和/或用于其它目的)来完成。也可以使用归档组织,例如具有治疗或结局史的那些。可能不需要蛋白质或核苷酸分离和/或纯化。

[0177] 如本文所用的测定法的“敏感性”是指结局为阳性的受试者中被正确鉴定为阳性(例如正确鉴定那些患有他们正被测试的疾病或医学病状的受试者)的比例。例如,这可能包括将受试者从未患TBI的那些中正确鉴定为患有TBI、将受试者从患有轻度TBI的那些中正确地鉴定为患有中度、重度或中度至重度TBI、将受试者从患有中度、重度或中度至重度TBI的那些中正确地鉴定为患有轻度TBI、将受试者从未患TBI的那些中正确地鉴定为患有中度、重度或中度至重度TBI或将受试者从未患TBI的那些中正确地鉴定为患有轻度TBI、将受试者从不可能受益于头部成像或CT扫描或MRI的那些中正确鉴定为可能受益于成像或头部CT扫描或MRI等)。

[0178] 如本文所用的测定法的“特异性”是指结局为阴性的受试者中被正确鉴定为阴性(例如正确鉴定那些未患有他们正被测试的疾病或医学病状的受试者)的比例。例如,这可

能包括从未患TBI的那些中正确鉴定受试者患有TBI、从患有轻度TBI的那些中正确地鉴定受试者未患中度、重度或中度至重度TBI、从患有中度、重度或中度至重度TBI的那些中正确地鉴定受试者为未患轻度TBI、或将受试者鉴定为未患任何TBI,或将受试者从未患TBI的那些中正确地鉴定为患有轻度TBI等)。

[0179] “校准组合物系列”是指包含已知浓度的UCH-L1的多种组合物,其中每种组合物与前述系列中的其它组合物的不同之处在于UCH-L1的浓度。

[0180] 如本文中可互换使用的“固相”或“固体支持物”是指可用于附接和/或吸引且固定化(1)一种或多种捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)一种或多种检测剂或检测特异性结合配偶体的任何材料。固相可以就其吸引和固定化捕获剂的固有进行选择。另选地,固相可以在其上粘附连接剂,所述连接剂具有吸引和固定化(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体。例如,连接剂可包括带电物质,其相对于捕获剂(例如捕获特异性结合配偶体)或检测剂(例如检测特异性结合配偶体)本身或相对于与(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体缀合的带电物质是带相反电荷的。一般来讲,连接剂可以是任何结合配偶体(优选是特异性的),其固定化在(附接至)固相上并且具有通过结合反应来固定化(1)捕获剂或捕获特异性结合配偶体,或(2)检测剂或检测特异性结合配偶体的能力。连接剂使得捕获剂在性能测定之前或性能测定期间间接地与固相材料结合。例如,固相可以是塑料、衍生塑料、磁性或非磁性金属、玻璃或硅,包括例如试管、微量滴定孔、薄片、珠粒、微粒、芯片和本领域普通技术人员已知的其它构造。

[0181] 如本文所用的“特异性结合”或“特异性地结合”可以是指抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用,其中相互作用依赖于化学物质上具体结构(例如抗原决定簇或表位)的存在;例如,抗体识别并结合特定的蛋白质结构,而不是广泛结合蛋白质。如果抗体对表位“A”具有特异性,则在含被标记的“A”和抗体的反应中,含表位A的分子(或者游离的未标记A)的存在将会降低与抗体结合的被标记的A的量。

[0182] “特异性结合配偶体”是特异性结合对的成员。特异性结合对包含两个不同分子,其通过化学或物理方式彼此特异性结合。因此,除常见免疫测定法的抗原与抗体特异性结合对之外,其它特异性结合对可包括生物素与抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白);碳水化合物与凝集素;互补核苷酸序列;效应分子与受体分子;辅因子与酶;酶与酶抑制剂等。此外,特异性结合对可包括是原始特异性结合成员的类似物的成员,例如分析物-类似物。免疫反应性特异性结合成员包括分离的或重组产生的抗原、抗原片段和抗体,包括单克隆和多克隆抗体以及其复合物和片段。

[0183] 如本文所用的“统计学上显著的”是指两个或更多个变量之间的关系由除随机机会之外的其它因素引起的可能性。将统计假设检验用于确定数据集的结果是否具有统计学上的显著性。在统计假设检验中,只要观察到的检验统计量的p值小于研究定义的显著性水平,就获得了统计学显著性结果。p值是假定零假设是真时获得至少与观察到的结果一样极端的结果的概率。统计假设分析的实例包括Wilcoxon符号秩次检验、t检验、卡方或费舍尔精确检验。如本文所用的“显著性的”是指尚未确定为具有统计学显著性的变化(例如,其可能尚未经统计假设检验)。

[0184] 如本文使用的“受试者”和“患者”可互换地用于指任何脊椎动物,包括但不限于哺

乳动物(例如牛、猪、骆驼、美洲驼、马、山羊、兔、绵羊、仓鼠、豚鼠、猫、狗、大鼠和小鼠、非人灵长类动物(例如猴子,诸如食蟹猴或恒河猴、黑猩猩等)和人类)。在一些实施方式中,受试者可以为人类或非人类。在一些实施方式中,受试者为人类。受试者或患者可以经历其它形式的治疗。

[0185] “治疗(Treat/treating/treatment)”各自在本文中可互换用于描述逆转、减轻或抑制这种术语所适用的疾病和/或损伤的进展,或这种疾病的一种或多种症状。根据受试者的病状,所述术语还是指预防疾病,并且包括预防疾病的发作或预防与疾病相关的症状。治疗可以以急性或慢性方式进行。所述术语还是指在受疾病折磨之前降低与这种疾病相关的疾病或症状的严重性。在折磨之前的这种预防疾病或降低疾病严重性是指不在受疾病折磨的施用时间将药物组合物施用至受试者。“预防”还是指预防疾病或与这种疾病相关的一种或多种症状的复发。“治疗”和“治疗性地”是指治疗的行为,正如“治疗”如上所定义的。

[0186] 如本文可互换使用的“创伤性脑损伤”或“TBI”是指具有广谱症状和失能的复杂损伤。TBI很多时候是类似于其它损伤的急性事件。TBI可分为“轻度”、“中度”或“重度”。TBI的原因是多种多样的,并且包括例如人的身体摇动、车祸、枪械损伤、脑血管意外(例如中风)、跌倒、爆炸或冲击波以及其它类型的钝力创伤。TBI的其它原因包括摄入和/或暴露于一种或多种化学品或毒素(诸如火、霉菌、石棉、杀虫剂和杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体(诸如一氧化碳、硫化氢和氰化物)、有机金属(诸如甲基汞、四乙基铅和有机锡)、一种或多种滥用药物或其组合)。另选地,TBI可能在罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水、缺氧或其组合的受试者中发生。青年人和老年人是TBI风险最高的年龄组。在本文的某些实施方式中,创伤性脑损伤或TBI不包括并且特别地排除脑血管意外,诸如中风。

[0187] 如本文所用的“轻度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失是短暂的并且通常是几秒或几分钟并且/或者混乱和定向障碍短于1小时。轻度TBI也被称为脑震荡、轻微头部创伤、轻微TBI、轻微脑损伤和轻微头部损伤。虽然MRI和CT扫描常常是正常的,但患有轻度TBI的个体可能具有认知问题,诸如头痛、思维困难、记忆问题、注意力缺陷、情绪波动和沮丧。

[0188] 轻度TBI是最普遍的TBI,并且在初始损伤时常常被忽略。通常,受试者具有的格拉斯哥昏迷量表数在13-15之间(诸如13-15或14-15)。百分之十五(15%)的轻度TBI患者的症状持续3个月或更长时间。轻度TBI定义为头部的强力运动或导致不到30分钟的精神状态短暂变化(混乱、定向障碍或记忆丧失)或意识丧失的冲击力的结果。轻度TBI的常见症状包括疲劳、头痛、视力障碍、记忆力丧失、注意力/集中力差、睡眠障碍、头晕/失去平衡、应激性情绪障碍、抑郁情感和癫痫。与轻度TBI相关的其它症状包括恶心、嗅觉丧失、对光和声音的敏感性、情绪变化、迷茫或混乱、和/或思维迟钝。

[0189] 如本文所用的“中度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失和/或混乱和定向障碍在1至24小时之间并且受试者具有的格拉斯哥昏迷量表数在9-13(诸如9-12或9-13)之间。患有中度TBI的个体具有异常的脑成像结果。如本文所用的“重度TBI”是指脑损伤,其中意识丧失超过24小时并且在损伤或穿透性颅骨损伤后记忆丧失时间超过24小时并且受试者具有的格拉斯哥昏迷量表数在3-8之间。缺陷的范围为从较高水平的认知功能损害到昏迷状态。幸存者可能具有有限的手臂或腿部功能、言语或语言异常、思维能力丧失或情绪问题。具有重度损伤的个体可能会长期处于无反应状态。对于许多患有重度TBI的人来说,通常需要长期

康复以最大限度地发挥功能和独立性。

[0190] 如本文所用的“中度至重度”TBI是指包括中度至重度TBI的广泛脑损伤且因此涵盖单独的中度TBI、重度TBI和中度至重度TBI的组合。罹患中度至重度TBI的受试者可具有在3-13之间(诸如3-12或3-13)的格拉斯哥昏迷量表数。例如,在某些临床情况下,最初可以将受试者诊断为患有中度TBI,但是随着时间的推移(几分钟、几小时或几天),该受试者会发展为患有重度TBI(例如在有脑出血的某些情况下)。这类受试者将是可能分类为“中度至重度”的患者实例。中度至重度TBI的常见症状包括认知缺陷,包括注意力、集中力、注意力分散性、记忆力、运算速度方面的困难、混乱、持续言语、冲动、语言处理和/或“执行功能”、不理解口语词(感觉性失语症)、说话和被理解困难(表达性失语症)、言语不清、说话速度很快或很慢、阅读问题、写作问题、解释触摸、温度、运动、肢体位置和精细辨别困难、将感觉印象整合或模式化成对心理有意义的数据、部分或全部视力丧失、眼肌无力和双视(复视)、视力模糊、判断距离的问题、不自主的眼球运动(眼球震颤)、不耐受光(畏光)、听力(诸如听力减弱或丧失、耳中有鸣声(耳鸣)、对声音的敏感度增加)、嗅觉丧失或减弱(嗅觉缺失症)、味觉丧失或减弱、与癫痫相关的惊厥,所述惊厥可能是几种类型并且可能涉及意识、感官知觉或运动肌移动、对肠和膀胱的控制中断、失眠、耐力丧失、食欲改变、体温调节、月经困难、依赖行为、情绪化能力、缺乏动力、易怒、攻击性、抑郁、去抑制或拒绝/缺乏意识。

[0191] 如本文可互换使用的“泛素羧基末端水解酶L1”或“UCH-L1”是指人类中由UCH-L1基因编码的去泛素化酶。UCH-L1也称为泛素羧基末端酯酶L1和泛素硫酯酶,是其产物水解泛素的小C末端加合物以产生泛素单体的基因家族的成员。

[0192] “UCH-L1状态”可以意指在某个时间点的UCH-L1的水平或量(诸如使用UCH-L1的单个测量值)、与监测相关的UCH-L1的水平或量(诸如对受试者进行重复测试以鉴定UCH-L1量的增加或减少)、与创伤性脑损伤(无论是原发性脑损伤和/或继发性脑损伤)的治疗相关的UCH-L1的水平或量或其组合。

[0193] “变体”在本文中用于描述通过氨基酸的插入、缺失或保守性取代而在氨基酸序列方面不同,但保留至少一种生物活性的肽或多肽。“生物活性”的代表性实例包括被特异性抗体结合或促进免疫应答的能力。变体还在本文中用于描述具有与参考蛋白质基本上相同的氨基酸序列的蛋白质,所述参考蛋白质具有保留至少一种生物活性的氨基酸序列。氨基酸的保守性取代,即以相似特性(例如亲水性、带电区域的程度和分布)的不同氨基酸来替换氨基酸,在本领域中被公认为通常涉及微小变化。这些微小变化可以部分地通过考虑氨基酸的亲水性指数来鉴定,如本领域中所理解的。Kyte等人, *J. Mol. Biol.* 157:105-132 (1982)。氨基酸的亲水性指数是基于其疏水性和电荷的考虑。本领域中已知的是相似的亲水性指数的氨基酸可被取代并仍然保留蛋白质功能。在一个方面,亲水性指数为 ± 2 的氨基酸被取代。氨基酸的亲水性还可用于揭示将产生保留生物功能的蛋白质的取代。在肽的背景下考虑氨基酸的亲水性允许计算该肽最大的局部平均亲水性,其是一种已被报道与抗原性和免疫原性良好关联的有用量度。美国专利号4,554,101通过引用整体并入本文。如本领域中所了解的,具有相似亲水性值的氨基酸的取代可以产生保留生物活性(例如免疫原性)的肽。可用具有彼此在 ± 2 内的亲水性值的氨基酸进行取代。氨基酸的疏水性指数和亲水性值两者都受该氨基酸的特定侧链影响。与所述观察一致的是,与生物功能相容的氨基酸取代被理解为取决于所述氨基酸的相对相似性,并且特别是那些氨基酸的侧链,如通过疏水

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

[0194] “载体”在本文中用于描述可以转运其已连接的另一核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可以将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以被连接到病毒基因组中。某些载体可以在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们所可操作地连接的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”(或简称为“表达载体”)。一般而言,适用于重组DNA技术中的表达载体常常呈质粒形式。“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,可以使用起等同功能的其它形式的表达载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。就这一点而言,载体的RNA型式(包括RNA病毒载体)也可以用于本公开的上下文中。

[0195] 除非本文另外定义,否则与本申请关联使用的科学和技术术语将具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。例如,结合本文中描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质及核酸化学以及杂交使用的任何命名法以及其技术是本领域中熟知并且常用的那些。术语的含义和范围应为清晰的;然而,如果存在任何隐含歧义,则本文中所提供的定义优先于任何字典或外来定义。另外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数并且复数术语应包括单数。

[0196] 2. 使用来自受试者的样品帮助确定是否对已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像的方法

[0197] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行成像程序,诸如MRI或CT扫描的方法。如本文所用,“确定是否对人类受试者进行成像程序,诸如MRI或CT扫描”是指以下事实:可以例如与其它信息(例如临床评估数据)一起使用前述方法来确定受试者更可能具有阳性MRI扫描或阳性头部CT扫描,即存在颅内病变。具体地,所述方法可包括以下步骤:(a)对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合;并且(b)当所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时,对受试者执行成像程序(诸如MRI或CT扫描) (“纳入”执行成像程序),且在样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时,不对受试者执行成像程序 (“排除”执行成像程序)。样品可以是生物样品。

[0198] 在一些实施方式中,该方法可包括在疑似对受试者损伤约24小时内获得样品并使样品与TBI的早期生物标记物(诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)或其组合)的抗体接触以允许形成抗体与早期生物标记物的复合物。所述方法还包括检测所得的抗体-早期生物标记物复合物。

[0199] 在一些实施方式中,在头部损伤或疑似损伤约24小时内,诸如约0至约6小时内、约0至约8小时内、约0至约10小时内、约0至约12小时内、约0至约18小时内、约6至约12小时内、约6至约18小时内或约12至约18小时内从人类受试者取得样品。例如,可以在头部损伤或疑似损伤约0分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟、约120分钟、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或约24小时内从人类受试者取得样品。在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的存在发作在头部损伤后约0分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟、约120分钟、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或约24小时内出现。

[0200] 在一些实施方式中,受试者在进行测定之前或之后接受过成像程序,诸如MRI或CT扫描。在一些实施方式中,基于成像程序,受试者疑似患有创伤性脑损伤。在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平与阳性MRI扫描或阳性CT扫描,即存在颅内病变相关。

[0201] 通常,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平可以用作基准,以此评估基于测定测试样品的UCH-L1所获得的结果。一般来讲,在进行这种比较时,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平通过以下获得:以足够次数且在适当条件下运行特定测定法以使得可以将分析物存在性、量或浓度与TBI的特定阶段或终点或与特定标志进行相联系或关联。通常,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平通过参考受试者(或受试者群体)的测定获得。所测量的早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平包括其片段、其降解产物,和/或其酶裂解产物。

[0202] 在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平是通过具有至少约70%至约100%之间的敏感性和至少约30%至约100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中,敏感性在至少约70%至约100%之间、至少约70%至至少约99%之间、至少约70%至至少约95%之间、至少约70%至至少约90%之间、至少约70%至至少约85%之间、至少约75%至约100%之间、至少约75%至至少约99%之间、至少约75%至至少约95%之间、至少约75%至至少约90%之间、至少约75%至至少约85%之间、至少约80%至约100%之间、至少约80%至至少约99%之间、至少约80%至至少约95%之间、至少约80%至至少约90%之间、至少约80%至至少约85%之间、至少约85%至约100%之间、至少约85%至至少约99%之间、至少约85%至至少约95%之间、至少约85%至至少约90%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至至少约99%之间、至少约90%至至少约95%之间、至少约95%至约100%之间、或至少约95%至至少约99%之间。在一些实施方式中,敏感性为至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约87.5%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。

[0203] 在一些实施方式中,特异性在至少约30%至约100%之间、至少约30%至约99%之间、至少约30%至约95%之间、至少约30%至约90%之间、至少约30%至约85%之间、至少

约30%至约80%之间、至少约30%至约75%之间、至少约30%至约70%之间、至少约30%至约60%之间、至少约30%至约50%之间、至少约40%至约100%之间、至少约40%至约99%之间、至少约40%至约95%之间、至少约40%至约90%之间、至少约40%至约85%之间、至少约40%至约80%之间、至少约40%至约75%之间、至少约40%至约70%之间、至少约40%至约60%之间、至少约40%至约50%之间、至少约50%至约100%之间、至少约50%至约99%之间、至少约50%至约95%之间、至少约50%至约90%之间、至少约50%至约85%之间、至少约50%至约80%之间、至少约50%至约75%之间、至少约50%至约70%之间、至少约50%至约60%之间、至少约60%至约100%之间、至少约60%至约99%之间、至少约60%至约95%之间、至少约60%至约90%之间、至少约60%至约85%之间、至少约60%至约80%之间、至少约60%至约75%之间、至少约60%至约70%之间、至少约70%至约100%之间、至少约70%至约99%之间、至少约70%至约95%之间、至少约70%至约90%之间、至少约70%至约85%之间、至少约70%至约80%之间、至少约70%至约75%之间、至少约80%至约100%之间、至少约80%至约99%之间、至少约80%至约95%之间、至少约80%至约90%之间、至少约80%至约85%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至约99%之间、至少约90%至约95%之间、至少约95%至约99%之间、或至少约95%至约100%之间。在一些实施方式中,特异性为至少约30.0%、至少约31.0%、至少约32.0%、至少约33.0%、至少约34.0%、至少约35.0%、至少约36.0%、至少约37.0%、至少约38.0%、至少约39.0%、至少约40.0%、至少约45.0%、至少约50.0%、至少约55.0%、至少约60.0%、至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约91.0%、至少约92.0%、至少约93.0%、至少约94.0%、至少约95.0%、至少约96.0%、至少约97.0%、至少约98.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。例如,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约75%,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约99%,或敏感性为约100%并且特异性为约100%。

[0204] 在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平可在约10pg/mL至约500pg/mL之间。在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平可以在至少约10pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约40pg/mL之间、在至少约10pg/mL至约30pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约40pg/mL之间、在至少约20pg/mL至约30pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约30pg/mL至约40pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约40pg/mL至约50pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约50pg/

mL至约400pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约50pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约75pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约75pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约75pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约75pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约75pg/mL至约100pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约100pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约150pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约150pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约150pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约150pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约200pg/mL至约300pg/mL之间。例如,UCH-L1的参考水平可在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间,且GFAP的参考水平可在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

[0205] 在一些实施方式中,早期生物标记物(诸如UCH-L1、GFAP或其组合)的参考水平可以是至少约10pg/mL、至少约20pg/mL、至少约30pg/mL、至少约40pg/mL、至少约50pg/mL、至少约55pg/mL、至少约60pg/mL、至少约65pg/mL、至少约70pg/mL、至少约75pg/mL、至少约80pg/mL、至少约85pg/mL、至少约90pg/mL、至少约95pg/mL、至少约100pg/mL、至少约150pg/mL、至少约200pg/mL、至少约250pg/mL、至少约300pg/mL、至少约350pg/mL、至少约400pg/mL、至少约450pg/mL或至少约500pg/mL。在一些实施方式中,GFAP的参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。在一些实施方式中,UCH-L1的参考水平为约80pg/mL和约150pg/mL。

[0206] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤疗法治疗人类受试者和/或监测人类受试者,如下文所述。

[0207] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域普通技术人员已知的。此类测定法在本文的第5-9章节中进一步详细描述。本领域已知,在采用特定样品类型的测定法中使用的值(例如参考水平、截止值、阈值、特异性、敏感性、校准物和/或对照的浓度等)(例如像利用血清的免疫测定法或采用全血的定点照护装置)可以使用本领域已知的技术外推至其它测定形式,诸如测定标准化。例如,可以进行测定标准化的一种方式是通过将一个因子应用于测定法中采用的校准物,以使样品浓度读数更高或更低,以获得与比较器方法一致的斜率。将一种测定法上获得的结果标准化至另一种测定法的其它方法是众所周知的并且已在文献中描述(参见例如David Wild, Immunoassay Handbook, 第4版, 第3.5章, 第315-322页, 其内容通过引用并入本文)。

[0208] 3. 使用来自受试者的至少两种样品帮助确定是否对已遭受对头部的损伤的人类受试者执行成像的方法

[0209] 除了其它方法,本公开涉及一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行成像程序,诸如MRI或CT扫描的方法。如本文所用,“确定是否对人类受试者进行成像程序(诸如MRI或CT扫描)”是指以下事实:可以例如与其它信息(例如临床评估数据)一起使用所述方法来确定受试者更可能具有阳性MRI扫描或阳性头部CT扫描,即存在颅内病变。具体而言,这类方法可包括:对获自所述受试者的至少两种样品执行测定,所述两

种样品为在疑似损伤约24小时内取自受试者的第一样品和在取得第一样品之后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品；检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物，诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合；并且当从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时，对所述受试者执行成像程序（诸如MRI或CT扫描）（“纳入”执行成像程序），且当从第一样品至第二样品的早期生物标记物水平没有降低或增加至少绝对量时，不对所述受试者执行成像程序（“排除”执行成像程序）。样品可以是生物样品。

[0210] 在一些实施方式中，该方法可包括使样品与TBI的早期生物标记物（诸如泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合）的抗体接触以允许形成抗体与早期生物标记物的复合物。该方法还包括检测所得的抗体-早期生物标记物复合物以测定第一样品和第二样品的每一种的早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的水平。早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的存在在疑似损伤开始后约0至约24小时内开始呈现。在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的存在在头部损伤后约0分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟、约120分钟、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或约24小时内开始出现。

[0211] 在一些实施方式中，第一样品在疑似损伤的约24小时内的第一时间点获得并且第二样品在第一时间点后的第二时间点、或任选的第三时间点或第四时间点获得，以确定受试者是否将具有阳性或阴性MRI扫描或头部CT扫描，即存在或不存在颅内病变。在一些实施方式中，第一样品在疑似损伤之后约24小时内取得且第二样品在第一样品之后约3小时至约6小时内取得。在一些实施方式中，第一时间点是对头部损伤或疑似损伤后的约0至约24小时。例如，第一时间点可以在头部损伤或疑似损伤之后约0至约6小时内、约0至约8小时内、约0至约10小时内、约0至约12小时内、约0至约18小时内、约6至约12小时内、约6至约18小时内或约12至约18小时内。例如，可以在疑似损伤之后头部损伤或疑似损伤的约0分钟、约30分钟、约60分钟、约90分钟、约120分钟、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、约10小时、约11小时、约12小时、约13小时、约14小时、约15小时、约16小时、约17小时、约18小时、约19小时、约20小时、约21小时、约22小时、约23小时或约24小时内从人类受试者取得第一样品。

[0212] 在一些实施方式中，第二时间点、或任选的第三时间点或第四时间点是第一时间点后的约1小时至约10小时，诸如第一时间点后的约3小时至约6小时。在一些实施方式中，第二时间点是第一时间点后的约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约6小时、约7小时、约8小时、约9小时、或约10小时。

[0213] 在一些实施方式中，早期生物标记物（诸如UCH-L1、GFAP或其组合）的参考水平是通过具有至少约70%至约100%之间的敏感性和至少约30%至约100%之间的特异性的测定法确定的。在一些实施方式中，敏感性在至少约70%至约100%之间、至少约70%至至少约99%之间、至少约70%至至少约95%之间、至少约70%至至少约90%之间、至少约70%至至少约85%之间、至少约75%至约100%之间、至少约75%至至少约99%之间、至少约75%至至少约95%之间、至少约75%至至少约90%之间、至少约75%至至少约85%之间、至少约

80%至约100%之间、至少约80%至至少约99%之间、至少约80%至至少约95%之间、至少约80%至至少约90%之间、至少约80%至至少约85%之间、至少约85%至约100%之间、至少约85%至至少约99%之间、至少约85%至至少约95%之间、至少约85%至至少约90%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至至少约99%之间、至少约90%至至少约95%之间、至少约95%至约100%之间、或至少约95%至至少约99%之间。在一些实施方式中,敏感性为至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约87.5%、至少约90.0%、至少约95.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。

[0214] 在一些实施方式中,特异性在至少约30%至约100%之间、至少约30%至约99%之间、至少约30%至约95%之间、至少约30%至约90%之间、至少约30%至约85%之间、至少约30%至约80%之间、至少约30%至约75%之间、至少约30%至约70%之间、至少约30%至约60%之间、至少约30%至约50%之间、至少约40%至约100%之间、至少约40%至约99%之间、至少约40%至约95%之间、至少约40%至约90%之间、至少约40%至约85%之间、至少约40%至约80%之间、至少约40%至约75%之间、至少约40%至约70%之间、至少约40%至约60%之间、至少约40%至约50%之间、至少约50%至约100%之间、至少约50%至约99%之间、至少约50%至约95%之间、至少约50%至约90%之间、至少约50%至约85%之间、至少约50%至约80%之间、至少约50%至约75%之间、至少约50%至约70%之间、至少约50%至约60%之间、至少约60%至约100%之间、至少约60%至约99%之间、至少约60%至约95%之间、至少约60%至约90%之间、至少约60%至约85%之间、至少约60%至约80%之间、至少约60%至约75%之间、至少约60%至约70%之间、至少约70%至约100%之间、至少约70%至约99%之间、至少约70%至约95%之间、至少约70%至约90%之间、至少约70%至约85%之间、至少约70%至约80%之间、至少约70%至约75%之间、至少约80%至约100%之间、至少约80%至约99%之间、至少约80%至约95%之间、至少约80%至约90%之间、至少约80%至约85%之间、至少约90%至约100%之间、至少约90%至约99%之间、至少约90%至约95%之间、至少约95%至约99%之间、或至少约95%至约100%之间。在一些实施方式中,特异性为至少约30.0%、至少约31.0%、至少约32.0%、至少约33.0%、至少约34.0%、至少约35.0%、至少约36.0%、至少约37.0%、至少约38.0%、至少约39.0%、至少约40.0%、至少约45.0%、至少约50.0%、至少约55.0%、至少约60.0%、至少约65.0%、至少约70.0%、至少约75.0%、至少约80.0%、至少约85.0%、至少约90.0%、至少约91.0%、至少约92.0%、至少约93.0%、至少约94.0%、至少约95.0%、至少约96.0%、至少约97.0%、至少约98.0%、至少约99.0%、至少约99.1%、至少约99.2%、至少约99.3%、至少约99.4%、至少约99.5%、至少约99.6%、至少约99.7%、至少约99.8%、至少约99.9%或至少约100.0%。例如,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约75%,敏感性为至少约99%并且特异性为至少约99%,或敏感性为约100%并且特异性为约100%。

[0215] 在一些实施方式中,绝对量可以在至少约5pg/mL至约1000pg/mL之间。在一些实施方式中,绝对量可以在至少约5pg/mL至约1000pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约750pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约500pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约400pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约300pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约200pg/mL之间、在至少约5pg/mL至约100pg/mL

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

[0216] 在一些实施方式中,早期生物标记物为UCH-L1且绝对量在至少约30pg/mL至约100pg/mL之间,早期生物标记物为GFAP且绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间,或其组合。

[0217] 在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤疗法治疗人类受试者和/或监测人类受试者,如下文所述。

[0218] 本文所述方法中采用的测定法的性质并不关键,并且测试可以是本领域中已知的任何测定法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和免疫印迹分析、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法 (HPLC) 或液体色谱-质谱法 (LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域普通技术人员已知的。此类测定法在本文的第5-9章节中进一步详细描述。本领域已知,在采用特定样品类型的测定法中使用的值(例如参考水平、截止值、阈值、特异性、敏感性、校准物和/或对照的浓度等)(例如像利用血清的免疫测定法或采用全血的定点照护装置)可以使用本领域已知的技术外推至其它测定形式,诸如测定标准化。例如,可以进行测定标准化的一种方式是通过将一个因子应用于测定法中采用的校准物,以使样品浓度读数更高或更低,以获得与比较器方法一致的斜率。将针对一种测定法获得的结果标准化至另一种测定法的其它方法是众所周知的并且已在文献中描述(参见例如David Wild, Immunoassay Handbook, 第4版, 第3.5章, 第315-322页, 其内容通过引用并入本文)。

[0219] 4. 治疗和监测已遭受头部损伤的受试者

[0220] 可以治疗或监测在上文所述方法中鉴别的受试者。在一些实施方式中,所述方法进一步包括用创伤性脑损伤疗法(诸如本领域已知的任何疗法)治疗人类受试者。例如,创伤性脑损伤的治疗可以采取多种形式,这取决于对头部的损伤的严重性。例如,对于患有轻度TBI的受试者,治疗可以包括以下中的一种或多种:休息、避免身体活动(例如体育运动)、在光照下避光或戴墨镜、缓解头痛或偏头痛的药物、抗恶心药物等。针对患有中度、重度或中度至重度TBI的患者的治疗可能包括施用一种或多种合适的药物(诸如利尿剂、抗惊厥药物、用于使个体镇静并使其陷入药物引发的昏迷的药物,或其它药物或生物药物)(无论是已知还是将来开发用于TBI治疗)、一种或多种手术程序(诸如去除血肿、修复颅骨骨折、减压颅骨切除术等)、保护气道和一种或多种疗法(诸如一种或多种康复、认知行为疗法、愤怒管理、心理咨询等)。在一些实施方式中,该方法进一步包括监测人类受试者。在一些实施方式中,可用CT扫描或MRI监测受试者。

[0221] 5. 用于测量UCH-L1水平的方法

[0222] 在上文所述的方法中,UCH-L1水平可以通过任何手段测量,所述手段诸如抗体依赖性方法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析、蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法 (HPLC) 或液体色谱-质谱法 (LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。

[0223] 在一些实施方式中,测量UCH-L1的水平包括使样品与第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是捕获抗体,并且第二特异性结合成员是检测抗体。在一些实施方式中,测量UCH-L1的水平包括使样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1) 捕获抗体(例如UCH-L1捕获抗体),其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成捕获抗体-UCH-L1抗原复合物(例如UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物),和(2) 检测抗体(例如UCH-L1检测抗体),其包括可检测标记并且结合UCH-L1上未被捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-检测抗体复合物(例如UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物),使得形成捕获抗体-UCH-L1抗原-检测抗体复合物(例如UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-

UCH-L1检测抗体复合物),以及基于通过捕获抗体-UCH-L1抗原-检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中UCH-L1的量或浓度。

[0224] 在一些实施方式中,将第一特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,将第二特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是如下所述的UCH-L1抗体。

[0225] 在一些实施方式中,样品是经稀释的或未经稀释的。样品可以是约1至约25微升、约1至约24微升、约1至约23微升、约1至约22微升、约1至约21微升、约1至约20微升、约1至约18微升、约1至约17微升、约1至约16微升、约15微升或约1升、约2微升、约3微升、约4微升、约5微升、约6微升、约7微升、约8微升、约9微升、约10微升、约11微升、约12微升、约13微升、约14微升、约15微升、约16微升、约17微升、约18微升、约19微升、约20微升、约21微升、约22微升、约23微升、约24微升或约25微升。在一些实施方式中,样品为约1至约150微升或更少,或约1至约25微升或更少。

[0226] 除定点照护装置外的一些仪器(如像Abbott Laboratories仪器ARCHITECT®和其它核心实验室仪器)可能能够测量样品中高于或大于25000pg/mL的UCH-L1水平。

[0227] 其它检测方法包括使用纳米孔装置或纳米井装置或可以适于在纳米孔装置或纳米井装置上使用。纳米孔装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161402中,其据此通过引用整体并入。纳米井装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161400中,其据此通过引用整体并入。

[0228] 6.UCH-L1抗体

[0229] 文描述的方法可以使用特异性结合泛素羧基末端水解酶L1(“UCH-L1”(或其片段)的分离的抗体,称为“UCH-L1抗体”。UCH-L1抗体可用于评估作为创伤性脑损伤的量的UCH-L1状态、检测样品中UCH-L1的存在、定量样品中存在的UCH-L1的量、或检测样品中UCH-L1的存在并定量其量。

[0230] a.泛素羧基末端水解酶L1(UCH-L1)

[0231] 泛素羧基末端水解酶L1(“UCH-L1”)也称为“泛素C末端水解酶”,是去泛素化酶。UCH-L1是其产物水解泛素的小C末端加合物以产生泛素单体的基因家族的成员。UCH-L1的表达对神经元和弥漫性神经内分泌系统及其肿瘤的细胞具有高度特异性。它大量存在于所有神经元(占总脑蛋白的1%-2%)中,在神经元和睾丸/卵巢中特异性表达。UCH-L1的催化三联体含有在第90位的半胱氨酸、在第176位的天冬氨酸和在第161位的组氨酸,它们负责其水解酶活性。

[0232] 人类UCH-L1可具有以下氨基酸序列:

[0233] MQLKPMEINPEMLNKLVSRLGVAGQWRFVDVLGLEEESLGSPAPACALLLLFPLTAQHENFRKKQIE
ELKGQEVSPKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDKLGFEDGSVLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIQAAHD
AVAQEGQCRVDDKVNHFHILFNNVDGHLIELDGRMPFPVNHGASSEDTLKDKAAKVCREFTEREQGEVRFSAVALC
KAA (SEQ ID NO:1)。

[0234] 人类UCH-L1可以是SEQ ID NO:1的片段或变体。UCH-L1的片段的长度可以是在5与225个氨基酸之间、10与225个氨基酸之间、50与225个氨基酸之间、60与225个氨基酸之间、65与225个氨基酸之间、100与225个氨基酸之间、150与225个氨基酸之间、100与175个氨基酸之间或175与225个氨基酸之间。片段可以包含来自SEQ ID NO:1的多个连续氨基酸。

[0235] b.UCH-L1识别抗体

[0236] 抗体是与UCH-L1、其片段、UCH-L1的表位或其变体结合的抗体。抗体可以是抗UCH-L1抗体的片段或其变体或衍生物。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体、完全人抗体或抗体片段(诸如Fab片段),或其混合物。抗体片段或衍生物可包括F(ab')₂、Fv或scFv片段。抗体衍生物可以通过模拟肽产生。此外,描述用于产生单链抗体的技术可以适用于产生单链抗体。

[0237] 抗UCH-L1抗体可以是嵌合抗UCH-L1或人源化抗UCH-L1抗体。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体都是单价的。在一个实施方式中,人源化抗体和嵌合抗体均包含与Fc区连接的单个Fab区。

[0238] 人抗体可以源自噬菌体展示技术或源自表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。人抗体可以作为人体内免疫应答的结果产生并且被分离。参见例如Funaro等人,BMC Biotechnology,2008(8):85。因此,抗体可以是人而非动物谱系的产物。因为它是人源性的,所以可以最小化对自身抗原反应的风险。另选地,标准酵母展示文库和展示技术可用于选择和分离人抗UCH-L1抗体。例如,天然人单链可变片段(scFv)的文库可用于选择人抗UCH-L1抗体。转基因动物可用于表达人抗体。

[0239] 人源化抗体可以是结合所需抗原的来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0240] 所述抗体与已知抗体的区别在于它具有与本领域中已知的抗体不同的生物学功能。

[0241] (1) 表位

[0242] 抗体可以免疫特异性结合UCH-L1(SEQ ID NO:1)、其片段或其变体。抗体可以免疫特异性识别并结合表位区域内的至少三个氨基酸、至少四个氨基酸、至少五个氨基酸、至少六个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸或至少十个氨基酸。抗体可以免疫特异性识别并结合这样的表位,所述表位具有表位区域的至少三个连续氨基酸、至少四个连续氨基酸、至少五个连续氨基酸、至少六个连续氨基酸、至少七个连续氨基酸、至少八个连续氨基酸、至少九个连续氨基酸或至少十个连续氨基酸。

[0243] c. 抗体制备/产生

[0244] 抗体可以通过多种技术,包括本领域技术人员熟知的那些技术中的任何一种制备。一般来讲,抗体可以通过细胞培养技术产生,所述细胞培养技术包括经由常规技术或通过将抗体基因、重链和/或轻链转染到合适的细菌或哺乳动物细胞宿主中以允许产生抗体(其中抗体可以是重组的)来进行单克隆抗体的生成。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为此类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0245] 用于表达重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216-4220(1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol,159:601-621(1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体

引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0246] 宿主细胞也可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可以对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣抗原所必需的轻链和重链中的任一个或两者的DNA。所述抗体也涵盖由此类截短DNA分子表达的分子。此外,可通过用标准化学交联方法使抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是抗体(即结合人UCH-L1)且另一重链和另一轻链对除人UCH-L1以外的抗原具有特异性。

[0247] 在用于重组表达抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体内,使抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至CMV增强子/AdMLP启动子调控元件以驱动基因高度转录。重组表达载体也带有DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选择的转化株宿主细胞以便允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中回收完整抗体。将标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞,并且从培养基中回收抗体。更进一步地,合成重组抗体的方法可以通过在适合培养基中培养宿主细胞,直到合成重组抗体进行。所述方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0248] 制备单克隆抗体的方法涉及制备能够产生具有所需特异性的抗体的永生细胞系。此类细胞系可以由从免疫动物获得的脾细胞产生。可以用UCH-L1或其片段和/或变体免疫动物。用于免疫动物的肽可以包含编码人Fc(例如片段可结晶区)或人抗体的尾区的氨基酸。然后可以通过例如与骨髓瘤细胞融合配偶体的融合使脾细胞永生。可以采用多种融合技术。例如,可以将脾细胞和骨髓瘤细胞与非离子洗涤剂合并几分钟,然后以低密度接种在支持杂交细胞生长但不支持骨髓瘤细胞生长的选择性培养基上。一种这样的技术使用次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷(HAT)选择。另一种技术包括电融合。经过足够的时间,通常约1至2周后,观察到杂交体的集落。选择单一集落并测试其培养物上清液对多肽的结合活性。可以使用具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0249] 可以从生长的杂交瘤集落的上清液中分离单克隆抗体。此外,可以采用各种技术来提高产量,诸如将杂交瘤细胞系注射到合适的脊椎动物宿主(诸如小鼠)的腹膜腔中。然后可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。可以通过常规技术,诸如色谱法、凝胶过滤、沉淀和提取从抗体中除去污染物。亲和色谱法是在纯化抗体的过程中使用的方法的实例。

[0250] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先裂解IgG分子以产生数个片段,其中两个(F(ab)片段)各自包含包括完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够裂解IgG分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。

[0251] Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解裂解以及偶尔蛋白水解裂解IgG或IgA免疫球蛋白分子来产生。可以使用重组技术衍生Fv片段。Fv片段包括非共价VH::VL异二聚体,其包括保留了天然抗体分子的大部分抗原识别能力和结合能力的抗原结合位点。

[0252] 抗体、抗体片段或衍生物可包含分别插置在重链框架("FR")组和轻链框架("FR")

组之间的重链互补决定区(“CDR”)组和轻链互补决定区(“CDR”)组,所述框架组为CDR提供支撑并限定CDR相对于彼此的空间关系。CDR组可含有重链或轻链V区的三个高变区。

[0253] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它合适方法,包括但不限于从肽或蛋白质文库(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA、酵母等展示库)中选择重组抗体的方法;例如使用本领域中已知的方法可从各种商业供应商诸如Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire,UK)、MorphoSys (Martinsreid/Planegg, Del.)、Biovation (Aberdeen, Scotland, UK) BioInvent (Lund, Sweden) 获得的。参见美国专利号4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514、5,976,862。另选的方法依赖于免疫能够产生人抗体谱系的转基因动物(例如SCID小鼠, Nguyen等人(1997) *Microbiol. Immunol.* 41:901-907; Sandhu等人(1996) *Crit. Rev. Biotechnol.* 16:95-118; Eren等人(1998) *Immunol.* 93:154-161), 如本领域中已知的和/或如本文所述的。此类技术包括但不限于核糖体展示(Hanes等人(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:4937-4942; Hanes等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14130-14135); 单细胞抗体产生技术(例如选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”) (美国专利号5,627,052, Wen等人(1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); 凝胶微滴和流式细胞术(Powell等人(1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass) .; Gray等人(1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; Kenny等人(1995) *Bio/Technol.* 13:787-790); B细胞选择(Steenbakkers等人(1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134 (1994))。

[0254] 亲和力成熟抗体可以通过本领域中已知的多种程序中的任一种产生。例如,参见Marks等人, *BioTechnology* 10:779-783 (1992) 描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机诱变由以下描述: Barbas等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813 (1994); Schier等人, *Gene*, 169:147-155 (1995); Yelton等人, *J. Immunol.*, 155:1994-2004 (1995); Jackson等人, *J. Immunol.*, 154(7):3310-3319 (1995); Hawkins等人, *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。在选择性诱变位置和在选择性或超突变位置由活性增强氨基酸残基进行的选择性突变描述于美国专利号6,914,128B1。

[0255] 抗体变体还可以利用以下制备:将编码抗体的多核苷酸递送至合适的宿主,诸如以提供在其乳汁中产生此类抗体的转基因动物或哺乳动物,诸如山羊、牛、马、绵羊等来制备。这些方法在本领域中是已知的并且例如描述于美国专利号5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362和5,304,489中。

[0256] 抗体变体也可通过以下制备:递送多核苷酸以提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍),它们在植物部分或由其培养的细胞中产生此类抗体、特定部分或变体。例如, Cramer等人(1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 240:95-118和其中引用的参考文献描述了例如使用诱导型启动子产生表达大量重组蛋白的转基因烟草叶。转基因玉米已用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白质,其生物活性与在其它重组系统中产生的或从天然来源纯化的那些相当。参见例如Hood等人, *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999) 464:127-147和其中引用的参考文献。抗体变体也已经由包括抗体片段,诸如单链抗体(scFv)的转基因植物种子,包括烟草种子和马铃薯块茎大量产生。参见例如Conrad等人(1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109和其中引用的参考文献。因此,根据已知方法,也可以使用转基因植

物产生抗体。

[0257] 可以例如通过添加外源性序列来修饰免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、缔合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其它合适的特征来产生抗体衍生物。一般来讲,保持非人或人CDR序列的一部分或全部,同时用人或其它氨基酸替换可变区和恒定区的非人序列。

[0258] 小抗体片段可以是具有两个抗原结合位点的双体,其中片段包含于同一多肽链(VH VL)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。参见例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448。通过使用太短而不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。还参见授予Chen等人的美国专利6,632,926,其通过引用整体并入本文,并且公开了抗体变体,所述抗体变体具有一个或多个插入到亲本抗体的高变区中的氨基酸并且对靶抗原的结合亲和力比亲本抗体对抗原的结合亲和力强至少约2倍。

[0259] 抗体可以是线性抗体。用于制备线性抗体的程序在本领域中是已知的并描述于Zapata等人,(1995)Protein Eng.8(10):1057-1062。简而言之,这些抗体包含一对串联Fd片段(VH-CH1-VH-CH1),所述片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0260] 可以通过已知方法从重组细胞培养物中回收和纯化抗体,所述已知方法包括但不限于蛋白A纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法。高效液相色谱法(“HPLC”)也可用于纯化。

[0261] 可检测地标记抗体可能是有用的。用于将抗体缀合至这些试剂的方法在本领域中是已知的。仅出于说明的目的,可以用可检测部分,诸如放射性原子、发色团、荧光团等标记抗体。此类标记的抗体可以在体内或在分离的测试样品中用于诊断技术。它们可以与细胞因子、配体、另一种抗体连接。用于偶联抗体以实现抗肿瘤作用的合适试剂包括细胞因子,诸如白介素2(IL-2)和肿瘤坏死因子(TNF);用于光动力疗法中的光敏剂,包括酞菁四磺酸铝(III)、血卟啉和酞菁;放射性核素,诸如碘-131(131I)、钇-90(90Y)、铋-212(212Bi)、铋-213(213Bi)、锝-99m(99mTc)、铼-186(186Re)和铼-188(188Re);抗生素,诸如多柔比星、阿霉素、柔红霉素、甲氨蝶呤、道诺霉素、新抑癌素和卡铂;细菌、植物和其它毒素,诸如白喉毒素、假单胞菌外毒素A、葡萄球菌肠毒素A、相思豆毒素蛋白-A毒素、蓖麻毒素A(去糖基化蓖麻毒素A和天然蓖麻毒素A)、TGF- α 毒素、来自中华眼镜蛇(*naja naja atra*)的细胞毒素和白树毒素(一种植物毒素);来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白,诸如局限曲菌素(一种由局限曲霉(*Aspergillus restrictus*)产生的核糖体失活蛋白)、皂草素(一种来自石碱草(*Saponaria officinalis*)的核糖体失活蛋白)和RNase;酪氨酸激酶抑制剂;ly207702(二氟化嘌呤核苷);含有反囊性剂的脂质体(例如,反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等);和其它抗体或抗体片段,诸如F(ab)。

[0262] 经由使用杂交瘤技术、选择的淋巴细胞抗体方法(SLAM)、转基因动物和重组抗体文库进行的抗体产生在下面更详细地描述。

[0263] (1) 使用杂交瘤技术的抗UCH-L1单克隆抗体

[0264] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术(包括使用杂交瘤、重组体和噬菌

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

[0265] 产生单克隆抗体的方法以及由所述方法产生的抗体可以包括培养分泌本发明抗体的杂交瘤细胞,其中杂交瘤优选通过以下产生:将从用UCH-L1免疫的动物,例如大鼠或小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合,然后筛选由融合产生的杂交瘤中分泌能够结合本发明多肽的抗体的杂交瘤克隆。简而言之,可以用UCH-L1抗原免疫大鼠。在优选的实施方式中,将UCH-L1抗原与佐剂一起施用以刺激免疫应答。此类佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。此类佐剂可以通过将多肽隔离在局部储库中来保护多肽免于快速分散,或者它们可以含有刺激宿主分泌对巨噬细胞和免疫系统的其它组分具有趋化性的因子的物质。优选地,如果正在施用多肽,则免疫程序将涉及多肽的两次或更多次施用,散布于数周内;然而,也可以使用多肽的单次施用。

[0266] 在用UCH-L1抗原免疫动物后,可以从动物获得抗体和/或产生抗体的细胞。通过将动物放血或处死,从动物获得含有抗UCH-L1抗体的血清。可以按从动物获得的原样使用血清,可以从血清中获得免疫球蛋白部分,或者可以从血清中纯化抗UCH-L1抗体。以这种方式获得的血清或免疫球蛋白是多克隆的,因此具有异质的一系列特性。

[0267] 一旦检测到免疫应答,例如,在大鼠血清中检测到对抗原GFAP具有特异性的抗体,就收获大鼠脾并且分离脾细胞。然后通过熟知的技术使脾细胞与任何适合骨髓瘤细胞(例如来自可从American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, Va., US)获得的细胞系SP20的细胞)融合。通过限制稀释法选择和克隆杂交瘤。然后通过本领域中已知的方法测定杂交瘤克隆中分泌能够结合UCH-L1的抗体的细胞。可以通过用阳性杂交瘤克隆免疫大鼠来产生通常含有高水平抗体的腹水。

[0268] 在另一个实施方式中,产生抗体的永生化杂交瘤可以从免疫化动物制备。在免疫之后,将动物处死并且将脾B细胞按本领域熟知的那样融合至永生化骨髓瘤细胞。参见例如Harlow和Lane, 同上。在优选的实施方式中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。在融合和抗生素选择后,使用UCH-L1或其部分或表达UCH-L1的细胞筛选杂交瘤。在优选的实施方式中,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA),优选ELISA进行初始筛选。PCT公开号WO 00/37504中提供了ELISA筛选的实例。

[0269] 选择产生抗UCH-L1抗体的杂交瘤、将其克隆并且进一步针对所需特征,包括稳健的杂交瘤生长、高抗体产生和所需的抗体特征进行筛选。杂交瘤可以在同系动物、缺乏免疫系统的动物(例如裸鼠)中体内培养和扩增,或者在细胞培养物中体外培养和扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法是本领域普通技术人员所熟知的。

[0270] 在优选的实施方式中,杂交瘤是大鼠杂交瘤。在另一个实施方式中,杂交瘤在非人、非大鼠物种,诸如小鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中产生。在又一个优选的实施方式中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌性骨髓瘤与表达抗UCH-L1抗体的人细胞融合。

[0271] 可通过已知技术产生识别特定表位的抗体片段。例如,可以通过使用酶(诸如木瓜蛋白酶(以产生两个相同的Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段))对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生本发明的Fab和F(ab')₂片段。IgG分子的F(ab')₂片段保留了较大(“亲本”)IgG分子的两个抗原结合位点,包括轻链(含有可变轻链区和恒定轻链区)、重链的CH1结构域、和亲本IgG分子的形成二硫键的铰链区。因此,F(ab')₂片段仍然能够交联抗原分子,如亲本IgG分子。

[0272] (2) 使用SLAM的抗UCH-L1单克隆抗体

[0273] 在本发明的另一方面,使用本领域中称为选择的淋巴细胞抗体方法(SLAM)的方法,从单个分离的淋巴细胞产生重组抗体,如美国专利号5,627,052;PCT公开号W0 92/02551;和Babcook等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:7843-7848(1996)中所述。在该方法中,使用抗原特异性溶血空斑测定法筛选分泌感兴趣抗体的单细胞,例如源自任何一只免疫动物的淋巴细胞,其中使用接头(诸如生物素)将抗原UCH-L1、UCH-L1的亚基或其片段与绵羊红细胞偶联,并且用于鉴定分泌对UCH-L1具有特异性的抗体的单细胞。在鉴定感兴趣抗体分泌细胞后,通过逆转录酶-PCR(RT-PCR)从细胞中挽救重链和轻链可变区cDNA,然后这些可变区可以在哺乳动物宿主细胞,诸如COS或CHO细胞中、在适当的免疫球蛋白恒定区(例如人恒定区)的背景下表达。用源自体内选择的淋巴细胞的扩增的免疫球蛋白序列转染的宿主细胞然后可以在体外进行进一步的分析和选择,例如,通过淘选转染的细胞以分离表达针对UCH-L1的抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列可以进一步在体外操纵,诸如通过体外亲和力和成熟方法。参见例如PCT公开号W0 97/29131和PCT公开号W0 00/56772。

[0274] (3) 使用转基因动物的抗UCH-L1单克隆抗体

[0275] 在本发明的另一个实施方式中,通过用UCH-L1抗原免疫包含一些或全部人免疫球蛋白基因座的非人动物来产生抗体。在一个实施方式中,非人动物是**XENOMOUSE®**转基因小鼠,一种包含人免疫球蛋白基因座的较大片段且缺乏小鼠抗体产生的工程化小鼠品系。参见例如Green等人,Nature Genetics,7:13-21(1994)和美国专利号5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598和6,130,364。还参见PCT公开号W0 91/10741、W0 94/02602、W0 96/34096、W0 96/33735、W0 98/16654、W0 98/24893、W0 98/50433、W0 99/45031、W0 99/53049、W0 00/09560和W0 00/37504。**XENOMOUSE®**转基因小鼠产生完全人抗体的成人样人谱系,并且产生抗原特异性人单克隆抗体。**XENOMOUSE®**转基因小鼠通过引入人重链基因座和x轻链基因座的兆碱基大小的种系构型YAC片段而含有约80%的人抗体谱系。参见Mendez等人,Nature Genetics,15:146-156(1997);Green和Jakobovits,J.Exp.Med.,188:483-495(1998),其公开据此通过引用并入。

[0276] (4) 使用重组抗体文库的抗UCH-L1单克隆抗体

[0277] 体外方法也可用于制备本发明的抗体,其中筛选抗体文库以鉴定具有所需的UCH-L1结合特异性的抗体。关于重组抗体文库的这种筛选的方法在本领域中是熟知的,且包括在以下中描述的方法:例如美国专利号5,223,409(Ladner等人);PCT公开号W0 92/18619(Kang等人);PCT公开号W0 91/17271(Dower等人);PCT公开号W0 92/20791(Winter等人);PCT公开号W0 92/15679(Markland等人);PCT公开号W0 93/01288(Breitling等人);PCT公开号W0 92/01047(McCafferty等人);PCT公开号W0 92/09690(Garrard等人);Fuchs等人,

Bio/Technology, 9:1369-1372 (1991); Hay等人, Hum. Antibod. Hybridomas, 3:81-85 (1992); Huse等人., Science, 246:1275-1281 (1989); McCafferty等人, Nature, 348:552-554 (1990); Griffiths等人., EMBO J., 12:725-734 (1993); Hawkins等人., J. Mol. Biol., 226:889-896 (1992); Clackson等人., Nature, 352:624-628 (1991); Gram等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580 (1992); Garrard等人., Bio/Technology, 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom等人., Nucl. Acids Res., 19:4133-4137 (1991); Barbas等人., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:7978-7982 (1991); 美国专利申请公开号2003/0186374; 和 PCT公开号W0 97/29131, 其各自内容通过引用并入本文。

[0278] 重组抗体文库可来自用UCH-L1或UCH-L1的一部分免疫的受试者。另选地, 重组抗体文库可来自初试受试者, 即尚未用UCH-L1免疫的受试者, 诸如来自尚未用人UCH-L1免疫的人受试者的人抗体文库。通过用包括人UCH-L1的肽筛选重组抗体文库以由此选择识别UCH-L1的那些抗体来选择本发明的抗体。用于进行这种筛选和选择的方法在本领域中是熟知的, 诸如先前段落中的参考文献中所述。为选择对UCH-L1具有特定结合亲和力的本发明抗体, 诸如以特定 K_{off} 速率常数自人UCH-L1解离的抗体, 可使用本领域中已知的表面等离子体共振方法来选择具有所需 K_{off} 速率常数的抗体。为选择对hUCH-L1具有特定中和活性的本发明抗体, 诸如具有特定 IC_{50} 的抗体, 可使用本领域中已知用于评估对UCH-L1活性的抑制的标准方法。

[0279] 在一个方面, 本发明涉及一种结合人UCH-L1的分离的抗体、或其抗原结合部分。优选地, 抗体是中和抗体。在各种实施方式中, 抗体是重组抗体或单克隆抗体。

[0280] 例如, 也可使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法来产生抗体。在噬菌体展示方法中, 将功能性抗体结构域展示于携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。这种噬菌体可用于展示自谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可用抗原, 例如使用标记的抗原或结合于或捕获于固体表面或珠粒的抗原来选择或鉴定表达结合感兴趣抗原的抗原结合结构域的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体, 其包括fd和M13结合结构域, 由具有重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白质的Fab、Fv或二硫键稳定的Fv抗体结构域的噬菌体表达。可用于制备抗体的噬菌体展示方法的实例包括在以下中公开的方法: Brinkmann等人, J. Immunol. Methods, 182:41-50 (1995); Ames等人, J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995); Kettleborough等人, Eur. J. Immunol., 24:952-958 (1994); Persic等人, Gene, 187:9-18 (1997); Burton等人, Advances in Immunology, 57:191-280 (1994); PCT公开号W0 92/01047; PCT公开号W0 90/02809; W0 91/10737; W0 92/01047; W0 92/18619; W0 93/11236; W0 95/15982; W0 95/20401; 和美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108。

[0281] 如上述参考文献中所述, 在噬菌体选择后, 可从噬菌体分离抗体编码区并用于产生完整抗体, 包括人抗体, 或任何其它所需的抗原结合片段, 并且在任何所需宿主中表达, 所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌, 例如如下文所述。例如, 也可使用本领域中已知的方法来采用用于重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术, 诸如以下中所公开的技术: PCT公开号W0 92/22324; Mullinax等人, BioTechniques, 12(6):864-869 (1992); Sawai等人, Am. J. Reprod. Immunol., 34:26-34 (1995); 和Better等人, Science,

240:1041-1043 (1988)。可用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括美国专利号4,946,778和5,258,498;Huston等人,Methods in Enzymology,203:46-88 (1991);Shu等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:7995-7999 (1993);和Skerra等人,Science,240:1038-1041 (1988)中所述的技术。

[0282] 作为通过噬菌体展示来筛选重组抗体文库的替代方案,本领域中已知用于筛选大型组合文库的其它方法可应用于鉴定本发明抗体。如PCT公开号W0 98/31700 (Szostak和Roberts)和Roberts和Szostak,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:12297-12302 (1997)中所述,一类替代性表达系统是重组抗体文库表达为RNA-蛋白质融合物的表达系统。在这个系统中,通过在体外翻译于3'末端处带有嘌呤霉素(一种肽基受体抗生素)的合成mRNA来在mRNA与其编码的肽或蛋白质之间产生共价融合物。因此,可基于所编码的肽或蛋白质(例如抗体或其部分)的特性(诸如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合),自mRNA的复杂混合物(例如组合文库)富集特异性mRNA。可通过如上所述的重组方式(例如在哺乳动物宿主细胞中)表达从筛选此类文库所回收的编码抗体或其部分的核酸序列,并且另外可通过对突变已引入到最初选择的序列中的mRNA-肽融合物进行更多轮筛选或通过如上所述的用于重组抗体的体外亲和力成熟的其它方法来经受进一步亲和力成熟。该方法的优选实例是PROfusion展示技术。

[0283] 在另一种途径中,抗体也可使用本领域中已知的酵母展示方法来产生。在酵母展示方法中,使用遗传方法将抗体结构域系栓至酵母细胞壁并且使它们展示于酵母表面上。具体来说,这种酵母可用于展示从谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可用于制备抗体的酵母展示方法的实例包括通过引用并入本文的美国专利号6,699,658 (Wittrup等人)中公开的方法。

[0284] d.产生重组UCH-L1抗体

[0285] 抗体可通过本领域中已知的许多技术中的任一个产生。例如,从宿主细胞表达,其中通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染至宿主细胞中。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为此类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0286] 用于表达本发明重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216-4220 (1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol,159:601-621 (1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0287] 宿主细胞也可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码本发明抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣

抗原所必需的轻链和重链中的任一个或两者的DNA。本发明抗体也涵盖由此类截短DNA分子表达的分子。此外,可通过用标准化学交联方法使本发明抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是本发明抗体(即结合人UCH-L1)且另一重链和另一轻链对非人UCH-L1的抗原具有特异性。

[0288] 在用于重组表达本发明抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体内,使抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至CMV增强子/AdMLP启动子调控元件以驱动基因高度转录。重组表达载体也带有DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选择的转化株宿主细胞以便允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中回收完整抗体。将标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞,并且从培养基中回收抗体。更进一步地,本发明提供了合成本发明的重组抗体的方法,所述方法通过在适合培养基中培养本发明的宿主细胞,直到合成本发明的重组抗体进行。所述方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0289] (1) 人源化抗体

[0290] “人源化抗体”可以是抗体或其变体、衍生物、类似物或部分,其免疫特异性地结合感兴趣抗原且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的框架(FR)区和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区(CDR)。人源化抗体可以来自结合所需抗原的非人物种抗体,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0291] 如本文所用,在CDR的背景下的术语“基本上”是指氨基酸序列与非人抗体CDR的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少98%或至少99%相同的CDR。人源化抗体包含至少一个且通常两个可变结构域的基本上全部(Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv),其中全部或基本上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白(即供体抗体)的那些CDR区并且全部或基本上全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。根据一个方面,人源化抗体也包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(通常人免疫球蛋白的恒定区)的至少一部分。在一些实施方式中,人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域两者。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。在一些实施方式中,人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中,人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方式中,人源化抗体仅含有轻链和/或重链的人源化可变结构域。

[0292] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,以及任何同种型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列,并且可以使用本领域中熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能。

[0293] 人源化抗体的框架区和CDR区无需精确对应于亲本序列,例如可以通过取代、插入或/或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体CDR或共有框架进行诱变以使该位点处的CDR或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而,在一个实施方式中,此类突变将不是广泛的。通常,至少90%、至少95%、至少98%、或至少99%的人源化抗体残基将对应于亲本FR和CDR序列的那些。如本文所用,术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用,术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸(或核苷酸)形成的序列(参见例如Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中,共有序列中的

每个位置由家族中最常出现在那个位置的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现，那么共有序列中可包括任一者。

[0294] 可以设计人源化抗体以使对啮齿动物抗人抗体的不想要的免疫应答最小化，这限制了那些部分在人类接受者中的治疗应用的持续时间和有效性。人源化抗体可以具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人残基常常被称为“输入”残基，其通常取自可变结构域。可以通过用高变区序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体，其中显著小于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。例如，参见美国专利号4,816,567，其内容通过引用并入本文。人源化抗体可以是人抗体，其中一些高变区残基和可能的一些FR残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。可以使用任何已知方法进行对本发明抗体的人源化或工程化，诸如但不限于美国专利号5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539和4,816,567中所述的方法。

[0295] 人源化抗体可以保留对UCH-L1的高亲和力和其它有利的生物特性。可以使用亲本序列和人源化序列的三维模型，通过亲本序列和各种概念性人源化的产物的分析方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的。说明和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用进行分析，即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。以这种方式，可从接受者和输入序列中选择和合并FR残基，从而实现所需的抗体特征，诸如增加的对UCH-L1的亲合力。一般来讲，高变区残基可能直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0296] 作为人源化的替代方案，可以产生人抗体（在本文中也称为“完全人抗体”）。例如，可以经由PROfusion和/或酵母相关技术从文库中分离人抗体。还可以产生转基因动物（例如小鼠），所述转基因动物能够在免疫后在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全谱系。例如，在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区（J_H）基因的纯合子缺失导致完全抑制内源性抗体产生。人种系免疫球蛋白基因阵列在这种种系突变小鼠中的转移将导致在抗原激发后产生人抗体。人源化或完全人抗体可以根据美国专利号5,770,429、5,833,985、5,837,243、5,922,845、6,017,517、6,096,311、6,111,166、6,270,765、6,303,755、6,365,116、6,410,690、6,682,928和6,984,720中所述的方法来制备，其各自内容通过引用并入本文。

[0297] e. 抗UCH-L1抗体

[0298] 可以使用上述技术以及使用本领域中已知的常规技术产生抗UCH-L1抗体。在一些实施方式中，抗UCH-L1抗体可以是未缀合的UCH-L1抗体，诸如可从以下公司获得的UCH-L1抗体：United State Biological（目录号：031320）、Cell Signaling Technology（目录号：3524）、Sigma-Aldrich（目录号：HPA005993）、Santa Cruz Biotechnology, Inc.（目录号：sc-58593或sc-58594）、R&D Systems（目录号：MAB6007）、Novus Biologicals（目录号：NB600-1160）、Biorbyt（目录号：orb33715）、Enzo Life Sciences, Inc.（目录号：ADI-905-520-1）、Bio-Rad（目录号：VMA00004）、BioVision（目录号：6130-50）、Abeam（目录号：ab75275或ab104938）、Invitrogen Antibodies（目录号480012）、ThermoFisher

Scientific(目录号:MA1-46079、MA5-17235、MA1-90008或MA1-83428)、EMD Millipore(目录号:MABN48)或Sino Biological Inc.(目录号:50690-R011)。抗UCH-L1抗体可以与荧光团缀合,诸如可从BioVision(目录号:6960-25)或Aviva Systems Biology(目录号OAAF01904-FITC)获得的缀合的UCH-L1抗体。

[0299] 7. 用于测量GFAP水平的方法

[0300] 在上文所述的方法中,GFAP水平可以通过任何手段测量,所述手段诸如抗体依赖性方法,诸如免疫测定法、蛋白质免疫沉淀法、免疫电泳法、化学分析法、SDS-PAGE和蛋白质印迹分析、或蛋白质免疫染色法、电泳分析法、蛋白质测定法、竞争性结合测定法、功能性蛋白质测定法、或色谱或光谱法,诸如高效液相色谱法(HPLC)或液体色谱-质谱法(LC/MS)。另外,测定法可以以临床化学形式采用,诸如将由本领域技术人员已知的。

[0301] 在一些实施方式中,测量GFAP的水平包括使样品与第一特异性结合成员和第二特异性结合成员接触。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是捕获抗体,并且第二特异性结合成员是检测抗体。在一些实施方式中,测量GFAP的水平包括使样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1)捕获抗体(例如GFAP捕获抗体),其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成捕获抗体-GFAP抗原复合物(例如GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物),和(2)检测抗体(例如GFAP检测抗体),其包括可检测标记并且结合GFAP上未被捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-检测抗体复合物(例如GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物),使得形成捕获抗体-GFAP抗原-检测抗体复合物(例如GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物),以及基于通过捕获抗体-GFAP抗原-检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中GFAP的量或浓度。

[0302] 在一些实施方式中,将第一特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,将第二特异性结合成员固定化在固体支持物上。在一些实施方式中,第一特异性结合成员是如下所述的GFAP抗体。

[0303] 在一些实施方式中,样品是经稀释的或未经稀释的。样品可以是约1至约25微升、约1至约24微升、约1至约23微升、约1至约22微升、约1至约21微升、约1至约20微升、约1至约18微升、约1至约17微升、约1至约16微升、约15微升或约1升、约2微升、约3微升、约4微升、约5微升、约6微升、约7微升、约8微升、约9微升、约10微升、约11微升、约12微升、约13微升、约14微升、约15微升、约16微升、约17微升、约18微升、约19微升、约20微升、约21微升、约22微升、约23微升、约24微升或约25微升。在一些实施方式中,样品为约1至约150微升或更少或约1至约25微升或更少。

[0304] 除定点照护装置外的一些仪器(如像Abbott Laboratories仪器ARCHITECT®和其它核心实验室仪器)可能能够测量样品中高于或大于25000pg/mL的UCH-L1水平。

[0305] 其它检测方法包括使用纳米孔装置或纳米井装置或可以适于在纳米孔装置或纳米井装置上使用。纳米孔装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161402中,其据此通过引用整体并入。纳米井装置的实例描述于国际专利公开号W0 2016/161400中,其据此通过引用整体并入。

[0306] 8. GFAP抗体

[0307] 本文描述的方法可以使用特异性结合胶质细胞原纤维酸性蛋白(“GFAP”)(或其片段)的分离的抗体,称为“GFAP抗体”。GFAP抗体可用于评估作为创伤性脑损伤的量的GFAP

状态、检测样品中GFAP的存在、定量样品中存在的GFAP的量、或检测样品中GFAP的存在并定量其量。

[0308] a. 胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP)

[0309] 胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 是一种50kDa的胞浆内丝状蛋白, 构成星形胶质细胞中细胞骨架的一部分, 它已被证明是星形细胞来源的最具特异性的标记物。GFAP蛋白质由人类中的GFAP基因编码。GFAP是成熟星形胶质细胞的主要中间丝。在分子的中央棒状结构域中, GFAP与其它中间丝共有大量结构同源性。GFAP通过为星形胶质细胞过程提供结构稳定性来参与星形胶质细胞的活动性和形状。胶质细胞原纤维酸性蛋白及其分解产物 (GFAP-BDP) 是在创伤性脑损伤 (TBI) 后作为病理生理反应的一部分释放到血液中的脑特异性蛋白。在创伤、遗传病症或化学物质对人类CNS造成损伤之后, 星形胶质细胞增殖并显示出广泛的细胞体肥大和过程, 且GFAP明显上调。相比之下, 随着星形胶质细胞恶性增加, 存在GFAP产生的渐进损失。也可以在以下中检测到GFAP: 施万细胞 (Schwann cell)、肠胶质细胞、唾液腺赘生物、转移性肾癌、会厌软骨、垂体细胞、未成熟少突胶质细胞、乳头状脑膜瘤和乳腺肌上皮细胞。

[0310] 人类GFAP可具有以下氨基酸序列:

[0311] MERRRITSAARRSYVSSGEMMVGGGLAPGRRLLGPGTRLRLSLARMPPLPTRVDFSLAGALNAGFKETRAS
ERAEMMELNDRFASYIEKVRFLQEQNKALAAELNQLRAKEPTKLADVYQAELELRLRLDQLTANSARLEVERDNL
AQDLATVRQKLQDETNLRLAENNLAAAYRQEADEATLARLDLERKIESLEEEIRFLRKIHEEEVRELQEQLARQQV
HVELDVAKPDLTAALKEIRTQYEAMASSNMHEAEWYRSKFADLTDAARNAELLRQAKHEANDYRRQLQSLTCDL
ESLRGTNESLERQMREQEERHVREAASYQEALARLEEEGQSLKDEMARHLQEYQDLLNVKLALDIEIATYRKLLEG
EENRITIPVQTFSNLQIRETSLDTKSVSEGLKRNIVVKTVMRDGEVIKESKQEHKDV (SEQ ID NO: 2)。

[0312] 人类GFAP可以是SEQ ID NO: 2的片段或变体。GFAP的片段的长度可以在5与400个氨基酸之间、10与400个氨基酸之间、50与400个氨基酸之间、60与400个氨基酸之间、65与400个氨基酸之间、100与400个氨基酸之间、150与400个氨基酸之间、100与300个氨基酸之间或200与300个氨基酸之间。片段可以包含来自SEQ ID NO: 2的多个连续氨基酸。SEQ ID NO: 2的人类GFAP片段或变体可为GFAP分解产物 (BDP)。GFAP BDP可为38kDa、42kDa (弱41kDa)、47kDa (弱45kDa); 25kDa (弱23kDa); 19kDa或20kDa。

[0313] b. GFAP识别抗体

[0314] 抗体是与GFAP、其片段、GFAP的表位或其变体结合的抗体。抗体可以是抗GFAP抗体的片段或其变体或衍生物。抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。抗体可以是嵌合抗体、单链抗体、亲和力成熟抗体、人抗体、人源化抗体、完全人抗体或抗体片段 (诸如Fab片段), 或其混合物。抗体片段或衍生物可包括F(ab')₂、Fv或scFv片段。抗体衍生物可以通过模拟肽产生。此外, 描述用于产生单链抗体的技术可以适用于产生单链抗体。

[0315] 抗GFAP抗体可以是嵌合抗GFAP或人源化抗GFAP抗体。在一个实施方式中, 人源化抗体和嵌合抗体都是单价的。在一个实施方式中, 人源化抗体和嵌合抗体均包含与Fc区连接的单个Fab区。

[0316] 人抗体可以源自噬菌体展示技术或源自表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。人抗体可以作为人体内免疫应答的结果产生并且被分离。参见例如Funaro等人, BMC Biotechnology, 2008 (8): 85。因此, 抗体可以是人而非动物谱系的产物。因为它是人源性

的,所以可以最小化对自身抗原反应的风险。另选地,标准酵母展示文库和展示技术可用于选择和分离人抗GFAP抗体。例如,天然人单链可变片段(scFv)的文库可用于选择人抗GFAP抗体。转基因动物可用于表达人抗体。

[0317] 人源化抗体可以是结合所需抗原的来自非人物种的抗体分子,其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0318] 所述抗体与已知抗体的区别在于它具有与本领域中已知的抗体不同的生物学功能。

[0319] (1) 表位

[0320] 抗体可以免疫特异性结合GFAP(SEQ ID NO:2)、其片段或其变体。抗体可以免疫特异性识别并结合表位区域内的至少三个氨基酸、至少四个氨基酸、至少五个氨基酸、至少六个氨基酸、至少七个氨基酸、至少八个氨基酸、至少九个氨基酸或至少十个氨基酸。抗体可以免疫特异性识别并结合这样的表位,所述表位具有表位区域的至少三个连续氨基酸、至少四个连续氨基酸、至少五个连续氨基酸、至少六个连续氨基酸、至少七个连续氨基酸、至少八个连续氨基酸、至少九个连续氨基酸或至少十个连续氨基酸。

[0321] c. 抗体制备/产生

[0322] 抗体可以通过多种技术,包括本领域技术人员熟知的那些技术中的任何一种制备。一般来讲,抗体可以通过细胞培养技术产生,所述细胞培养技术包括经由常规技术或通过抗体基因、重链和/或轻链转染到合适的细菌或哺乳动物细胞宿主中以允许产生抗体(其中抗体可以是重组的)来进行单克隆抗体的生成。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为此类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0323] 用于表达重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4216-4220(1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol,159:601-621(1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0324] 宿主细胞也可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可以对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣抗原所必需的轻链和重链中的任何一个或两者的DNA。所述抗体也涵盖由此类截短DNA分子表达的分子。此外,可通过用标准化学交联方法使抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是抗体(即结合人GFAP)且另一重链和另一轻链对除人GFAP以外的抗原具有特异性。

[0325] 在用于重组表达抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。在重组表

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

[0326] 制备单克隆抗体的方法涉及制备能够产生具有所需特异性的抗体的永生细胞系。此类细胞系可以由从免疫动物获得的脾细胞产生。可以用GFAP或其片段和/或变体免疫动物。用于免疫动物的肽可以包含编码人Fc(例如片段可结晶区)或人抗体的尾区的氨基酸。然后通过例如与骨髓瘤细胞融合配偶体的融合使脾细胞永生。可以采用多种融合技术。例如,可以将脾细胞和骨髓瘤细胞与非离子洗涤剂合并几分钟,然后以低密度接种在支持杂交细胞生长但不支持骨髓瘤细胞生长的选择性培养基上。一种这样的技术使用次黄嘌呤、氨基嘌呤、胸苷(HAT)选择。另一种技术包括电融合。经过足够的时间,通常约1至2周后,观察到杂交体的集落。选择单一集落并测试其培养物上清液对多肽的结合活性。可以使用具有高反应性和特异性的杂交瘤。

[0327] 可以从生长的杂交瘤集落的上清液中分离单克隆抗体。此外,可以采用各种技术来提高产量,诸如将杂交瘤细胞系注射到合适的脊椎动物宿主(诸如小鼠)的腹腔中。然后可以从腹水或血液中收获单克隆抗体。可以通过常规技术,诸如色谱法、凝胶过滤、沉淀和提取从抗体中除去污染物。亲和色谱法是在纯化抗体的过程中使用的方法的实例。

[0328] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先裂解IgG分子以产生数个片段,其中两个(F(ab)片段)各自包含包括完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够裂解IgG分子以提供几个片段,包括包含两个抗原结合位点的F(ab')₂片段。

[0329] Fv片段可以通过IgM的优先蛋白水解裂解以及偶尔蛋白水解裂解IgG或IgA免疫球蛋白分子来产生。可以使用重组技术衍生Fv片段。Fv片段包括非共价VH::VL异二聚体,其包括保留了天然抗体分子的大部分抗原识别能力和结合能力的抗原结合位点。

[0330] 抗体、抗体片段或衍生物可包含分别插置在重链框架("FR")组和轻链框架("FR")组之间的重链互补决定区("CDR")组和轻链互补决定区("CDR")组,所述框架组为CDR提供支撑并限定CDR相对于彼此的空间关系。CDR组可含有重链或轻链V区的三个高变区。

[0331] 可以使用产生或分离具有必需特异性的抗体的其它合适方法,包括但不限于从肽或蛋白质文库(例如但不限于噬菌体、核糖体、寡核苷酸、RNA、cDNA、酵母等展示库)中选择重组抗体的方法;例如使用本领域中已知的方法可从各种商业供应商诸如Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire,UK)、MorphoSys (Martinsried/Planegg,Del.)、Biovation (Aberdeen,Scotland,UK) BioInvent (Lund,Sweden)获得的。参见美国专利号4,704,692、5,723,323、5,763,192、5,814,476、5,817,483、5,824,514、5,976,862。另选的方法依赖于免疫能够产生人抗体谱系的转基因动物(例如SCID小鼠,Nguyen等人(1997) Microbiol.Immunol.41:901-907;Sandhu等人(1996) Crit.Rev.Biotechnol.16:95-118;Eren等人(1998) Immunol.93:154-161),如本领域中已知的和/或如本文所述的。此类技术包括但不限于核糖体展示(Hanes等人(1997) Proc.Natl.Acad.Sci.USA,94:4937-4942;

Hanes等人(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:14130-14135); 单细胞抗体产生技术(例如, 选择的淋巴细胞抗体方法(“SLAM”)(美国专利号5,627,052, Wen等人(1987) *J. Immunol.* 17:887-892; Babcook等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7843-7848); 凝胶微滴和流式细胞术(Powell等人(1990) *Biotechnol.* 8:333-337; One Cell Systems, (Cambridge, Mass).; Gray等人(1995) *J. Imm. Meth.* 182:155-163; Kenny等人(1995) *Bio/Technol.* 13:787-790); B细胞选择(Steenbakkers等人(1994) *Molec. Biol. Reports* 19:125-134(1994))。

[0332] 亲和力成熟抗体可以通过本领域中已知的多种程序中的任一种产生。例如, 参见Marks等人, *BioTechnology* 10:779-783(1992) 描述了通过VH和VL结构域改组进行的亲和力成熟。对CDR和/或框架残基的随机诱变由以下描述: Barbas等人, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 91:3809-3813(1994); Schier等人, *Gene*, 169:147-155(1995); Yelton等人, *J. Immunol.*, 155:1994-2004(1995); Jackson等人, *J. Immunol.*, 154(7):3310-3319(1995); Hawkins等人, *J. Mol. Biol.*, 226:889-896(1992)。在选择性诱变位置和在选择性或超突变位置由活性增强氨基酸残基进行的选择性突变描述于美国专利号6,914,128B1。

[0333] 抗体变体还可以利用以下制备: 将编码抗体的多核苷酸递送至合适的宿主, 诸如以提供在其乳汁中产生此类抗体的转基因动物或哺乳动物, 诸如山羊、牛、马、绵羊等来制备。这些方法在本领域中是已知的并且例如描述于美国专利号5,827,690、5,849,992、4,873,316、5,849,992、5,994,616、5,565,362和5,304,489中。

[0334] 抗体变体也可通过以下制备: 递送多核苷酸以提供转基因植物和培养的植物细胞(例如但不限于烟草、玉米和浮萍), 它们在植物部分或由其培养的细胞中产生此类抗体、特定部分或变体。例如, Cramer等人(1999) *Curr. Top. Microbiol. Immunol* 240:95-118和其中引用的参考文献描述了例如使用诱导型启动子产生表达大量重组蛋白的转基因烟草叶。转基因玉米已经用于以商业生产水平表达哺乳动物蛋白质, 其生物活性与在其它重组系统中产生的或从天然来源纯化的那些相当。参见例如Hood等人, *Adv. Exp. Med. Biol.* (1999) 464:127-147和其中引用的参考文献。抗体变体也已经由包括抗体片段, 诸如单链抗体(scFv)的转基因植物种子, 包括烟草种子和马铃薯块茎大量产生。参见例如Conrad等人(1998) *Plant Mol. Biol.* 38:101-109和其中引用的参考文献。因此, 根据已知方法, 也可以使用转基因植物产生抗体。

[0335] 可以例如通过添加外源性序列来修饰免疫原性或降低、增强或修饰结合、亲和力、缔合速率、解离速率、亲合力、特异性、半衰期或任何其它合适的特征来产生抗体衍生物。一般来讲, 保持非人或人CDR序列的一部分或全部, 同时用人或其它氨基酸替换可变区和恒定区的非人序列。

[0336] 小抗体片段可以是具有两个抗原结合位点的双体, 其中片段包含于同一多肽链(VH VL)中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)。参见例如, EP 404,097; WO 93/11161; 和Hollinger等人, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448。通过使用太短而不允许在相同链上的两个结构域之间配对的接头, 迫使结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。还参见授予Chen等人的美国专利6,632,926, 其通过引用整体并入本文, 并且公开了抗体变体, 所述抗体变体具有一个或多个插入到亲本抗体的高变区中的氨基酸并且对靶抗原的结合亲和力比亲本抗体对抗原的结合亲和力强至少约2倍。

[0337] 抗体可以是线性抗体。用于制备线性抗体的程序在本领域中是已知的并描述于 Zapata 等人, (1995) Protein Eng. 8 (10): 1057-1062。简而言之, 这些抗体包含一对串联 Fd 片段 (VH-CH1-VH-CH1), 所述片段形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0338] 可以通过已知方法从重组细胞培养物中回收和纯化抗体, 所述已知方法包括但不限于蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法。高效液相色谱法 (“HPLC”) 也可用于纯化。

[0339] 可检测地标记抗体可能是有用的。用于将抗体缀合至这些试剂的方法在本领域中是已知的。仅出于说明的目的, 可以用可检测部分, 诸如放射性原子、发色团、荧光团等标记抗体。此类标记的抗体可以在体内或在分离的测试样品中用于诊断技术。它们可以与细胞因子、配体、另一种抗体连接。用于偶联抗体以实现抗肿瘤作用的合适试剂包括细胞因子, 诸如白介素 2 (IL-2) 和肿瘤坏死因子 (TNF); 用于光动力疗法中的光敏剂, 包括酞菁四磺酸铝 (III)、血卟啉和酞菁; 放射性核素, 诸如碘-131 (131I)、钇-90 (90Y)、铋-212 (212Bi)、铋-213 (213Bi)、镱-99m (99mTc)、铈-186 (186Re) 和铈-188 (188Re); 抗生素, 诸如多柔比星、阿霉素、柔红霉素、甲氨蝶呤、道诺霉素、新抑癌素和卡铂; 细菌、植物和其它毒素, 诸如白喉毒素、假单胞菌外毒素 A、葡萄球菌肠毒素 A、相思豆毒素蛋白-A 毒素、蓖麻毒素 A (去糖基化蓖麻毒素 A 和天然蓖麻毒素 A)、TGF- α 毒素、来自中华眼镜蛇 (*naja naja atra*) 的细胞毒素和白树毒素 (一种植物毒素); 来自植物、细菌和真菌的核糖体失活蛋白, 诸如局限曲菌素 (一种由局限曲霉 (*Aspergillus restrictus*) 产生的核糖体失活蛋白)、皂草素 (一种来自石碱草 (*Saponaria officinalis*) 的核糖体失活蛋白) 和 RNase; 酪氨酸激酶抑制剂; 1y207702 (二氟化嘌呤核苷); 含有反囊性剂的脂质体 (例如, 反义寡核苷酸、编码毒素的质粒、甲氨蝶呤等); 和其它抗体或抗体片段, 诸如 F(ab)。

[0340] 经由使用杂交瘤技术、选择的淋巴细胞抗体方法 (SLAM)、转基因动物和重组抗体文库进行的抗体产生在下面更详细地描述。

[0341] (1) 使用杂交瘤技术的抗 GFAP 单克隆抗体

[0342] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种技术 (包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术或其组合) 来制备。例如, 可以使用杂交瘤技术产生单克隆抗体, 所述杂交瘤技术包括本领域中已知的并且例如在以下中教导的那些: Harlow 等人, *Antibodies: A Laboratory Manual*, 第二版, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1988); Hammerling 等人, *In Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, (Elsevier, N.Y., 1981)。还应注意, 如本文所用的术语“单克隆抗体”并不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指源自单一克隆的抗体, 包括任何真核生物、原核生物或噬菌体克隆, 而不是指产生所述抗体的方法。

[0343] 产生单克隆抗体的方法以及由所述方法产生的抗体可以包括培养分泌本发明抗体的杂交瘤细胞, 其中杂交瘤优选通过以下产生: 将从用 GFAP 免疫的动物, 例如大鼠或小鼠分离的脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 然后筛选由融合产生的杂交瘤中分泌能够结合本发明多肽的抗体的杂交瘤克隆。简而言之, 可以用 GFAP 抗原免疫大鼠。在优选的实施方式中, 将 GFAP 抗原与佐剂一起施用以刺激免疫应答。此类佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂、RIBI (胞

壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激复合物)。此类佐剂可以通过将多肽隔离在局部储库中来保护多肽免于快速分散,或者它们可以含有刺激宿主分泌对巨噬细胞和免疫系统的其它组分具有趋化性的因子的物质。优选地,如果正在施用多肽,则免疫程序将涉及多肽的两次或更多次施用,散布于数周内;然而,也可以使用多肽的单次施用。

[0344] 在用GFAP抗原免疫动物后,可以从动物获得抗体和/或产生抗体的细胞。通过将动物放血或处死,从动物获得含有抗GFAP抗体的血清。可以按从动物获得的原样使用血清,可以从血清中获得免疫球蛋白部分,或者可以从血清中纯化抗GFAP抗体。以这种方式获得的血清或免疫球蛋白是多克隆的,因此具有异质的一系列特性。

[0345] 一旦检测到免疫应答,例如,在大鼠血清中检测到对抗原GFAP具有特异性的抗体,就收获大鼠脾并且分离脾细胞。然后通过熟知的技术使脾细胞与任何适合骨髓瘤细胞(例如来自可从American Type Culture Collection(ATCC,Manassas,Va.,US)获得的细胞系SP20的细胞)融合。通过限制稀释法选择和克隆杂交瘤。然后通过本领域中已知的方法测定杂交瘤克隆中分泌能够结合GFAP的抗体的细胞。可以通过用阳性杂交瘤克隆免疫大鼠来产生通常含有高水平抗体的腹水。

[0346] 在另一个实施方式中,产生抗体的永生化杂交瘤可以从免疫化动物制备。在免疫之后,将动物处死并且将脾B细胞按本领域熟知的那样融合至永生化骨髓瘤细胞。参见例如Harlow和Lane,同上。在优选的实施方式中,骨髓瘤细胞不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌性细胞系)。在融合和抗生素选择后,使用GFAP或其部分或表达GFAP的细胞筛选杂交瘤。在优选的实施方式中,使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA),优选ELISA进行初始筛选。PCT公开号WO 00/37504中提供了ELISA筛选的实例。

[0347] 选择产生抗GFAP抗体的杂交瘤、将其克隆并且进一步针对所需特征,包括稳健的杂交瘤生长、高抗体产生和所需的抗体特征进行筛选。杂交瘤可以在同系动物、缺乏免疫系统的动物(例如裸鼠)中体内培养和扩增,或者在细胞培养物中体外培养和扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法是本领域普通技术人员所熟知的。

[0348] 在优选的实施方式中,杂交瘤是大鼠杂交瘤。在另一个实施方式中,杂交瘤在非人、非大鼠物种,诸如小鼠、绵羊、猪、山羊、牛或马中产生。在又一个优选的实施方式中,杂交瘤是人杂交瘤,其中人非分泌性骨髓瘤与表达抗GFAP抗体的人细胞融合。

[0349] 可通过已知技术产生识别特定表位的抗体片段。例如,可以通过使用酶(诸如木瓜蛋白酶(以产生两个相同的Fab片段)或胃蛋白酶(以产生F(ab')₂片段))对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解来产生本发明的Fab和F(ab')₂片段。IgG分子的F(ab')₂片段保留了较大(“亲本”)IgG分子的两个抗原结合位点,包括轻链(含有可变轻链区和恒定轻链区)、重链的CH1结构域、和亲本IgG分子的形成二硫键的铰链区。因此,F(ab')₂片段仍然能够交联抗原分子,如亲本IgG分子。

[0350] (2) 使用SLAM的抗GFAP单克隆抗体

[0351] 在本发明的另一个方面,使用本领域中称为选择的淋巴细胞抗体方法(SLAM)的方法,从单个分离的淋巴细胞产生重组抗体,如美国专利号5,627,052;PCT公开号WO 92/02551;和Babcook等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:7843-7848(1996)中所述。在该方法中,使用抗原特异性溶血空斑测定法筛选分泌感兴趣抗体的单细胞,例如源自任何一只免疫动物的淋巴细胞,其中使用接头(诸如生物素)将抗原GFAP、GFAP的亚基或其片段与绵羊

红细胞偶联,并且用于鉴定分泌对GFAP具有特异性的抗体的单细胞。在鉴定感兴趣抗体分泌细胞后,通过逆转录酶-PCR (RT-PCR) 从细胞中挽救重链和轻链可变区cDNA,然后这些可变区可以在哺乳动物宿主细胞,诸如COS或CHO细胞中、在适当的免疫球蛋白恒定区(例如人恒定区)的背景下表达。用源自体内选择的淋巴细胞的扩增的免疫球蛋白序列转染的宿主细胞然后可以在体外进行进一步的分析和选择,例如,通过淘选转染的细胞以分离表达针对GFAP的抗体的细胞。扩增的免疫球蛋白序列可以进一步在体外操纵,诸如通过体外亲和力成熟方法。参见例如PCT公开号W0 97/29131和PCT公开号W0 00/56772。

[0352] (3) 使用转基因动物的抗GFAP单克隆抗体

[0353] 在本发明的另一个实施方式中,通过用GFAP抗原免疫包含一些或全部人免疫球蛋白基因座的非人动物来产生抗体。在一个实施方式中,非人动物是**XENOMOUSE®**转基因小鼠,一种包含人免疫球蛋白基因座的较大片段且缺乏小鼠抗体产生的工程化小鼠品系。参见例如Green等人,Nature Genetics,7:13-21 (1994) 和美国专利号5,916,771、5,939,598、5,985,615、5,998,209、6,075,181、6,091,001、6,114,598和6,130,364。还参见PCT公开号W0 91/10741、W0 94/02602、W0 96/34096、W0 96/33735、W0 98/16654、W0 98/24893、W0 98/50433、W0 99/45031、W0 99/53049、W0 00/09560和W0 00/37504。**XENOMOUSE®**转基因小鼠产生完全人抗体的成人样人谱系,并且产生抗原特异性人单克隆抗体。**XENOMOUSE®**转基因小鼠通过引入人重链基因座和x轻链基因座的兆碱基大小的种系构型YAC片段而含有约80%的人抗体谱系。参见Mendez等人,Nature Genetics,15:146-156 (1997);Green和Jakobovits,J.Exp.Med.,188:483-495 (1998),其公开据此通过引用并入。

[0354] (4) 使用重组抗体文库的抗GFAP单克隆抗体

[0355] 体外方法也可用于制备本发明的抗体,其中筛选抗体文库以鉴定具有所需的GFAP结合特异性的抗体。关于重组抗体文库的这种筛选的方法在本领域中是熟知的,且包括在以下中描述的方法:例如美国专利号5,223,409 (Ladner等人);PCT公开号W0 92/18619 (Kang等人);PCT公开号W0 91/17271 (Dower等人);PCT公开号W0 92/20791 (Winter等人);PCT公开号W0 92/15679 (Markland等人);PCT公开号W0 93/01288 (Breitling等人);PCT公开号W0 92/01047 (McCafferty等人);PCT公开号W0 92/09690 (Garrard等人);Fuchs等人,Bio/Technology,9:1369-1372 (1991);Hay等人,Hum.Antibod Hybridomas,3:81-85 (1992);Huse等人.,Science,246:1275-1281 (1989);McCafferty等人,Nature,348:552-554 (1990);Griffiths等人.,EMBO J.,12:725-734 (1993);Hawkins等人.,J.Mol.Biol.,226:889-896 (1992);Clackson等人.,Nature,352:624-628 (1991);Gram等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:3576-3580 (1992);Garrard等人.,Bio/Technology,9:1373-1377 (1991);Hoogenboom等人.,Nucl.Acids Res.,19:4133-4137 (1991);Barbas等人.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:7978-7982 (1991);美国专利申请公开号2003/0186374;和PCT公开号W0 97/29131,其各自内容通过引用并入本文。

[0356] 重组抗体文库可来自用GFAP或GFAP的一部分免疫的受试者。另选地,重组抗体文库可来自初试受试者,即尚未用GFAP免疫的受试者,诸如来自尚未用人GFAP免疫的人受试者的人抗体文库。通过用包括人GFAP的肽筛选重组抗体文库以由此选择识别GFAP的那些抗体来选择本发明的抗体。用于进行这种筛选和选择的方法在本领域中是熟知的,诸如先前

段落中的参考文献中所述。为选择对GFAP具有特定结合亲和力的本发明抗体,诸如以特定 K_{off} 速率常数自人GFAP解离的抗体,可使用本领域中已知的表面等离子体共振方法来选择具有所需 K_{off} 速率常数的抗体。为选择对hGFAP具有特定中和活性的本发明抗体,诸如具有特定 IC_{50} 的抗体,可使用本领域中已知用于评估对GFAP活性的抑制的标准方法。

[0357] 在一个方面,本发明涉及一种结合人GFAP的分离的抗体、或其抗原结合部分。优选地,抗体是中和抗体。在各种实施方式中,抗体是重组抗体或单克隆抗体。

[0358] 例如,也可使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法来产生抗体。在噬菌体展示方法中,将功能性抗体结构域展示于携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。这种噬菌体可用于展示自谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可用抗原,例如使用标记的抗原或结合于或捕获于固体表面或珠粒的抗原来选择或鉴定表达结合感兴趣抗原的抗原结合结构域的噬菌体。这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,其包括fd和M13结合结构域,由具有重组融合至噬菌体基因III或基因VIII蛋白质的Fab、Fv或二硫键稳定的Fv抗体结构域的噬菌体表达。可用于制备抗体的噬菌体展示方法的实例包括在以下中公开的方法:Brinkmann等人,J. Immunol. Methods, 182:41-50 (1995); Ames等人,J. Immunol. Methods, 184:177-186 (1995); Kettleborough等人,Eur. J. Immunol, 24:952-958 (1994); Persic等人, Gene, 187:9-18 (1997); Burton等人, Advances in Immunology, 57:191-280 (1994); PCT公开号W0 92/01047; PCT公开号W0 90/02809; W0 91/10737; W0 92/01047; W0 92/18619; W0 93/11236; W0 95/15982; W0 95/20401; 和美国专利号5,698,426、5,223,409、5,403,484、5,580,717、5,427,908、5,750,753、5,821,047、5,571,698、5,427,908、5,516,637、5,780,225、5,658,727、5,733,743和5,969,108。

[0359] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择后,可从噬菌体分离抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人抗体,或任何其它所需的抗原结合片段,并且在任何所需宿主中表达,所述宿主包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如如下文所述。例如,也可使用本领域中已知的方法来采用用于重组产生Fab、Fab'和F(ab')₂片段的技术,诸如以下中所公开的技术:PCT公开号W0 92/22324; Mullinax等人, BioTechniques, 12(6):864-869 (1992); Sawai等人, Am. J. Reprod. Immunol, 34:26-34 (1995); 和Better等人, Science, 240:1041-1043 (1988)。可用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括美国专利号4,946,778和5,258,498; Huston等人, Methods in Enzymology, 203:46-88 (1991); Shu等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:7995-7999 (1993); 和Skerra等人, Science, 240:1038-1041 (1988)中所述的技术。

[0360] 作为通过噬菌体展示来筛选重组抗体文库的替代方案,本领域中已知用于筛选大型组合文库的其它方法可应用于鉴定本发明抗体。如PCT公开号W0 98/31700 (Szostak和Roberts) 和Roberts和Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94:12297-12302 (1997)中所述,一类替代性表达系统是重组抗体文库表达为RNA-蛋白质融合物的表达系统。在这个系统中,通过在体外翻译于3'末端处带有嘌呤霉素(一种肽基受体抗生素)的合成mRNA来在mRNA与其编码的肽或蛋白质之间产生共价融合物。因此,可基于所编码的肽或蛋白质(例如抗体或其部分)的特性(诸如抗体或其部分与双重特异性抗原的结合),自mRNA的复杂混合物(例如组合文库)富集特异性mRNA。可通过如上所述的重组方式(例如在哺乳动物宿主细胞中)表达从筛选此类文库所回收的编码抗体或其部分的核酸序列,并且另外可通过对突变已引

入到最初选择的序列中的mRNA-肽融合物进行更多轮筛选或通过如上所述的用于重组抗体的体外亲和力成熟的其它方法来经受进一步亲和力成熟。该方法的优选实例是PROfusion展示技术。

[0361] 在另一种途径中,抗体也可使用本领域中已知的酵母展示方法来产生。在酵母展示方法中,使用遗传方法将抗体结构域系栓至酵母细胞壁并且使它们展示于酵母表面上。具体来说,这种酵母可用于展示从谱系或组合抗体文库(例如人或鼠类)表达的抗原结合结构域。可用于制备抗体的酵母展示方法的实例包括通过引用并入本文的美国专利号6,699,658 (Witttrup等人)中公开的方法。

[0362] d.产生重组GFAP抗体

[0363] 抗体可通过本领域中已知的许多技术中的任何一个产生。例如,从宿主细胞表达,其中通过标准技术将编码重链和轻链的表达载体转染至宿主细胞中。各种形式的术语“转染”旨在涵盖通常用于将外源DNA引入到原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-聚葡萄糖转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明抗体,但优选在真核细胞且最优选哺乳动物宿主细胞中表达抗体,因为此类真核细胞(且特别是哺乳动物细胞)相比于原核细胞更有可能组装和分泌经过正确折叠且具有免疫学活性的抗体。

[0364] 用于表达本发明重组抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢细胞(CHO细胞)(包括Urlaub和Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220 (1980)中所述的dhfr-CHO细胞),其与DHFR可选择标记物一起使用,例如如Kaufman和Sharp, J. Mol. Biol., 159:601-621 (1982)中所述;NS0骨髓瘤细胞;COS细胞和SP2细胞。当将编码抗体基因的重组表达载体引入到哺乳动物宿主细胞中时,通过将宿主细胞培养一段足以允许抗体在宿主细胞中表达或者更优选使抗体分泌到宿主细胞所生长的培养基中的时间来产生抗体。抗体可以使用标准蛋白质纯化方法从培养基中回收。

[0365] 宿主细胞也可用于产生功能性抗体片段,诸如Fab片段或scFv分子。应当理解,可以对上述程序进行变型。例如,可能合乎需要的是用编码本发明抗体的轻链和/或重链的功能性片段的DNA转染宿主细胞。重组DNA技术也可用于除去一些或全部编码并非结合感兴趣抗原所必需的轻链和重链中的任何一个或两者的DNA。本发明抗体也涵盖由此类截短DNA分子表达的分子。此外,可通过用标准化学交联方法使本发明抗体与第二抗体交联来产生双功能抗体,其中一个重链和一个轻链是本发明抗体(即结合人GFAP)且另一重链和另一轻链对非人GFAP的抗原具有特异性。

[0366] 在用于重组表达本发明抗体、或其抗原结合部分的一个优选系统中,通过磷酸钙介导的转染法将编码抗体重链和抗体轻链两者的重组表达载体引入到dhfr-CHO细胞中。在重组表达载体内,使抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至CMV增强子/AdMLP启动子调控元件以驱动基因高度转录。重组表达载体也带有DHFR基因,其允许使用甲氨蝶呤选择/扩增来选择已用载体转染的CHO细胞。培养所选择的转化株宿主细胞以便允许表达抗体重链和轻链并且从培养基中回收完整抗体。将标准分子生物学技术用于制备重组表达载体、转染宿主细胞、选择转化株、培养宿主细胞,并且从培养基中回收抗体。更进一步地,本发明提供了合成本发明的重组抗体的方法,所述方法通过在适合培养基中培养本发明的宿主细胞,直到合成本发明的重组抗体进行。所述方法可以进一步包括从培养基中分离重组抗体。

[0367] (1) 人源化抗体

[0368] “人源化抗体”可以是抗体或其变体、衍生物、类似物或部分，其免疫特异性地结合感兴趣抗原且包含基本上具有人抗体的氨基酸序列的框架 (FR) 区和基本上具有非人抗体的氨基酸序列的互补决定区 (CDR)。人源化抗体可以来自结合所需抗原的非人物种抗体，其具有一个或多个来自非人物种的互补决定区 (CDR) 和来自人免疫球蛋白分子的框架区。

[0369] 如本文所用，在 CDR 的背景下的术语“基本上”是指氨基酸序列与非人抗体 CDR 的氨基酸序列至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至少 99% 相同的 CDR。人源化抗体包含至少一个且通常两个可变结构域的基本上全部 (Fab、Fab'、F(ab')₂、FabC、Fv)，其中全部或基本上全部 CDR 区对应于非人免疫球蛋白 (即供体抗体) 的那些 CDR 区并且全部或基本上全部框架区是人免疫球蛋白共有序列的那些。根据一个方面，人源化抗体也包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) (通常人免疫球蛋白的恒定区) 的至少一部分。在一些实施方式中，人源化抗体含有轻链以及至少重链的可变结构域两者。抗体也可以包括重链的 CH1、铰链、CH2、CH3 和 CH4 区。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化轻链。在一些实施方式中，人源化抗体仅含有人源化重链。在特定实施方式中，人源化抗体仅含有轻链和/或重链的人源化可变结构域。

[0370] 人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别，包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE，以及任何同种型，包括但不限于 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。人源化抗体可以包含来自多于一种类别或同种型的序列，并且可以使用本领域中熟知的技术选择特定的恒定结构域以优化所需的效应子功能。

[0371] 人源化抗体的框架区和 CDR 区无需精确对应于亲本序列，例如可以通过取代、插入或/或缺失至少一个氨基酸残基来对供体抗体 CDR 或共有框架进行诱变以使该位点处的 CDR 或框架残基不对应于供体抗体或共有框架。然而，在一个实施方式中，此类突变将不是广泛的。通常，至少 90%、至少 95%、至少 98%、或至少 99% 的人源化抗体残基将对应于亲本 FR 和 CDR 序列的那些。如本文所用，术语“共有框架”是指共有免疫球蛋白序列中的框架区。如本文所用，术语“共有免疫球蛋白序列”是指由相关免疫球蛋白序列家族中最常出现的氨基酸 (或核苷酸) 形成的序列 (参见例如 Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany 1987))。在免疫球蛋白家族中，共有序列中的每个位置由家族中最常出现在那个位置的氨基酸占据。如果两个氨基酸同等频繁地出现，那么共有序列中可包括任一者。

[0372] 可以设计人源化抗体以使对啮齿动物抗人抗体的不想要的免疫应答最小化，这限制了那些部分在人类接受者中的治疗应用的持续时间和有效性。人源化抗体可以具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人残基常常被称为“输入”残基，其通常取自可变结构域。可以通过用高变区序列取代人抗体的相应序列来进行人源化。因此，此类“人源化”抗体是嵌合抗体，其中显著小于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。例如，参见美国专利号 4,816,567，其内容通过引用并入本文。人源化抗体可以是人抗体，其中一些高变区残基和可能的一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。可以使用任何已知方法进行对本发明抗体的人源化或工程化，诸如但不限于美国专利号 5,723,323、5,976,862、5,824,514、5,817,483、5,814,476、5,763,192、5,723,323、5,766,886、5,714,352、6,204,023、6,180,370、5,693,762、5,530,101、5,585,089、5,225,539 和 4,816,567 中所述的方法。

[0373] 人源化抗体可以保留对GFAP的高亲和力和其它有利的生物特性。可以使用亲本序列和人源化序列的三维模型,通过亲本序列和各种概念性人源化的产物的分析方法制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的。说明和展示所选候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构的计算机程序是可获得的。这些展示的检查允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用进行分析,即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。以这种方式,可从接受者和输入序列中选择和合并FR残基,从而实现所需的抗体特征,诸如增加的对GFAP的亲合力。一般来讲,高变区残基可能直接且最实质性地涉及影响抗原结合。

[0374] 作为人源化的替代方案,可以产生人抗体(在本文中也称为“完全人抗体”)。例如,可以经由PROfusion和/或酵母相关技术从文库中分离人抗体。还可以产生转基因动物(例如,小鼠),所述转基因动物能够在免疫后在不存在内源性免疫球蛋白产生的情况下产生人抗体的全谱系。例如,在嵌合和种系突变小鼠中抗体重链连接区(J_H)基因的纯合子缺失导致完全抑制内源性抗体产生。人种系免疫球蛋白基因阵列在这种种系突变小鼠中的转移将导致在抗原激发后产生人抗体。人源化或完全人抗体可以根据美国专利号5,770,429、5,833,985、5,837,243、5,922,845、6,017,517、6,096,311、6,111,166、6,270,765、6,303,755、6,365,116、6,410,690、6,682,928和6,984,720中所述的方法来制备,其各自内容通过引用并入本文。

[0375] e. 抗GFAP抗体

[0376] 可以使用上述技术以及使用本领域中已知的常规技术产生抗GFAP抗体。在一些实施方式中,抗GFAP抗体可为未缀合GFAP抗体,诸如可购自以下的GFAP抗体:Dako(目录号:M0761)、ThermoFisher Scientific(目录号:MA5-12023、A-21282、13-0300、MA1-19170、MA1-19395、MA5-15086、MA5-16367、MA1-35377、MA1-06701或MA1-20035)、AbCam(目录号:ab10062、ab4648、ab68428、ab33922、ab207165、ab190288、ab115898或ab21837)、EMD Millipore(目录号:FCMAB257P、MAB360、MAB3402、04-1031、04-1062、MAB5628)、Santa Cruz(目录号:sc-166481、sc-166458、sc-58766、sc-56395、sc-51908、sc-135921、sc-71143、sc-65343或sc-33673)、Sigma-Aldrich(目录号:G3893或G6171)或Sino Biological Inc.(目录号:100140-R012-50)。抗GFAP抗体可以与荧光团缀合,诸如可购自以下的缀合的GFAP抗体:ThermoFisher Scientific(目录号:A-21295或A-21294)、EMD Millipore(目录号:MAB3402X、MAB3402B、MAB3402B或MAB3402C3)或AbCam(目录号:ab49874或ab194325)。

[0377] 9. 方法的变型

[0378] 所公开的确定样品中存在的感兴趣分析物(UCH-L1和/或GFAP)的存在或量的方法可以如本文所述。所述方法还可以根据用于分析分析物的其它方法进行调整。熟知的变型的实例包括但不限于免疫测定法,诸如夹心免疫测定法(例如,单克隆-单克隆夹心免疫测定法、单克隆-多克隆夹心免疫测定法,包括酶检测(酶免疫测定法(EIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA),竞争性抑制免疫测定法(例如正向和反向)、酶扩大免疫测定技术(EMIT)、竞争性结合测定法、生物发光共振能量转移(BRET)、一步抗体检测测定法、均质测定法、异质测定法、即时捕获测定法等。

[0379] a. 免疫测定法

[0380] 可以在免疫测定法中使用UCH-L1和/或GFAP抗体分析感兴趣分析物和/或其肽或

片段(例如UCH-L1和/或GFAP,和/或其肽或片段,即UCH-L1和/或GFAP片段)。可以使用抗体并且检测与分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的特异性结合来确定分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的存在或量。例如,抗体或其抗体片段可以特异性结合分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)。如果需要,可以将一种或多种抗体与一种或多种可商购获得的单克隆/多克隆抗体组合使用。此类抗体可从诸如R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN) 和Enzo Life Sciences International, Inc. (Plymouth Meeting, PA) 的公司获得。

[0381] 体内样品中存在的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的存在或量可以使用免疫测定法容易地确定,诸如夹心免疫测定法(例如单克隆-单克隆夹心免疫测定法、单克隆-多克隆夹心免疫测定法,包括放射性同位素检测(放射免疫测定法(RIA))和酶检测(酶免疫测定法(EIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)(例如Quantikine ELISA assays, R&D Systems, Minneapolis, MN))。可以使用的定点照护装置的实例是i-STAT® (Abbott, Laboratories, Abbott Park, IL)。可以使用的其它方法例如包括化学发光微粒免疫测定法,特别是采用ARCHITECT®自动分析仪(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)的方法。其它方法包括例如质谱法和免疫组织化学法(例如用来自组织活检的切片),使用抗分析物(例如抗UCH-L1和/或抗GFAP)抗体(单克隆、多克隆、嵌合、人源化、人的等)或其针对分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的抗体片段。其它检测方法包括例如美国专利号6,143,576、6,113,855、6,019,944、5,985,579、5,947,124、5,939,272、5,922,615、5,885,527、5,851,776、5,824,799、5,679,526、5,525,524和5,480,792中描述的那些,其各自通过引用整体并入本文。抗体与分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的特异性免疫结合可以经由附接至抗体的直接标记,诸如荧光或发光标签、金属和放射性核素,或经由间接标记,诸如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶来检测。

[0382] 固定化抗体或其抗体片段的使用可以结合到免疫测定法中。可以将抗体固定化在多种支持物上,诸如磁性或色谱基质颗粒、测定板(诸如微量滴定孔)的表面、固体基质材料片等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列方式涂布在固体支持物上来制备测定条。然后将这种条浸入到测试样品中并通过洗涤和检测步骤迅速处理以产生可测量信号,诸如显色的点。

[0383] 可以使用均质形式。例如,在从受试者获得测试样品之后,制备混合物。混合物含有要评估分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品、第一特异性结合配偶体和第二特异性结合配偶体。添加测试样品、第一特异性结合配偶体和第二特异性结合配偶体以形成混合物的顺序并不关键。使测试样品同时与第一特异性结合配偶体和第二特异性结合配偶体接触。在一些实施方式中,第一特异性结合配偶体和测试样品中含有的任何UCH-L1和/或GFAP可以形成第一特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物并且第二特异性结合配偶体可形成第一特异性结合配偶体-感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二特异性结合配偶体复合物。在一些实施方式中,第二特异性结合配偶体和测试样品中含有的任何UCH-L1和/或GFAP可以形成第二特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1)-抗原复合物并且第一特异性结合配偶体形成第一特异性结合配偶体-感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二特异性结合配偶体复合物。第一特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如,抗UCH-L1抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:1的氨基酸的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:2的氨基酸的表位)。

第二特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如抗UCH-L1抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:1的氨基酸的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:2的氨基酸的表位)。此外,第二特异性结合配偶体用如上所述的可检测标记来标记或含有所述可检测标记。

[0384] 可以使用异质形式。例如,在从受试者获得测试样品之后,制备第一混合物。所述混合物含有要评估分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品和第一特异性结合配偶体,其中第一特异性结合配偶体和测试样品中含有的任何UCH-L1和/或GFAP形成第一特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-抗原复合物。第一特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如,抗UCH-L1抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:1的氨基酸的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:2的氨基酸的表位)。添加测试样品和第一特异性结合配偶体以形成混合物的顺序并不关键。

[0385] 第一特异性结合配偶体可以固定化在固相上。用于免疫测定法(针对第一特异性结合配偶体和任选的第二特异性结合配偶体)中的固相可为在本领域中已知的任何固相,诸如但不限于磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、比色管、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘片和芯片。在固相是珠粒的那些实施方式中,珠粒可以是磁性珠粒或磁性颗粒。磁性珠粒/颗粒可以是铁磁性的、亚铁磁性的、顺磁性的、超顺磁性的或铁磁流体的。示例性铁磁材料包括Fe、Co、Ni、Gd、Dy、CrO₂、MnAs、MnBi、EuO以及NiO/Fe。亚铁磁材料的实例包括NiFe₂O₄、CoFe₂O₄、Fe₃O₄(或FeO·Fe₂O₃)。珠粒可以具有磁性的实心核心部分并且被一个或多个非磁性层包围。另选地,磁性部分可以是围绕非磁性核心的层。其上固定化有第一特异性结合成员的固体支持物可以以干燥形式或以液体储存。磁性珠粒在与具有其上固定化有第一特异性结合成员的磁性珠粒的样品接触之前或之后可以经受磁场。

[0386] 在形成含有第一特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1或GFAP)抗原复合物的混合物之后,使用在本领域中已知的任何技术从复合物除去任何未结合的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)。例如,未结合的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)可通过洗涤除去。然而,合乎需要的是第一特异性结合配偶体以超过测试样品中所存在的任何分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的量存在,以使得存在于测试样品中的所有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)都被第一特异性结合配偶体结合。

[0387] 在除去任何未结合的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)之后,将第二特异性结合配偶体添加至混合物中以形成第一特异性结合配偶体-感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二特异性结合配偶体复合物。第二特异性结合配偶体可以是抗分析物抗体(例如,抗UCH-L1抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:1的氨基酸的表位;或抗GFAP抗体,其结合具有包含至少三个连续(3) SEQ ID NO:2的氨基酸的表位)。此外,第二特异性结合配偶体用如上所述的可检测标记来标记或含有所述可检测标记。

[0388] 固定化抗体或其抗体片段的使用可以结合到免疫测定法中。可以将抗体固定化在多种支持物上,诸如磁性或色谱基质颗粒(诸如磁性珠粒)、胶乳颗粒或表面改性的胶乳颗粒、聚合物或聚合物薄膜、塑料或塑料薄膜、平面基材、测定板(诸如微量滴定孔)的表面、固体基质材料片等。可以通过将抗体或多种抗体以阵列方式涂布在固体支持物上来制备测定条。然后可以将这种条浸入到测试样品中并通过洗涤和检测步骤迅速处理以产生可测量信号,诸如显色的点。

[0389] (1) 夹心免疫测定法

[0390] 夹心免疫测定法测量抗体(即至少一种捕获抗体)和检测抗体(即至少一种检测抗体)的两个层之间的抗原量。捕获抗体和检测抗体结合抗原,例如感兴趣分析物(诸如UCH-L1和/或GFAP)上的不同表位。理想地,捕获抗体与表位的结合不会干扰检测抗体与表位的结合。单克隆或多克隆抗体均可用作夹心免疫测定法中的捕获抗体和检测抗体。

[0391] 通常,采用至少两种抗体来分离和定量测试样品中的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)。更具体地,至少两种抗体结合分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的某些表位,从而形成免疫复合物,其被称为“夹心”。可将一种或多种抗体用于捕获测试样品中的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)(这些抗体常称为一种或多种“捕获”抗体)并且可将一种或多种抗体用于使可检测(即可定量)标记结合夹心(这些抗体常称为一种或多种“检测抗体”)。在夹心测定法中,抗体与其表位的结合理想地不会因测定中任何其它抗体与其对应表位的结合而减弱。选择抗体以使得与疑似含有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品接触的一种或多种第一抗体不与第二或后续抗体所识别的表位的全部或部分结合,从而干扰一种或多种第二检测抗体结合分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的能力。

[0392] 抗体可以在所述免疫测定法中用作第一抗体。抗体免疫特异性结合分析物上的表位(例如UCH-L1和/或GFAP)。除了本发明的抗体之外,所述免疫测定法可以包括第二抗体,其免疫特异性结合未被第一抗体识别或结合的表位。

[0393] 疑似含有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品可以同时或依次地与至少一种第一捕获抗体(或多种第一捕获抗体)和至少一种第二检测抗体接触。在夹心测定形式中,首先在允许形成第一抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)抗原复合物的条件下使疑似含有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品与至少一种特异性结合特定表位的第一捕获抗体接触。如果使用多于一种捕获抗体,则形成第一多种捕获抗体-UCH-L1和/或GFAP抗原复合物。在夹心测定法中,抗体,优选至少一种捕获抗体,以相对于测试样品中预期的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的最大量的摩尔过量量使用。例如,每ml微粒涂布缓冲液可使用约5pg/mL至约1mg/mL抗体。

[0394] i. 抗UCH-L1捕获抗体

[0395] 任选地,在使测试样品与至少一种第一捕获抗体接触之前,至少一种第一捕获抗体可结合至固体支持物,所述固体支持物有利于从测试样品分离第一抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物。可以使用本领域中已知的任何固体支持物,包括但不限于由聚合物材料制成、呈孔、管或珠粒(例如微粒)形式的固体支持物。一种(或多种)抗体可以通过吸附、通过使用化学偶联剂的共价键合或通过本领域中已知的其它手段与固体支持物结合,前提条件是这种结合不会干扰抗体结合分析物(例如,UCH-L1和/或GFAP)的能力。此外,如果需要,可以将固体支持物衍生化以允许与抗体上的各种官能团反应。这种衍生化需要使用某些偶联剂,诸如但不限于顺丁烯二酸酐、N-羧基琥珀酰亚胺和1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺。

[0396] 此后将疑似含有分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的测试样品孵育以允许形成第一捕获抗体(或多种捕获抗体)-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物。孵育可在约4.5至约10.0的pH下,在约2°C至约45°C的温度下,并且持续至少约一(1)分钟至约十八(18)小时、约2-6分钟、约7-12分钟、约5-15分钟或约3-4分钟的时段来进行。

[0397] ii. 检测抗体

[0398] 在形成第一/多种捕获抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物后,然后使复合物与至少一种第二检测抗体接触(在允许形成第一/多种抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)抗原-第二抗体复合物的条件下)。在一些实施方式中,使测试样品与捕获抗体同时地与检测抗体接触。如果第一抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物与多于一种的检测抗体接触,则形成第一/多种捕获抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-多种抗体检测复合物。与第一抗体一样,当使至少第二(和后续)抗体与第一抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物接触时,在与上述的那些类似的条件下孵育一段时间是形成第一/多种抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二/多种抗体复合物所需的。优选地,至少一种第二抗体含有可检测标记。在形成第一/多种抗体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二/多种抗体复合物之前、同时或之后,可检测标记可以与至少一种第二抗体结合。可使用本领域中已知的任何可检测标记。

[0399] 化学发光测定法可以根据Adamczyk等人,Anal.Chim.Acta 579(1):61-67(2006)中所述的方法进行。虽然可使用任何适合测定法形式,但微板化学发光计(Mithras LB-940,Berthold Technologies U.S.A.,LLC,Oak Ridge,TN)使得能够快速测定多个小体积样品。使用96孔黑色聚苯乙烯微孔板(Costar#3792)时,化学发光计可以配备有多个试剂注射器。可以将每个样品添加至单独的孔中,然后同时/依次添加如由所采用的测定类型所确定的其它试剂。理想地,避免采用吡啶芳基酯的中性或碱性溶液中的假碱形成,例如通过酸化。然后逐孔记录化学发光应答。就这一点而言,记录化学发光应答的时间部分地取决于添加试剂和所采用的特定吡啶之间的延迟。

[0400] 添加测试样品和一种或多种特异性结合配偶体以形成用于化学发光测定法的混合物的顺序并不关键。如果第一特异性结合配偶体用吡啶化合物可检测地标记,则形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-抗原(例如UCH-L1和/或GFAP)复合物。另选地,如果使用第二特异性结合配偶体并且第二特异性结合配偶体用吡啶化合物可检测地标记,则形成可检测地标记的第一特异性结合配偶体-分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)-第二特异性结合配偶体复合物。任何未结合的特异性结合配偶体(无论标记或未标记的)都可使用本领域中已知的任何技术(诸如洗涤)从混合物中除去。

[0401] 过氧化氢可以在混合物中原位产生,或者在添加上述吡啶化合物之前、同时或之后提供或供应至混合物。过氧化氢可以许多方式(诸如将为本领域技术人员所显而易见的方式)原位产生。

[0402] 另选地,可以简单地将过氧化氢源添加至混合物。例如,过氧化氢源可以是已知含有过氧化氢的一种或多种缓冲液或其它溶液。就这一点而言,可以简单地添加过氧化氢溶液。

[0403] 在向样品中添加至少一种碱性溶液的同时或之后,产生指示分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)存在的可检测信号,即化学发光信号。碱性溶液含有至少一种碱并且具有大于或等于10、优选大于或等于12的pH。碱性溶液的实例包括但不限于氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙、氢氧化铵、氢氧化镁、碳酸钠、碳酸氢钠、氢氧化钙、碳酸钙和碳酸氢钙。添加至样品中的碱性溶液的量取决于碱性溶液的浓度。基于所用碱性溶液的浓度,本领域技术人员可容易地确定添加至样品中的碱性溶液的量。可以采用除化学发光标记以外的其它标记。例

如,可以采用酶标记(包括但不限于碱性磷酸酶)。

[0404] 可以使用本领域技术人员已知的常规技术检测产生的化学发光信号或其它信号。基于产生信号的强度,可定量样品中的感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的量。具体地,样品中的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的量与产生信号的强度成比例。存在的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的量可通过将所产生光的量与分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的标准曲线比较或通过参考标准比较来定量。可通过质谱、重量分析方法和本领域中已知的其它技术使用分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的已知浓度的连续稀释液或溶液来生成标准曲线。

[0405] (2) 正向竞争抑制测定

[0406] 在正向竞争形式中,使用已知浓度的标记的感兴趣分析物(例如具有荧光标记(一种用可裂解接头附接的标签)等的分析物(例如UCH-L1和/或GFAP))的等分试样与测试样品中感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)竞争结合感兴趣分析物抗体(例如UCH-L1和/或GFAP抗体)。

[0407] 在正向竞争测定中,固定化的特异性结合配偶体(诸如抗体)可以依次或同时与测试样品和标记的感兴趣分析物、其感兴趣分析物片段或感兴趣分析物变体接触。感兴趣分析物肽、感兴趣分析物片段或感兴趣分析物变体可以用任何可检测标记标记,包括由用可裂解接头附接的标签组成的可检测标记。在该测定中,可以将抗体固定化在固体支持物上。另选地,可以将抗体与固定化在固体支持物(诸如微粒或平面基材)上的抗体,诸如抗物种抗体偶联。

[0408] 将标记的感兴趣分析物、测试样品和抗体在与上文结合夹心测定形式所述的那些类似的条件下孵育。然后可以产生两种不同种类的抗体-感兴趣分析物复合物。具体地,产生的抗体-感兴趣分析物复合物之一含有可检测标记(例如荧光标记等),而另一种抗体-感兴趣分析物不含可检测标记。抗体-感兴趣分析物复合物可以但不必在定量可检测标记之前与测试样品的其余部分分离。无论抗体-感兴趣分析物复合物是否与测试样品的其余部分分离,然后都定量抗体-感兴趣分析物复合物中可检测标记物的量。然后可以确定测试样品中感兴趣分析物(诸如膜相关的感兴趣分析物、可溶性感兴趣分析物、可溶性感兴趣分析物的片段、感兴趣分析物的变体(膜相关的或可溶性感兴趣分析物)或其任何组合)的浓度,例如,如上所述的。

[0409] (3) 反向竞争抑制测定

[0410] 在反向竞争测定法中,固定化的感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)可以依次或同时地与测试样品和至少一种标记抗体接触。

[0411] 感兴趣分析物可以与固体支持物,诸如上文结合夹心测定形式讨论的固体支持物结合。

[0412] 将固定化的感兴趣分析物、测试样品和至少一种标记的抗体在与上文结合夹心测定形式所述的那些类似的条件下孵育。然后产生两种不同种类的感兴趣分析物-抗体复合物。具体地,产生的感兴趣分析物-抗体复合物之一被固定化并且含有可检测标记(例如荧光标记等),而另一种感兴趣分析物-抗体没有被固定化且不含可检测标记。通过本领域已知的技术,诸如洗涤,从固定化的感兴趣分析物-抗体复合物的存在中除去未固定化的感兴趣分析物-抗体复合物和测试样品的其余部分。一旦除去未固定化的感兴趣分析物抗体复

合物则在裂解标签后定量固定化的感兴趣分析物-抗体复合物分析物中可检测标记的量。然后可以通过比较如上所述的可检测标记的数量来确定测试样品中感兴趣分析物的浓度。

[0413] (4) 一步免疫测定法或“即时捕获”测定法

[0414] 在即时捕获免疫测定法中,将固体基质预先涂布有固定剂。将捕获剂、分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)和检测剂一起添加至固体基质,之后是洗涤步骤,然后检测。捕获剂可以结合分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)并且包含针对固定剂的配体。捕获剂和检测剂可以是抗体或如本文所述或本领域中已知的能够捕获或检测的任何其它部分。配体可以包含肽标签并且固定剂可以包含抗肽标签抗体。另选地,配体和固定剂可以是能够结合在一起,以便于用于即时捕获测定法的任何试剂对(例如特异性结合对,以及如本领域中已知的其它试剂对)。可以测量多于一种的分析物。在一些实施方式中,可以用抗原涂布固体基质,并且待分析的分析物是抗体。

[0415] 在某些其它实施方式中,在一步免疫测定法或“即时捕获”中,使用了预先涂布有固定剂(诸如生物素、链霉抗生物素蛋白等)的固体支持物(诸如微粒)和至少第一特异性结合成员和第二特异性结合成员(分别用作捕获试剂和检测试剂)。第一特异性结合成员包含针对固定剂的配体(例如,如果固体支持物上的固定剂是链霉抗生物素蛋白,则第一特异性结合成员上的配体可以是生物素)并且还结合感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)。第二特异性结合成员包含可检测标记并且结合感兴趣分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)。可以将固体支持物和第一和第二特异性结合成员(依次或同时地)添加到测试样品中。第一特异性结合成员上的配体与固体支持物上的固定剂结合,形成固体支持物/第一特异性结合成员复合物。存在于样品中的任何感兴趣分析物与固体支持物/第一特异性结合成员复合物结合以形成固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物。第二特异性结合成员与固体支持物/第一特异性结合成员/分析物复合物结合,并且检测到可检测标记。在检测之前可以采用任选的洗涤步骤。在某些实施方式中,在一步测定法中,可以测量多于一种的分析物。在某些其它实施方式中,可以采用多于两种的特异性结合成员。在某些其它实施方式中,可以添加多种可检测标记。在某些其它实施方式中,可以检测到多种感兴趣分析物,或者测量、确定或评估它们的量、水平或浓度。

[0416] 即时捕获测定法的使用可以以如本文所述的多种形式进行,并且在本领域中是已知的。例如,所述形式可以是如上所述的夹心测定法,但另选地可以是竞争测定法,可以采用单一特异性结合成员、或使用诸如已知的其它变型。

[0417] 10. 其它因素

[0418] 如上所述的诊断、预后和/或评估的方法可以进一步包括使用其它因素进行诊断、预后和评估。在一些实施方式中,可以使用格拉斯哥昏迷量表或扩展的格拉斯哥结局量表(GOSE)来诊断创伤性脑损伤。也可单独使用或与格拉斯哥昏迷量表组合使用其它测试、量表或指数。一个实例是瑞秋洛斯阿米哥斯量表(Ranchos Los Amigos Scale)。瑞秋洛斯阿米哥斯量表测量意识、认知、行为和与环境的互动的水平。瑞秋洛斯阿米哥斯量表包括:I级:无反应;II级:全身性反应;III级:局部反应;IV级:混乱-躁动;V级:混乱-不适当;VI级:混乱-适当;VII级:自动-适当;和VIII级:有目的-适当。

[0419] 11. 样品

[0420] 在一些实施方式中,在人类受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创

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

[0421] 在又一个实施方式中,本文所述的方法使用的样品还可以用于通过使用下文所述的抗UCH-L1和/或抗GFAP抗体或其抗体片段测定受试者中的UCH-L1和/或GFAP水平来确定受试者是否患有轻度创伤性脑损伤或处于罹患轻度创伤性脑损伤的风险中。因此,在特定实施方式中,本公开还提供了一种用于确定患有本文所述且本领域已知的创伤性脑损伤或处于本文所述且本领域已知的创伤性脑损伤的风险中的受试者是否是用于疗法或治疗的候选者的方法。一般来讲,受试者是以下中的至少一者:(i) 经历过对头部的损伤;(ii) 摄入和/或暴露于一种或多种化学物质和/或毒素;(iii) 罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水或罹患其任何组合;或(iv) (i)-(iii)的任何组合;或者,实际上已被诊断患有TBI或处于TBI的风险下(诸如,罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、一种或多种病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者)和/或展现出不利的(即临床上不希望的)UCH-L1和/或GFAP或UCH-L1和/或GFAP片段的浓度或量,如本文所述的。

[0422] a. 测试或生物样品

[0423] 如本文所用,“样品”、“测试样品”、“生物样品”是指含有或疑似含有UCH-L1和/或GFAP的流体样品。样品可以源自任何合适的来源。在一些情况下,样品可以包括液体、流动的微粒固体或固体颗粒的流体悬浮液。在一些情况下,可以在本文描述的分析之前处理样品。例如,可以在分析之前将样品从其来源分离或纯化;然而,在某些实施方式中,可以直接测定含有UCH-L1和/或GFAP的未处理样品。在一个具体实例中,UCH-L1和/或GFAP的来源是人体物质(例如体液、血液(诸如全血、血清、血浆)、尿液、唾液、汗液、痰液、精液、粘液、泪液、淋巴液、羊水、间质液、肺灌洗液、脑脊髓液、粪便、组织、器官等)。组织可包括但不限于骨骼肌组织、肝组织、肺组织、肾组织、心肌组织、脑组织、骨髓、子宫颈组织、皮肤等。样品可以是液体样品或固体样品的液体提取物。在某些情况下,样品的来源可以是器官或组织,诸如活检样品,其可以通过组织分解/细胞裂解而溶解。

[0424] 可以分析广泛范围体积的流体样品。在一些示例性实施方式中,样品体积可以是约0.5nL、约1nL、约3nL、约0.01μL、约0.1μL、约1μL、约5μL、约10μL、约100μL、约1mL、约5mL、约10mL等。在一些情况下,流体样品的体积在约0.01μL与约10mL之间、在约0.01μL与约1mL之间、在约0.01μL与约100μL之间、或在约0.1μL与约10μL之间。

[0425] 在一些情况下,流体样品可以在用于测定中之前进行稀释。例如,在UCH-L1和/或GFAP的来源为人体液(例如,血液、血清)的实施方式中,流体可以用适当的溶剂(例如,缓冲液,诸如PBS缓冲液)进行稀释。在使用之前可以将流体样品稀释约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多。在其它情况下,流体样品在用于测定中之前不进行稀释。

[0426] 在一些情况下,样品可以经历分析前处理。分析前处理可以提供额外的功能性,诸如非特异性蛋白质去除和/或有效但可廉价实现的混合功能性。分析前处理的一般方法可以包括使用电力捕获、AC电动力学、表面声波、等速电泳、介电泳、电泳或本领域已知的其它预浓缩技术。在一些情况下,流体样品可以在用于测定中之前进行浓缩。例如,在UCH-L1和/或GFAP的来源为人体液(例如,血液、血清)的实施方式中,可以通过沉淀、蒸发、过滤、离心或其组合来浓缩流体。在使用之前可以将流体样品浓缩约1倍、约2倍、约3倍、约4倍、约5倍、约6倍、约10倍、约100倍或更多。

[0427] b. 对照

[0428] 可能希望包括对照样品。对照样品可以与如上所述的来自受试者的样品同时分析。可以将受试者样品获得的结果与从对照样品获得的结果进行比较。可以提供标准曲线,可以将样品的测定结果与其进行比较。如果使用荧光标记,则此类标准曲线呈现作为测定单位,即荧光信号强度的函数的标记物水平。使用取自多个供体的样品,可以提供针对正常健康组织中UCH-L1和/或GFAP的参考水平,以及针对获自可能具有以上阐述的一个或多个特征的供体的组织中UCH-L1和/或GFAP的“有风险”水平的标准曲线。

[0429] 因此,鉴于上文,提供了一种用于确定测试样品中UCH-L1和/或GFAP的存在、量或浓度的方法。所述方法包括通过免疫测定法测定测试样品的UCH-L1和/或GFAP,所述免疫测定法例如采用至少一种结合UCH-L1和/或GFAP上的表位的捕获抗体和至少一种结合UCH-L1和/或GFAP上的不同于捕获抗体的表位的表位并且任选地包括可检测标记的检测抗体,并且包括将作为测试样品中UCH-L1和/或GFAP的存在、量或浓度的直接或间接指示的由可检测标记生成的信号与作为校准物中UCH-L1和/或GFAP的存在、量或浓度的直接或间接指示的生成信号进行比较。校准物任选地、且优选地是一系列校准物的一部分,其中每种校准物与系列中的其它校准物的不同之处在于UCH-L1和/或GFAP浓度。

[0430] 12. 试剂盒

[0431] 本文提供了一种试剂盒,所述试剂盒可以用于测定或评估测试样品的UCH-L1和/或GFAP或UCH-L1和/或GFAP片段。试剂盒包括至少一种用于测定测试样品的UCH-L1和/或GFAP的组分、用于测定测试样品的UCH-L1和/或GFAP的说明书。例如,试剂盒可以包括用于通过免疫测定法,例如化学发光微粒免疫测定法测定测试样品的UCH-L1和/或GFAP的说明书。试剂盒中所包括的说明书可粘贴于包装材料上或可作为包装说明书包括在内。虽然说明书通常是书写或印刷的材料,但它们不限于此类。本公开涵盖了能够存储此类说明并将其传达给最终使用者的任何介质。此类媒介包括但不限于电子存储媒介(例如磁盘、磁带、磁片盒、芯片)、光学媒介(例如CD ROM)等。如本文所用,术语“说明书”可以包括提供说明书的互联网网站的地址。

[0432] 至少一种组分可以包括至少一种组合物,其包含特异性结合UCH-L1和/或GFAP的一种或多种分离的抗体或其抗体片段。抗体可以是UCH-L1和/或GFAP捕获抗体和/或UCH-L1和/或GFAP检测抗体。

[0433] 另选地或另外,试剂盒可以包括用于进行测定法的校准物或对照,例如纯化的且任选冻干的UCH-L1和/或GFAP、和/或至少一个容器(例如管、微量滴定板或条,其可已用抗UCH-L1和/或GFAP单克隆抗体涂布)和/或缓冲液,诸如测定缓冲液或洗涤缓冲液,其中任一者都可提供为浓缩溶液、可检测标记(例如酶标记)的底物溶液、或终止液。优选地,试剂盒

包括进行测定法所必需的所有组分,即试剂、标准物、缓冲液、稀释剂等。说明书还可以包括用于生成标准曲线的说明书。

[0434] 试剂盒可以进一步包括用于定量UCH-L1和/或GFAP的参考标准物。可以采用参考标准物来建立用于内插和/或外推UCH-L1和/或GFAP浓度的标准曲线。参考标准物可以包含高UCH-L1和/或GFAP浓度水平,例如约100000pg/mL、约125000pg/mL、约150000pg/mL、约175000pg/mL、约200000pg/mL、约225000pg/mL、约250000pg/mL、约275000pg/mL或约300000pg/mL;中等UCH-L1和/或GFAP浓度水平,例如约25000pg/mL、约40000pg/mL、约45000pg/mL、约50000pg/mL、约55000pg/mL、约60000pg/mL、约75000pg/mL或约100000pg/mL;和/或低UCH-L1和/或GFAP浓度水平,例如约1pg/mL、约5pg/mL、约10pg/mL、约12.5pg/mL、约15pg/mL、约20pg/mL、约25pg/mL、约30pg/mL、约35pg/mL、约40pg/mL、约45pg/mL、约50pg/mL、约55pg/mL、约60pg/mL、约65pg/mL、约70pg/mL、约75pg/mL、约80pg/mL、约85pg/mL、约90pg/mL、约95pg/mL或约100pg/mL。

[0435] 试剂盒中提供的任何抗体,诸如对UCH-L1和/或GFAP具有特异性的重组抗体,可以掺入可检测标记,诸如荧光团、放射性部分、酶、生物素/抗生物素蛋白标记、发色团、化学发光标记等,或者试剂盒可以包括用于标记抗体的试剂或用于检测抗体的试剂(例如检测抗体)和/或用于标记分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的试剂或用于检测分析物(例如UCH-L1和/或GFAP)的试剂。抗体、校准物和/或对照可提供于独立容器中或预分配至适当测定形式中,例如预分配至微量滴定板中,

[0436] 任选地,试剂盒包括质量控制组分(例如敏感性组、校准物和阳性对照)。质量控制试剂的制备为本领域中所熟知且描述于各种免疫诊断产品的插页上。敏感性组成员任选地用于确立测定法性能特征,并且进一步任选地是免疫测定试剂盒试剂的完整性和测定法的标准化的可用指标。

[0437] 试剂盒也可任选地包括进行诊断测定法或有利于质量控制评价所需的其它试剂,诸如缓冲液、盐、酶、酶辅因子、底物、检测试剂等。用于分离和/或处理测试样品的其它组分(诸如缓冲液和溶液)(例如预处理试剂)也可包括于试剂盒中。试剂盒可另外包括一个或多个其它对照。试剂盒的一种或多种组分可被冻干,在所述情况下试剂盒可进一步包括适于复原冻干组分的试剂。

[0438] 试剂盒的各种组分任选地根据需要提供于适合容器,例如微量滴定板中。试剂盒可进一步包括用于容纳或存储样品的容器(例如用于尿液、全血、血浆或血清样品的容器或盒)。适当时,试剂盒任选也可含有反应器皿、混合器皿和有利于制备试剂或测试样品的其它组件。试剂盒也可包括用于帮助获得测试样品的一种或多种仪器,诸如注射器、移液管、钳子、测量匙等。

[0439] 如果可检测标记是至少一种吡啶化合物,则试剂盒可包括至少一种吡啶-9-甲酰胺、至少一种吡啶-9-羧酸芳基酯或其任何组合。如果可检测标记是至少一种吡啶化合物,则试剂盒也可包括过氧化氢来源,诸如缓冲液、溶液和/或至少一种碱性溶液。如果需要,试剂盒可含有固相,诸如磁性颗粒、珠粒、试管、微量滴定板、比色管、膜、支架分子、薄膜、滤纸、盘片或芯片。

[0440] 如果需要,试剂盒可以进一步包括用于测定测试样品中的另一种分析物的一种或多种组件,单独地或与说明书进一步组合,所述另一种分析物可以是生物标记物,诸如创伤

性脑损伤或病症的生物标记物。

[0441] a. 试剂盒和方法的调适

[0442] 试剂盒(或其组件)以及用于通过本文所述的免疫测定法评估或测定测试样品中 UCH-L1 和/或 GFAP 的浓度的方法可以适用于多种自动化和半自动化系统(包括其中固相包括微粒的那些),如例如美国专利号 5,063,081、美国专利申请公开号 2003/0170881、2004/0018577、2005/0054078 和 2006/0160164 中所述的和如例如由 Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为 Abbott 定点照护 (**i-STAT®** 或 **i-STAT Alinity**, Abbott Laboratories) 商业市售的,以及美国专利号 5,089,424 和 5,006,309 中所述的那些和如例如由 Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 作为 **ARCHITECT®** 或 Abbott Alinity 装置系列商业市售的。

[0443] 自动化或半自动化系统与非自动化系统(例如 ELISA)之间的一些差异包括第一特异性结合配偶体(例如分析物抗体或捕获抗体)所附接的底物(其可影响夹心形成和分析物反应性),以及捕获、检测和/或任何任选洗涤步骤的长度和时间。自动化或半自动化形式(例如 **ARCHITECT®** 和任何后继平台, Abbott Laboratories)可具有相对较短的孵育时间(例如对于 **ARCHITECT®** 为大约 18 分钟),而非自动化形式(诸如 ELISA)关于样品和捕获试剂可能需要相对较长的孵育时间(例如约 2 小时)。类似地,自动化或半自动化形式(例如 **ARCHITECT®** 和任何后继平台)可具有相对较短的孵育时间(例如对于 **ARCHITECT®** 和任何后继平台为大约 4 分钟),而非自动化形式(诸如 ELISA)可能以相对较长孵育时间(例如约 2 小时)孵育检测抗体(诸如缀合试剂)。

[0444] 可从 Abbott Laboratories 获得的其它平台包括但不限于 **AxSYM®**、**IMx®** (参见例如美国专利号 5,294,404,其据此通过引用整体并入)、**PRISM®**、EIA(珠粒)和 Quantum™ II 以及其它平台。另外,测定法、试剂盒和试剂盒组件可以在其它形式中,例如在电化学或其它手持型或定点照护型测定系统上采用。如先前所提及的,本公开例如适用于进行夹心免疫测定法的商业 Abbott 定点照护 (**i-STAT®**, Abbott Laboratories) 电化学免疫测定系统。免疫传感器及其制造方法和在单次使用测试装置中操作的方法描述于例如美国专利号 5,063,081、美国专利申请公开号 2003/0170881、2004/0018577、2005/0054078 和 2006/0160164 中,其关于此方面的教导均通过引用整体并入。

[0445] 具体地,关于测定法对 **i-STAT®** 系统的适应性,优选以下配置。将微制作的硅芯片制造有一对金安培计工作电极和银-氯化银参考电极。在一个工作电极上,将具有固定化的捕获抗体的聚苯乙烯珠粒(直径 0.2mm)粘附到电极上的图案化聚乙烯醇的聚合物涂层上。将该芯片组装成具有适于免疫测定法的流体形式的 **i-STAT®** 盒。在硅芯片的一部分上,存在 UCH-L1 和/或 GFAP 的特异性结合配偶体,诸如一种或多种 UCH-L1 和/或 GFAP 抗体(一种或多种可以结合 UCH-L1 和/或 GFAP 的单克隆/多克隆抗体或其片段、其变体、或其变体的片段)或一种或多种抗 UCH-L1 和/或 GFAP DVD-Ig (或可以结合 UCH-L1 和/或 GFAP 的其片段、其变体、或其变体的片段)的变体,其中任何一种都可以被可检测地标记。在盒的流体袋内是包括对氨基苯酚磷酸盐的含水试剂。

[0446] 在操作中,将来自疑似患有 TBI 的受试者的样品添加到测试盒的保持室中,并且将盒插入到 **i-STAT®** 读取器中。盒内的泵元件将样品推入到含有芯片的管道中。使样品与传

感器接触,从而使酶缀合物溶解到样品中。将样品在传感器上振荡,以促进大约2-12分钟的夹层形成。在测定法的倒数第二步中,将样品推入到废物室中并且使用含有针对碱性磷酸酶的底物的洗涤流体来洗涤过量的酶缀合物并从传感器芯片上取样。在测定的最后步骤中,碱性磷酸酶标记与对氨基苯酚磷酸酯反应以裂解磷酸酯基团并允许释放的对氨基苯酚在工作电极处被电化学氧化。基于所测量的电流,读取器能够通过嵌入算法和制造厂确定的校准曲线计算样品中UCH-L1和/或GFAP的量。

[0447] 用于本公开方法的本文所描述的自动化和半自动化系统可以使用一种或多种计算机程序、软件或算法以确定(读取)执行成像程序(例如基于阳性结果)还是不执行成像程序(例如基于阴性结果)。例如,一种或多种计算机程序或软件(例如,利用算法)可以提供以下解释(无论使用一个、两个还是更多个样品):(1)当GFAP和UCH-L1的水平小于参考水平(截止值)时,结果是阴性的,意味着将不执行成像程序;或(2)当GFAP和/或UCH-L1的水平大于或等于参考水平(截止值)时,结果是阳性的,意味着将执行成像程序。一种或多种计算机程序或软件可以提供其它适当的解释,诸如参考水平是否与阳性头部CT、颅内病变的存在或与未遭受过创伤性脑损伤的对照受试者相关联,是否应监测和/或用TBI治疗治疗罹患TBI的受试者等。这类计算机程序或软件为本领域所熟知。

[0448] 如本文所述的方法和试剂盒必然涵盖用于进行免疫测定法的其它试剂和方法。例如,涵盖各种缓冲液,诸如本领域中已知和/或可易于制备或优化以例如用于洗涤、用作缀合物稀释剂、微粒稀释剂和/或用作校准物稀释剂的缓冲液。示例性缀合物稀释剂是在某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中所采用且含有2-(N-吗啉基)乙烷磺酸(MES)、盐、蛋白质封闭剂、抗微生物剂和洗涤剂的ARCHITECT®缀合物稀释剂。示例性校准物稀释剂是在某些试剂盒(Abbott Laboratories, Abbott Park, IL)中所采用的ARCHITECT®人校准物稀释剂,其包括含有MES、其它盐、蛋白质封闭剂和抗微生物剂的缓冲液。另外,如2008年12月31日提交的美国专利申请号61/142,048中所述,可例如在i-STAT®盒形式中,使用与信号抗体连接的核酸序列作为信号放大剂获得改善的信号产生。

[0449] 虽然本文的某些实施方式在用于评估疾病(诸如创伤性脑损伤)时是有利的,但是测定法和试剂盒也可任选地用于在适当的情况下评估其它疾病、病症和病状中的UCH-L1和/或GFAP。

[0450] 测定方法也可用于鉴定改善疾病,诸如创伤性脑损伤的化合物。例如,可使表达UCH-L1和/或GFAP的细胞与候选化合物接触。可使用本文所述的测定方法将与化合物接触的细胞中的UCH-L1和/或GFAP的表达水平与对照细胞中的表达水平进行比较。

[0451] 本发明具有多个方面,所述多个方面通过以下非限制性实施例说明。

[0452] 13. 实施例

[0453] 对于本领域技术人员显而易见的是,本文所述的本公开方法的其它适合修改和改型是容易应用和了解的,并且可在不脱离本公开或本文公开的方面和实施方式的范围下使用适合等同物来进行。现已详细描述本公开,通过参考以下实施例将对其有更明确理解,所述实施例仅旨在说明本公开的一些方面和实施方式,并且不应视为限制本公开的范围。本文中提及的所有期刊参考文献、美国专利和公开的公开均据此以引用的方式全文并入。

[0454] 本发明具有多个方面,所述多个方面通过以下非限制性实施例说明。

[0455] 实施例1**[0456] i-STAT® UCH-L1测定法**

[0457] 将i-STAT® UCH-L1测定法用于TBI患者群体研究中。使用单克隆抗体对(诸如抗体A)作为捕获单克隆抗体,并且使用抗体B和C作为检测单克隆抗体。抗体A是在Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 内部开发的示例性抗UCH-L1抗体。抗体B和C识别UCH-L1的不同表位并增强样品中抗原的检测,由Banyan Biomarkers (Alachua, Florida) 开发。在Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 内部开发的其它抗体在以各种组合一起用作捕获抗体或检测抗体时也显示出或预期显示出相似的信号增强。针对关键性能属性评价UCH-L1测定法设计。盒配置是抗体配置:抗体A(捕获抗体)/抗体B+C(检测抗体);试剂条件:0.8%固体,125μg/mL Fab碱性磷酸酶簇缀合物;和进样打印:UCH-L1标准物。测定时间为10-15min(具有7-12min的样品捕获时间)。

[0458] 实施例2**[0459] i-STAT® UCH-L1测定法**

[0460] 将i-STAT® GFAP测定法用于TBI患者群体研究中。使用单克隆抗体对(诸如抗体A)作为捕获单克隆抗体,并且使用抗体B作为检测单克隆抗体。抗体A和抗体B是在Abbott Laboratories (Abbott Park, IL) 内部开发的示例性抗GFAP抗体。针对关键性能属性评价GFAP测定法设计。盒配置是抗体配置:抗体A(捕获抗体)/抗体B(检测抗体);试剂条件:0.8%固体,250μg/mL Fab碱性磷酸酶簇缀合物;和进样打印:GFAP特异性。测定时间为10-15min(具有7-12min的样品捕获时间)。

[0461] 实施例3**[0462] TBI群体研究 (TRACK-TBI)**

[0463] 创伤性脑损伤转化研究和临床知识 (TRACK-TBI) 研究是一个庞大而复杂的项目。其机构和公私伙伴关系由超过11个临床站点、7个核心组成,共有近50个合作机构、公司和慈善机构。基于来自三个临床站点的临床数据的早期TRACK-TBI初步研究帮助精修了TBI通用数据元素,并且创建了用于TRACK-TBI研究的TBI信息共享空间的原型。

[0464] 受试者组:总共招募2700至3000名TBI患者,平均进入按临床护理路径区分的3个临床组中:1.在急诊科中评价且出院的患者(ED);2.住进医院,但未住进ICU的患者(ADM);和3.住进ICU的患者(ICU)。将每个临床组(n=300)的另外100名患有颅外创伤但未患有TBI的患者作为对照,总共招募3000名患者。该分层计划有利于比较效果研究(CER)分析,并且不受传统区别为“轻度/中度/重度”TBI的限制。数据收集取决于临床护理路径(ED、ADM、ICU)和每个目标的要求。将每组中的患者分层为3个群组,所述群组限定了要收集的数据范围。

[0465] 对照是符合以下标准的成人整形外科创伤患者:1.对于肢体和/或骨盆损伤和/或肋骨骨折的简易损伤评分≤4(非危及生命的);2.符合与TBI受试者相同的纳入和排除标准,除了在ED中对疑似头部损伤进行CT或MRI的标准不适用。通过针对意识丧失(LOC)、意识障碍和创伤后遗忘症(PTA)/RA采访潜在对照,将TBI排除在当前损伤之外;3.为每个站点提供了根据源自TBI群组的年龄和性别分布要针对的对照数的计划;以及和4.将对照招募到CA-MRI群组中以进行随访,并且如果无法完成MRI就诊,则在2周时送至综合评估(CA)。

[0466] 受试者合格性:招募了就诊于急诊科(ED)、根据美国康复医学会议(ACRM)标准具有急性TBI病史的所有年龄段中的成人患者,其中患者已遭受的创伤性诱导的脑功能生理中断,如表现为以下项中的 ≥ 1 个:任何时段意识丧失(LOC);针对紧接在事故发生之前或之后的事件的任何记忆丧失(例如健忘症);在事故发生时精神状态的任何改变(感到头昏、迷失方向和/或混乱);和/或可能是或可能不是永久性的局灶性神经功能缺损。创伤性诱导的包括头部被撞击、头部撞击物体,或者脑部经历加速/减速运动(例如,颈部受伤)而没有对头部的直接外部创伤。

[0467] 使用的纳入/排除标准显示在表2中。

[0468] 表2

标准	数据来源	注释
纳入标准		
1.年龄 0-100	群组	
2.记录/验证的 TBI (ACRM 标准)	群组, 采访	
3.损伤发生在小于 24 小时之前	群组, 采访	
4.用于临床护理的急性脑补 CT	群组	受试者必须进行脑部 CT 扫描
5.足以进行测试的视力/听力	群组, 采访	
6.英语或西班牙语流利	群组, 采访	测试组合或人员可用性
7.能够提供知情同意书	采访	
排除标准		
1.会影响随访和结果评估的严重多发伤	群组	严重的身体创伤可能会混淆 TBI 结果测试。
2.犯人或被拘留的患者	群组, 采访	
3.女性受试者怀孕	群组, 采访	
4.精神病患者(例如 5150、5250)	群组	
5.会干扰随访和结果评估有效性的严重衰弱性基线心理健康障碍(例如精神分裂症或躁郁症)	群组, 采访	衰弱性精神病症会严重影响随访的可靠性和/或在归因于 TBI 指数时造成困难。
6.损害基线意识认知或随访和结果评估有效性的严重的衰弱性神经系统疾病(例如中风、CVA、痴呆、肿瘤)	群组, 采访	记录的衰弱性基线认知障碍除了不能完全被接受外, 还会混淆结果评估。

[0469]

[0470]

7.可能干扰随访和结果评估的重大的既往病史（例如药物滥用、酗酒、HIV/AIDS、可能会干扰知情同意的重大可传染疾病、晚期癌症、学习障碍、发育障碍）	群组，采访	
8.MRI 的禁忌症（针对 CA+MRI 群组）	MRI 筛选	
9.随访的可能性低（例如，参与者或家人表示兴趣低，在另一个州或国家居住，无家可归或缺乏可靠的联系方式）	采访	
10.当前参与介入试验（例如药物、设备、行为）	群组，采访	对于参加针对 TBI 的复苏终点研究联盟院前氨甲环酸研究的地点，共同纳入排除除外。
11.渗透性 TBI	群组	
12.ASIA 评分为 C 或更糟的脊髓损伤	群组	

[0471] 对于3个临床组（即ED、ADM和ICU）中的每个组，将受试者进一步置于三个不同的评估群组的一个中：简要评估（BA群组）、加压评估（CA）群组或加压评估+MRI（CA+MRI）群组关于具有80%随访率的里程碑计划，参见表3。

[0472] 表3

[0473]

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

[0474] 简要评估（BA）群组总共包括1200名受试者，ED、ADM和ICU组各自具有400名受试者。针对BA群组收集了以下数据：人口统计学和完整的临床病程数据；在第1天（损伤后<24小时）针对血清、血浆、DNA和RNA的抽血；在第1天基线收集的3-6小时内针对血清的重复抽血（任选地用于包括该组分的站点）；作为住院诊治经过的一部分从第1天开始取得的临床脑CT扫描；以及使用NINDS CDE网站上公开的NIH TBI-CDE v.2.0核心结局指标测量，通过第2周、第3、6和12个月时的结构化电话访问收集的结局数据。

[0475] 加压评估（CA）群组总共包括1200名受试者，ED、ADM和ICU组各自具有300名受试者

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

[0476] 综合评估+MRI (CA+MRI) 群组总共包括600名受试者，ED、ADM和ICU组各自具有200名。针对CA+MRI群组收集了以下数据：人口统计学和完整的临床病程数据；ADM和ICU组的高密度日常临床数据；在第1天（损伤后<24小时）针对血清、血浆、RNA和DNA的抽血；在第1天基线收集的3-6小时内针对血清的重复抽血（任选地用于包括该组分的站点）；对于ADM和ICU，在第3天（48-72小时）和第5天（96-120小时）针对血清、血浆和RNA的抽血；在第1天至第5天的脑脊液收集（任选地用于包括该组分的站点）；作为住院诊治经过的一部分取得的所有临床头部CT扫描；在第2周和第6个月时针对血清、血浆和RNA的抽血；在第2周和第6个月取得的3T研究MRI；以及通过使用NIH TBI-CDEs v.2.0核心、基本和补充结局指标测量，通过在第2周、第6个月和第12个月结构化面对面访问和在3个月时经由结构化电话访问收集的结局数据。

[0477] 在纳入后，数据收集在医院开始。对于CA+MRI患者，2周MRI在自损伤之日的14天±4天完成。相应的2周结局在2周MRI的±3天完成。对于CA和BA患者，2周结局在自损伤之日的14天的±4天完成。3个月时的结局在自损伤之日的90天的±7天完成。对于CA+MRI患者，6个月时的MRI在自受伤之日的180天的±14天完成，其中相应的6个月结局在6个月MRI的±14天。对于CA和BA患者，6个月结局在自损伤之日的180天的±14天完成。BTACT应在结局的±7天内完成（但不是在同一天并且不超过自损伤起的201天）。12个月时的结局在自损伤之日的360天的±30天完成。

[0478] 在i-STAT测定形式中的59名TRACK TBI患者的小样品量中测量UCH-L1（表4）。

[0479] 表4通过CT扫描和MRI结果获得的受试者特征

[0480]

受试者特征	总计 (n=59)	CT 或 MRI 阳性 (n=46, 77.97%)	CT 或 MRI 阴性 (n=13, 22.03%)	P 值
年龄	40.0 [24.0-60.0]	45.5 [23.0-60.0]	50.0 [39.0-57.0]	0.7419
性别				
男	50/59 (85%)	39/46 (85%)	11/13 (85%)	1.0000
女	9/59 (15%)	7/46 (15%)	2/13 (15%)	
种族/种族划分				
非洲裔美国人或 非洲人	6/58 (10%)	4/45 (9%)	2/13 (15%)	0.2398
白种人	48/58 (83%)	39/45 (87%)	9/13 (69%)	
拉丁美洲人	4/58 (7%)	2/45 (4%)	2/13 (15%)	
TBI 病史				
是, 没有 LOC	9/56 (16%)	3/43 (7%)	6/13 (46%)	0.0037
是, 有 LOC	8/56 (14%)	6/43 (14%)	2/13 (15%)	
没有先前 TBI	39/56 (70%)	34/43 (79%)	5/13 (38%)	
ED 表现				
意识丧失				

[0481]

否	6/58 (10%)	2/45 (4%)	4/13 (31%)	0.0227
是	47/58 (81%)	38/45 (84%)	9/13 (69%)	
未知	5/58 (9%)	5/45 (11%)		
拉斯哥昏迷量表	15.0 [3.0-15.0]	14.0 [3.0-15.0]	15.0 [15.0-15.0]	0.0162
拉斯哥昏迷量表分类				
重度 (3-8)	16/59 (27%)	16/46 (35%)		0.0177
中度 (9-12)	3/59 (5%)	3/46 (7%)		
轻度 (13-15)	40/59 (68%)	27/46 (59%)	13/13 (100%)	
损伤途径				
机动车辆 (驾驶员/乘客)	10/59 (17%)	9/46 (20%)	1/13 (8%)	0.2975
摩托车/ATV/高尔夫球车 (驾驶员/乘客)	5/59 (8%)	3/46 (7%)	2/13 (15%)	
被任何类型车辆撞击的个体	3/59 (5%)	2/46 (4%)	1/13 (8%)	
从移动物体跌倒 (自行车/滑板/马等)	3/59 (5%)	3/46 (7%)		
从静止物体跌倒 (屋顶/阶梯/等)	27/59 (46%)	20/46 (43%)	7/13 (54%)	
袭击	10/59 (17%)	9/46 (43%)	1/13 (8%)	
被物体撞击在头部, 不是袭击 (树/等)	1/59 (2%)		1/13 (8%)	
醇水平 (g/dL)	0.1 [0.0-0.2]	0.1 [0.0-0.2]	0.0 [0.0-0.0]	0.1588
药物筛选				
阴性	51/59 (86%)	41/46 (89%)	10/13 (77%)	0.3567
阳性	8/59 (14%)	5/46 (11%)	3/13 (23%)	
生物标记物结果				
自损伤起的收集时间 (分钟)	771.0 (+/-339.8)	779.4 (+/-296.8)	743.0 (+/-468.7)	0.7383
GFAP (pg/mL)	643.8 [188.6-2138.6]	876.6 [519.7-2409.5]	31.3 [26.3-166.2]	<0.0001

[0482]

UCH-L1 (pg/mL)	342.5 [102.8-718.3]	514.0 [167.2-859.8]	62.4 [44.5-136.8]	<0.0001
预后评分				
格拉斯哥结局量表 (3 个月)	6.0 [5.0-7.0]	5.5 [4.0-7.0]	7.0 [7.0-7.0]	0.0130
格拉斯哥结局量表 (6 个月)	6.0 [5.0-7.0]	6.0 [4.0-7.0]	7.0 [5.5-7.5]	0.1941
格拉斯哥结局量表 (12 个月)	7.0 [5.0-8.0]	6.5 [5.0-8.0]	7.0 [6.0-8.0]	0.4412
Rivermead 调查表前 3 项(6 个月)	0.0 [0.0-2.0]	0.0 [0.0-2.5]	0.0 [0.0-2.0]	0.8378
Rivermead 调查表最后 13 项 (6 个月)	9.0 [4.0-15.0]	8.5 [4.0-15.0]	13.0 [0.0-27.0]	0.5449
WAIS-III 处理速度指数 (6 个月)	30.0 [5.0-55.0]	30.0 [5.0-50.0]	43.0 [18.0-77.0]	0.3235
生活满意度量表 (6 个月)	21.5 (+/-6.2)	21.7 (+/-5.7)	20.4 (+/-8.5)	0.6205
功能独立性测量 (6 个月)	126.0 [125.0-126.0]	126.0 [124.0-126.0]	126.0 [126.0-126.0]	0.2958

[0483] *24名受试者接受MRI。

[0484] 连续变量呈现为中值[25-75%四分位距]并且使用威氏秩和检验进行比较

[0485] 或呈现为平均值(+/-SD)并且基于数据分布使用t检验进行比较。

[0486] 分类变量呈现为数字/总计(百分比)并且使用卡方或费舍尔精确检验。

[0487] 除了在脑损伤24小时内的抽血之外,每名患者还进行广泛的医学评价,包括头部CT、神经精神病学测试、格拉斯哥昏迷评分(GCS),并且许多患者还在损伤2周内进行了随访MRI。按照细致的标准化抽血方案和处理,将血浆样品等分以在-80℃下储存,然后解冻并测试。将每个样品一式两份,列出的结果是两次运行的平均值。图1A和1B显示在示例性受试者子组中,在损伤后的前24小时(范围大约为2-23小时),UCH-L1水平(图1A)和GFAP水平(图1B)与损伤相关联。表4显示乙醇(ETOH)水平不与生物标记物水平相关联(皮尔逊相关性=0.023,p值=0.89),因为ETOH消耗经常与TBI,特别是重度TBI相关。

[0488] 表5显示使用100pg/mL和300pg/mL的UCH-L1和GFAP截止水平与成像结果相比的结果。

[0489] 表5与成像结果相比的UCH-L1和GFAP的生物标记物截止值(参考水平)

成像方法	生物标记物截止值 (pg/mL)	成像方法	生物标记物组合		敏感性 (95% CI)	特异性 (95% CI)	PPV (95% CI)	NPV (95% CI)
			阳性	阴性				
CT	100	阳性	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%)
		阴性	0 (C)	4 (D)				
MRI 或 CT	100	阳性	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%)
		阴性	0 (C)	4 (D)				
CT	300	阳性	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%)
		阴性	3 (C)	13 (D)				
MRI 或 CT	300	阳性	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%)
		阴性	4 (C)	12 (D)				

[0491] 敏感性=A/ (A+C) ×100

[0492] 特异性=D/ (B+D) ×100

[0493] PPV=A/ (A+B) ×100

[0494] NPV=D/ (C+D) ×100

[0495] *注释:在上表中,“生物标记物截止值”和生物标记物参考水平在本文中可互换使用

[0496] MRI.图2A和2B显示与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI在时间点针对所有受试者所检测的)相关联的UCH-L1水平(图2A;AUC为0.815)和GFAP水平(图2B;AUC为0.835)的接受者操作特征(ROC)分析。图3A显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI所检测)相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的UCH-L1水平与第二时间点(“时间点2”)的UCH-L1水平之间的变化)的ROC分析(AUC=0.715)。图3B显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI所检测)相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的GFAP水平与第二时间点(“时间点2”)的GFAP水平之间的变化)的ROC分析(AUC=0.592)。基于ROC曲线的参考水平的敏感性和特异性示于表6和7中。

[0497] 表6

生物标记物	水平 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0499] 表7

[0500]

生物标记物	绝对量 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0501] CT扫描.图4A和4B显示与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI在时间点针对所有受试者所检测的)相关联的UCH-L1水平(图4A)和GFAP水平(图4B)的ROC分析。图5A显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用CT扫描所检测)相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的UCH-L1水平与第二时间点(“时间点2”)的UCH-L1水平之间的变化)的ROC分析。图5B显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用颅内病变所检测)相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的GFAP水平与第二时间点(“时间点2”)的GFAP水平之间的变化)的ROC分析。

[0502] MRI或CT扫描.图6A和6B显示与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI或CT扫描在时间点针对所有受试者所检测的)相关联的UCH-L1水平(图6A;AUC=0.683)和GFAP水平(图6B;AUC=0.847)的ROC分析。图7A显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI或CT扫描所检测)相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的UCH-L1水平与第二时间点(“时间点2”)的UCH-L1水平之间的变化)的ROC分析(AUC=0.668)。图7B显示对与存在或不存在颅内病变结果(如使用MRI或CT扫描所检测)相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即第一时间点(“时间点1”)的GFAP水平与第二时间点(“时间点2”)的GFAP水平之间的变化)的ROC分析(AUC=0.799)。基于ROC曲线的参考水平的敏感性和特异性示于表8和9中。

[0503] 表8

[0504]

生物标记物	水平 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0505] 表9

[0506]

生物标记物	绝对量 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0507] MRI但阴性CT扫描.图8A和8B显示对与使用时间点的MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关的UCH-L1水平(图8A;AUC为0.620)和GFAP水平(图8B;AUC为0.768)的ROC分析。在头部损伤24小时内取得样品。图9A示出了对与使用MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关联的UCH-L1水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的UCH-L1水平与时间点1处的UCH-L1水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析(AUC=0.626)。在头部损伤24小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。图9B示出了对与使用MRI但阴性CT扫描的存在颅内病变结果相关联的GFAP水平的绝对量(“绝对增量”(即时间点2处的GFAP水平与时间点1处的GFAP水平之间的绝对差)的接受者操作特征(ROC)分析(AUC=0.775)。在头部损伤24小时内取得时间点1处的样品,而在取得时间点1样品之后约3至约6小时取得时间点2处的样品。基于ROC曲线的参考水平的敏感性和特异性示于表10和11中。

[0508] 表10

[0509]

生物标记物	水平 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0510] 表11

[0511]

生物标记物	绝对量 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0512]

	34	86.11	49.12
	62	80.56	57.9

[0513] 在具有阳性MRI扫描颅内病变结果的CT阴性患者中分析GFAP和UCH-L1的组合。GFAP和UCH-L1参考水平的敏感性和特异性示于表12中。

[0514] 表12 GFAP或UCH-L1 (等于或大于截止值)

[0515]

GFAP截止值 (pg/mL)	GFAP截止值 (pg/mL)	敏感性	特异性
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

[0516] 在具有阴性MRI扫描颅内病变结果的CT阴性患者中分析GFAP和UCH-L1的组合。GFAP和UCH-L1参考水平的敏感性和特异性示于表13中。

[0517] 表13 GFAP或UCH-L1 (等于或大于截止值)

[0518]

GFAP 截止值 (pg/mL)	GFAP 截止值 (pg/mL)	敏感性	特异性
450	400	57.25	80.66
450	500	52.9	83.61
450	600	52.17	87.21

[0519]	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

[0520] 应理解先前详细描述和随附实施例仅是说明性的，并且不应视为对本发明的范围的限制，所述范围仅由随附权利要求及其等效物限定。

[0521] 所公开的实施方式的各种改变和修改对本领域技术人员是显而易见的。在不偏离其本质和范围的前提下，可进行与包括但不限于本发明的化学结构、取代基、衍生物、中间体、合成、组合物、制剂和/或使用有关的方法有关的此类改变和修改。

[0522] 出于完整性的原因，在以下编号条款中列出本发明的各个方面：

[0523] 条款1、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行成像程序的方法，该方法包括：a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测所述样品中早期生物标记物的水平，在所述样品中，所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合；并且b) 当所述样品中早期生物标记物的水平高于早期生物标记物的参考水平时，对受试者执行成像程序，且当所述样品中早期生物标记物的水平低于早期生物标记物的参考水平时，不对受试者执行成像程序，其中所述参考水平是通过 (a) 具有在至少约70%至100%之间的敏感性和在至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的；或 (b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

[0524] 条款2、根据条款1所述的方法，其中所述参考水平是通过具有至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性的测定法确定的。

[0525] 条款3、根据条款1所述的方法，其中所述参考水平在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间。

[0526] 条款4、根据条款1至3中任一项所述的方法，其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

[0527] 条款5、根据条款4所述的方法，其中基于所述成像程序，所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0528] 条款6、根据条款1至5中任一项所述的方法，其中所述成像程序是磁共振成像或头部计算机断层 (CT) 扫描。

[0529] 条款7、根据条款6所述的方法，其中将所述参考水平与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

[0530] 条款8、根据条款7所述的方法，其中将所述参考水平与颅内病变的存在相关联。

[0531] 条款9、根据条款1所述的方法，其中将所述参考水平与未患头部损伤的对照受试者相关联。

[0532] 条款10、根据条款1至9中任一项所述的方法，其中GFAP的所述参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。

[0533] 条款11、根据条款1至10中任一项所述的方法,其中UCH-L1的所述参考水平在约80pg/mL与约150pg/mL之间。

[0534] 条款12、根据条款1至11中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得所述样品。

[0535] 条款13、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者执行成像程序的方法,该方法包括:a)对获自所述受试者的至少两种样品执行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自受试者的第一样品和在取得第一样品之后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;b)检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP)或其组合;并且c)当从第一样品至第二样品的早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从第一样品至第二样品的早期生物标记物水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序。

[0536] 条款14、根据条款13所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

[0537] 条款15、根据条款14所述的方法,其中基于所述成像程序,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0538] 条款16、根据条款13至15中任一项所述的方法,其中所述成像程序是磁共振成像或头部计算机断层(CT)扫描。

[0539] 条款17、根据条款16所述的方法,其中将所述绝对量与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

[0540] 条款18、根据条款17所述的方法,其中将所述绝对量与颅内病变的存在相关联。

[0541] 条款19、根据条款18所述的方法,其中所述绝对量是通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的。

[0542] 条款20、根据条款19所述的方法,其中所述绝对量是通过具有以下的测定法测定的:(a)至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性;或(b)至少约75%的敏感性和至少约40%的特异性。

[0543] 条款21、根据条款19或20所述的方法,其中所述绝对量在至少约10pg/mL与至少约150pg/mL之间。

[0544] 条款22、根据条款23所述的方法,其中所述早期生物标记物为UCH-L1且所述绝对量在至少约30pg/mL至约100pg/mL之间,所述早期生物标记物为GFAP且所述绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间,或其组合。

[0545] 条款23、根据条款13至22中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得第一样品。

[0546] 条款24、根据条款13至23中任一项所述的方法,其中所述第二样品在所述第一样品后约3小时至约6小时之间取自所述受试者。

[0547] 条款25、根据条款1至24中任一项所述的方法,其中测量UCH-L1的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0548] 条款26、根据条款1至25中任一项所述的方法,其中测量UCH-L1的水平包括:A.使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1)UCH-L1捕获抗体,其结合UCH-L1或UCH-L1

片段上的表位以形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物,和(2)UCH-L1检测抗体,其包括可检测标记并且结合UCH-L1上未被UCH-L1捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,由此使得形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,以及B.基于通过UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中UCH-L1的量或浓度。

[0549] 条款27、根据条款1至26中任一项所述的方法,其中测量GFAP的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0550] 条款28、根据条款1至27中任一项所述的方法,其中测量GFAP的水平包括:A.使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:(1)GFAP捕获抗体,其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物,和(2)GFAP检测抗体,其包括可检测标记并且结合GFAP上未被GFAP捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,由此使得形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,以及B.基于通过GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物中的可检测标记生成的信号,测量样品中GFAP的量或浓度。

[0551] 条款29、根据条款1至28中任一项所述的方法,其中所述样品选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

[0552] 条款30、根据条款1至29中任一项所述的方法,其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的对头部的损伤之后获得所述样品。

[0553] 条款31、根据条款1至30中任一项所述的方法,其中在所述受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

[0554] 条款32、根据条款31所述的方法,其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0555] 条款33、根据条款1至29中任一项所述的方法,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0556] 条款34、根据条款1至33中任一项所述的方法,其中所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自由以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高UCH-L1水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受对头部的损伤的任何事件的时序。

[0557] 条款35、根据条款1至34中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用轻度创伤性脑损伤疗法治疗所述受试者。

[0558] 条款36、根据条款1至34中任一项所述的方法,其进一步包括监测所述受试者。

[0559] 条款37、根据条款1至36中任一项所述的方法,其中所述样品是全血样品。

[0560] 条款38、根据条款1至36中任一项所述的方法,其中所述样品是血清样品。

[0561] 条款39、根据条款1至36中任一项所述的方法,其中所述样品是血血浆样品。

[0562] 条款40、根据条款37至39中任一项所述的方法,其中所述测定是免疫测定法。

[0563] 条款41、根据条款37至39中任一项所述的方法,其中所述测定是临床化学测定法。

[0564] 条款42、根据条款37至39中任一项所述的方法,其中所述测定是单分子检测测定法。

[0565] 条款43、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行成像程序的方法,所述方法包括:

[0566] a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量或检测所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0567] b) 确定是否当所述样品中早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者执行成像程序,且当所述样品中早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者执行成像程序。

[0568] 其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或(b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

[0569] 条款44、一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法,所述方法包括:

[0570] a) 对在疑似头部损伤之后约24小时内获自所述受试者的样品进行测定以测量所述样品中早期生物标记物的水平,在所述样品中,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0571] b) 确定是否当所述样品中早期生物标记物的水平高于所述早期生物标记物的参考水平时,对所述受试者执行成像程序,且当所述样品中早期生物标记物的水平低于所述早期生物标记物的参考水平时,不对所述受试者执行成像程序。

[0572] 其中所述参考水平是:(a) 通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的;或(b) 在至少约20pg/mL至约200pg/mL之间。

[0573] 条款45、根据条款43或44所述的方法,其中所述参考水平是通过具有至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性的测定法确定的。

[0574] 条款46、根据条款43或44所述的方法,其中所述参考水平在至少约80pg/mL至约150pg/mL之间。

[0575] 条款47、根据条款43至46中任一项所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

[0576] 条款48、根据条款47所述的方法,其中基于所述成像程序,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0577] 条款49、根据条款43至48中任一项所述的方法,其中所述成像程序是磁共振成像(MRI) 或头部计算机断层(CT) 扫描。

[0578] 条款50、根据条款49所述的方法,其中将所述参考水平与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

[0579] 条款51、根据条款50所述的方法,其中将所述参考水平与颅内病变的存在相关联。

[0580] 条款52、根据条款43或44所述的方法,其中将所述参考水平与未患头部损伤的对照受试者相关联。

[0581] 条款53、根据条款43至52中任一项所述的方法,其中GFAP的所述参考水平在约20pg/mL与约200pg/mL之间。

[0582] 条款54、根据条款43至53中任一项所述的方法,其中UCH-L1的所述参考水平在约80pg/mL与约150pg/mL之间。

[0583] 条款55、根据条款43至54中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得所述样品。

[0584] 条款56、一种帮助确定是否对已遭受或可能已遭受头部损伤的人类受试者进行成像程序的方法,所述方法包括:

[0585] a) 对获自所述受试者的至少两种样品进行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自所述受试者的第一样品和在取得所述第一样品后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;

[0586] b) 检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0587] c) 确定是否当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序。

[0588] 条款57、一种评价人类受试者以确定是否针对头部损伤执行成像程序的方法,所述方法包括:

[0589] a) 对获自所述受试者的至少两种样品进行测定,所述两种样品为在疑似损伤24小时内取自所述受试者的第一样品和在取得所述第一样品后约3至约6小时取自所述受试者的第二样品;

[0590] b) 检测所述至少两种样品中创伤性脑损伤的早期生物标记物,所述早期生物标记物包括泛素羧基末端水解酶L1 (UCH-L1)、胶质细胞原纤维酸性蛋白 (GFAP) 或其组合;并且

[0591] c) 确定是否当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平降低或增加至少绝对量时对所述受试者执行成像程序,且当从所述第一样品至所述第二样品的所述早期生物标记物的水平没有降低或增加至少绝对量时,不对所述受试者执行成像程序。

[0592] 条款58、根据条款56或57所述的方法,其中所述受试者在进行所述测定之前或之后接受过成像程序。

[0593] 条款59、根据条款58所述的方法,其中基于所述成像程序,所述受试者疑似患有创伤性脑损伤。

[0594] 条款60、根据条款56至59中任一项所述的方法,其中所述成像程序是磁共振成像或头部计算机断层 (CT) 扫描。

[0595] 条款61、根据条款60所述的方法,其中将所述绝对量与阳性MRI扫描或阳性CT扫描相关联。

[0596] 条款62、根据条款61所述的方法,其中将所述绝对量与颅内病变的存在相关联。

[0597] 条款63、根据条款62所述的方法,其中所述绝对量是通过具有至少约70%至100%之间的敏感性和至少约30%至100%之间的特异性的测定法确定的。

[0598] 条款64、根据条款63所述的方法,其中所述绝对量是通过具有以下的测定法测定的:(a) 至少约80%的敏感性和至少约30%的特异性;或(b) 至少约75%的敏感性和至少约40%的特异性。

[0599] 条款65、根据条款63或64所述的方法,其中所述绝对量在至少约10pg/mL与至少约

150pg/mL之间。

[0600] 条款66、根据条款65所述的方法,其中所述早期生物标记物为UCH-L1且所述绝对量在至少约30pg/mL至约100pg/mL之间,所述早期生物标记物为GFAP且所述绝对量在至少约10pg/mL至约150pg/mL之间,或其组合。

[0601] 条款67、根据条款56至66中任一项所述的方法,其中在所述疑似头部损伤后约0至约12小时内取得第一样品。

[0602] 条款68、根据条款56至67中任一项所述的方法,其中所述第二样品在所述第一样品之后约3小时至约6小时之间取自所述受试者。

[0603] 条款69、根据条款43至68中任一项所述的方法,其中测量UCH-L1的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0604] 条款70、根据条款43至69中任一项所述的方法,其中测量UCH-L1的水平包括:

[0605] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0606] (1) UCH-L1捕获抗体,其结合UCH-L1或UCH-L1片段上的表位以形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原复合物,和

[0607] (2) UCH-L1检测抗体,其包括可检测标记并结合UCH-L1上不被所述UCH-L1捕获抗体结合的表位,以形成UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,使得形成UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物,以及

[0608] B. 基于通过所述UCH-L1捕获抗体-UCH-L1抗原-UCH-L1检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中UCH-L1的量或浓度。

[0609] 条款71、根据条款43至70中任一项所述的方法,其中测量GFAP的水平是通过免疫测定法或临床化学测定法进行的。

[0610] 条款72、根据条款43至71中任一项所述的方法,其中测量GFAP的水平包括:

[0611] A. 使所述样品同时或以任何顺序依次与以下接触:

[0612] (1) GFAP捕获抗体,其结合GFAP或GFAP片段上的表位以形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原复合物,和

[0613] (2) GFAP检测抗体,其包括可检测标记并结合GFAP上不被所述GFAP捕获抗体结合的表位,以形成GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,

[0614] 使得形成GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物,以及

[0615] B. 基于通过所述GFAP捕获抗体-GFAP抗原-GFAP检测抗体复合物中的所述可检测标记生成的信号,测量所述样品中GFAP的量或浓度。

[0616] 条款73、根据条款43至72中任一项所述的方法,其中所述样品选自由以下组成的组:全血样品、血清样品、脑脊液样品和血浆样品。

[0617] 条款74、根据条款43至73中任一项所述的方法,其中在所述受试者遭受由身体摇动、导致闭合性或开放性头部创伤的外部机械力或其它力产生的钝性冲击、一次或多次跌倒、爆炸或冲击波或其它类型的钝力创伤引起的对头部的损伤之后获得所述样品。

[0618] 条款75、根据条款43至74中任一项所述的方法,其中在所述受试者摄入或暴露于化学物质、毒素或化学物质和毒素的组合之后获得所述样品。

[0619] 条款76、根据条款75所述的方法,其中所述化学物质或毒素是火、霉菌、石棉、杀虫剂、杀昆虫剂、有机溶剂、油漆、胶水、气体、有机金属、滥用药物或其一种或多种组合。

[0620] 条款77、根据条款43至73中任一项所述的方法,其中所述样品从罹患自身免疫疾病、代谢紊乱、脑肿瘤、缺氧、病毒、脑膜炎、脑积水或其组合的受试者获得。

[0621] 条款78、根据条款43至77中任一项所述的方法,其中所述方法可以对任何受试者进行,而不考虑选自以下组成的组中的因素:所述受试者的临床病状、所述受试者的实验室值、所述受试者的作为罹患轻度、中度、重度或中度至重度创伤性脑损伤的分类、所述受试者的低或高UCH-L1水平的表现,以及其中所述人类受试者可能已遭受对头部的损伤的任何事件的时序。

[0622] 条款79、根据条款43至76中任一项所述的方法,所述方法进一步包括用轻度创伤性脑损伤疗法治疗所述受试者。

[0623] 条款80、根据条款43至76中任一项所述的方法,其进一步包括监测所述受试者。

[0624] 条款81、根据条款43至80中任一项所述的方法,其中所述样品是全血样品。

[0625] 条款82、根据条款43至80中任一项所述的方法,其中所述样品是血清样品。

[0626] 条款83、根据条款43至80中任一项所述的方法,其中所述样品是血浆样品。

[0627] 条款84、根据条款81至83中任一项所述的方法,其中所述测定是免疫测定法。

[0628] 条款85、根据条款81至83中任一项所述的方法,其中所述测定是临床化学测定法。

[0629] 条款86、根据条款81至83中任一项所述的方法,其中所述测定是单分子检测测定法。

[0630] 条款87、根据条款1至86中任一项所述的方法,其中所述方法适用于自动或半自动系统。

[0631] 条款88、根据条款87所述的方法,其中所述自动或半自动系统使用计算机程序确定对受试者执行成像程序或不对受试者执行成像程序。

[0632] 条款89、根据条款88所述的方法,其中通过所述计算机程序确定的需要执行成像程序展示为阳性结果。

[0633] 条款90、根据条款88所述的方法,其中通过所述计算机程序确定的不需要执行成像程序展示为阴性结果。

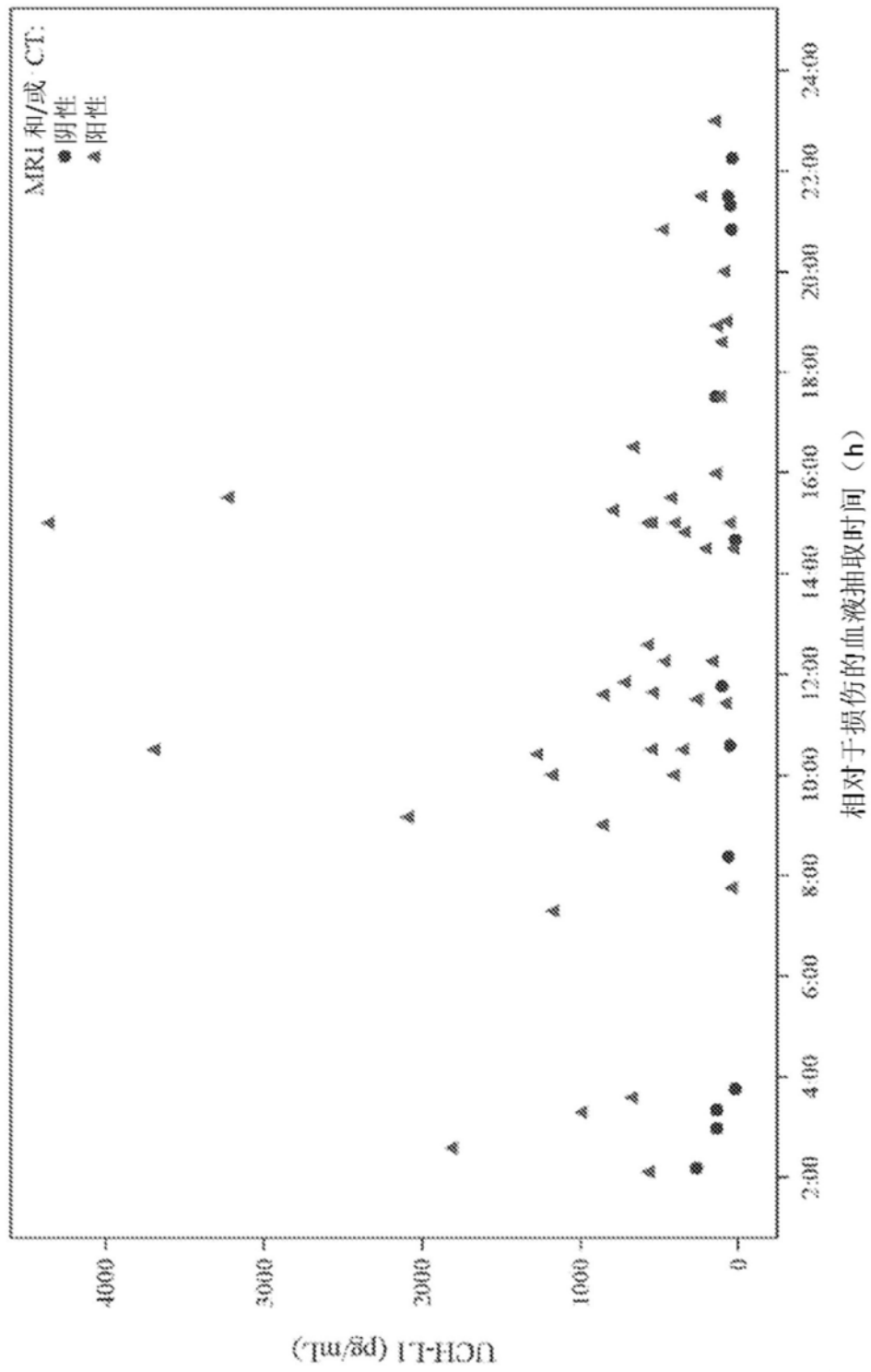


图1A

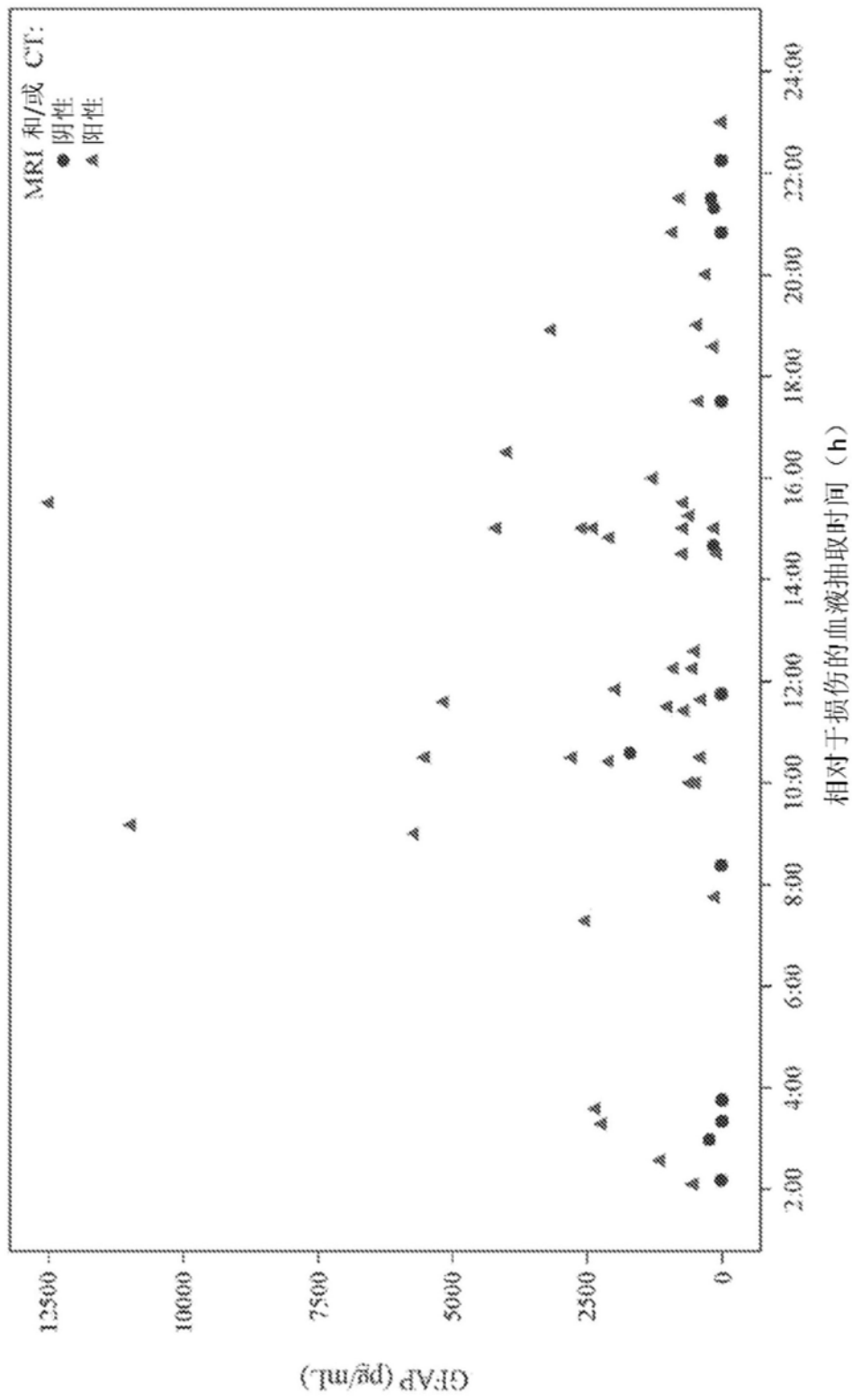


图1B

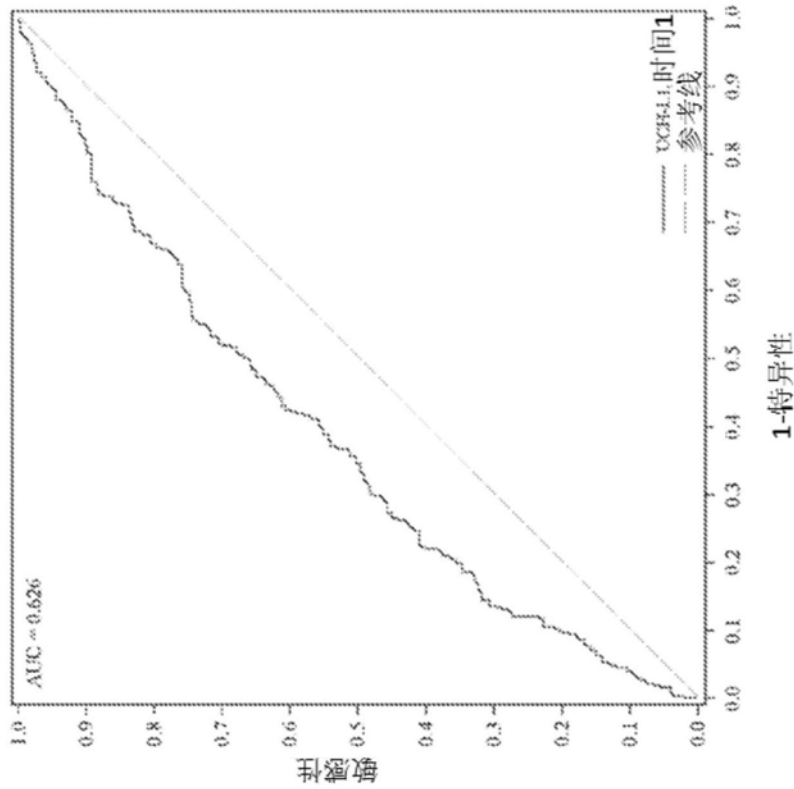


图2A

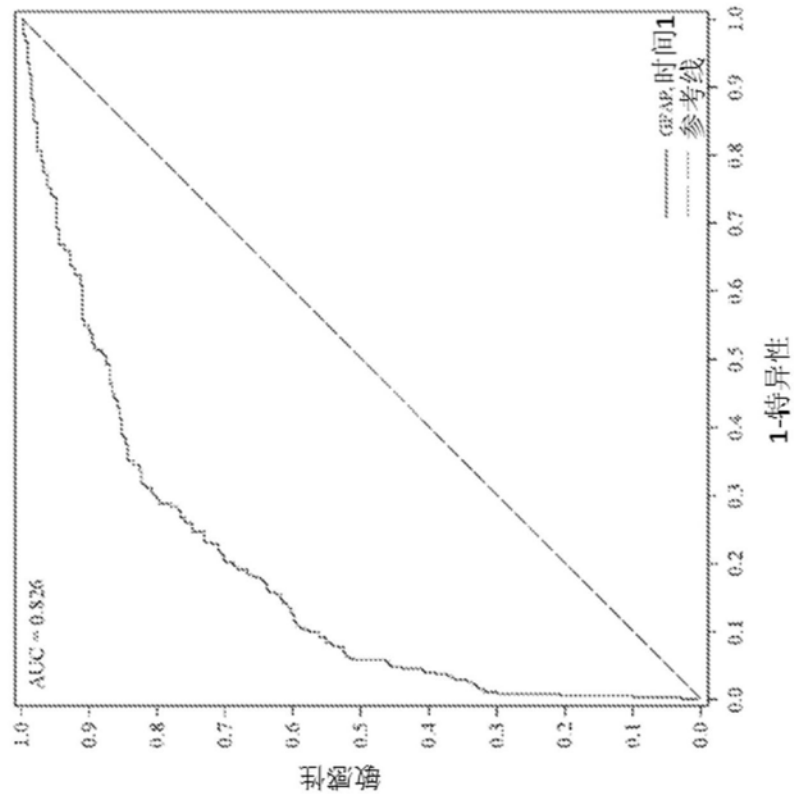


图2B

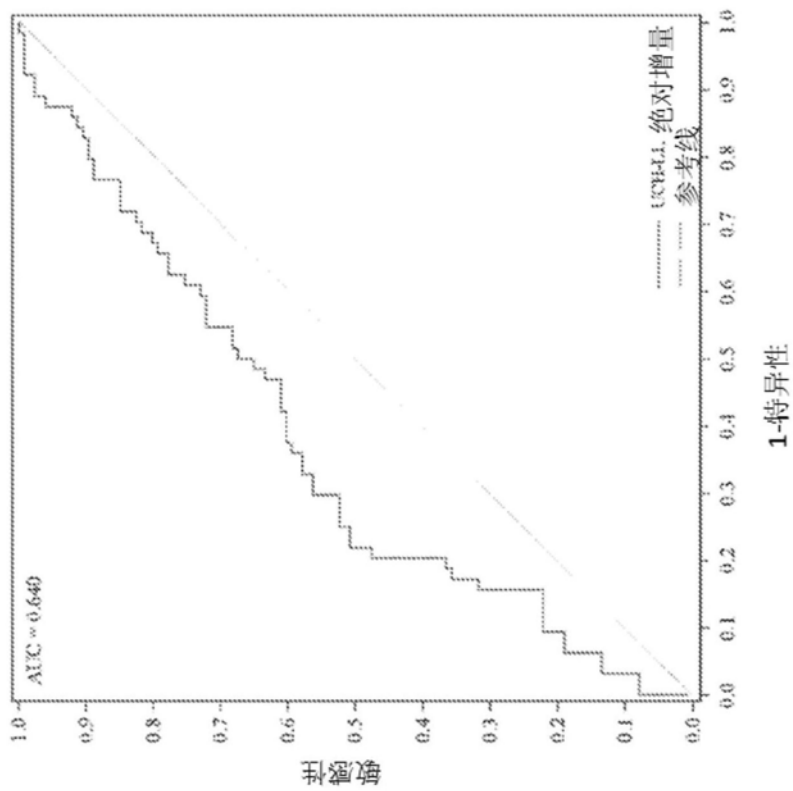


图3A

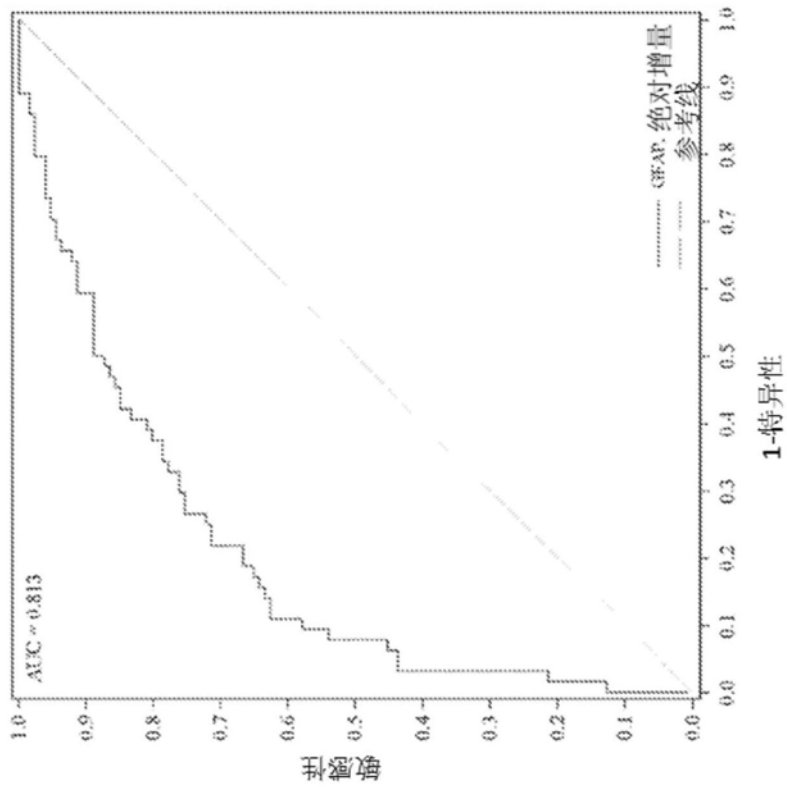


图3B

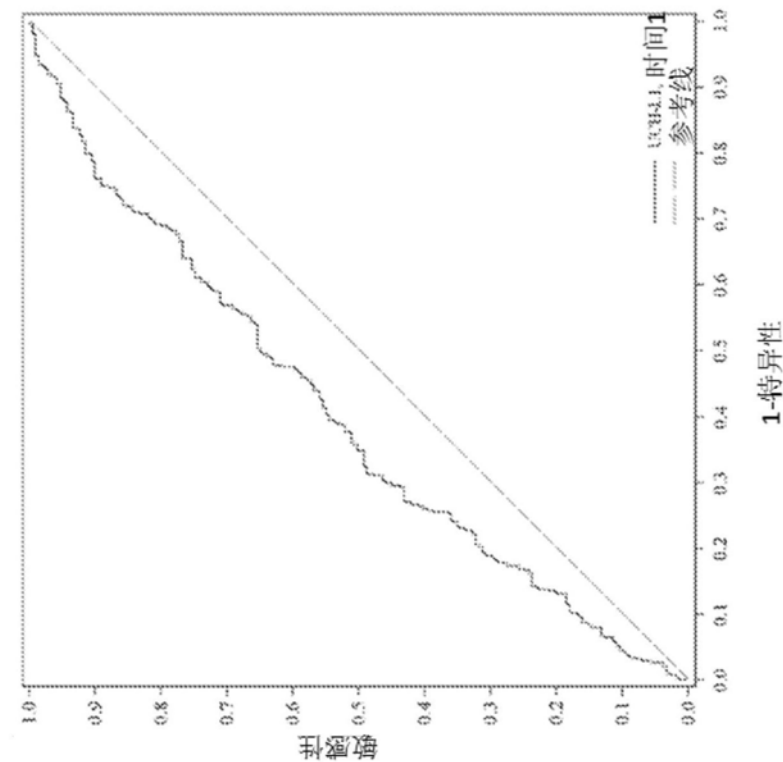


图4A

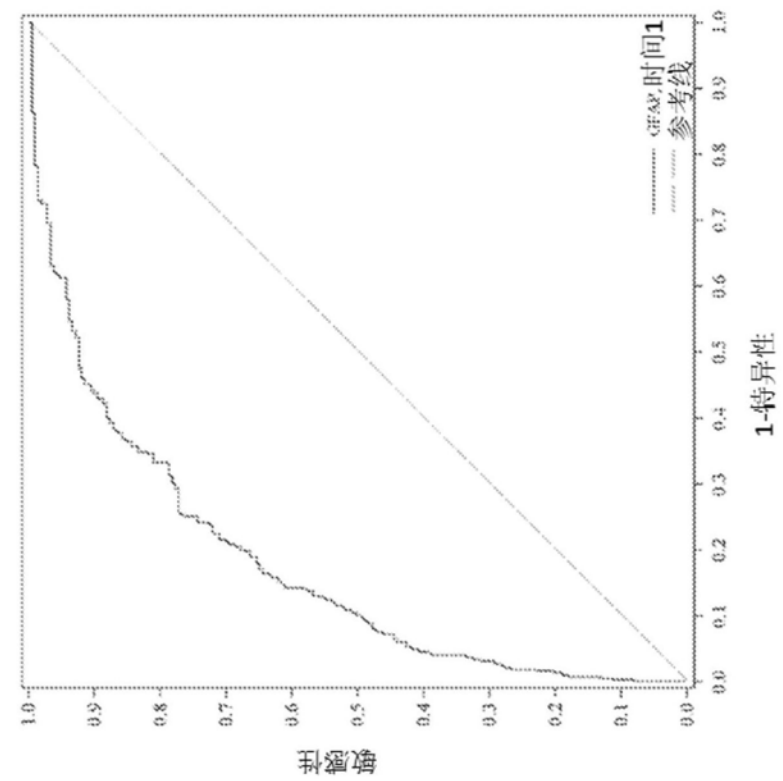


图4B

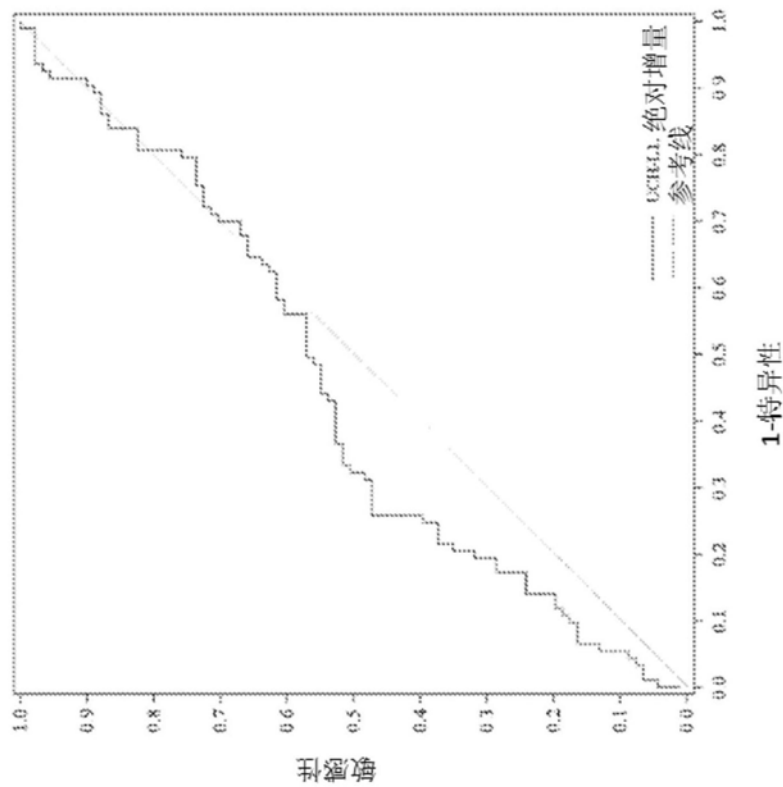


图5A

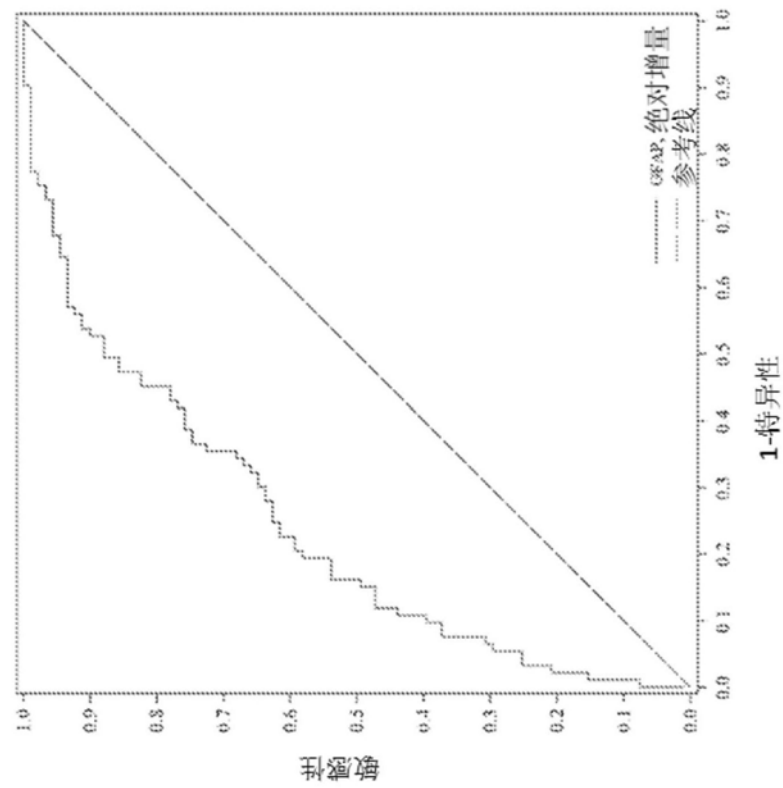


图5B

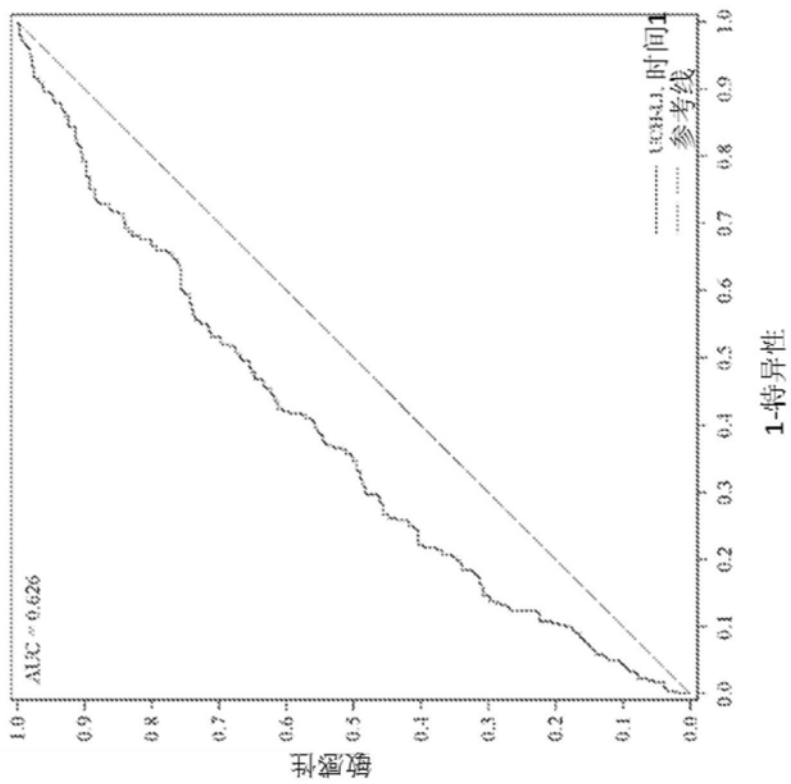


图6A

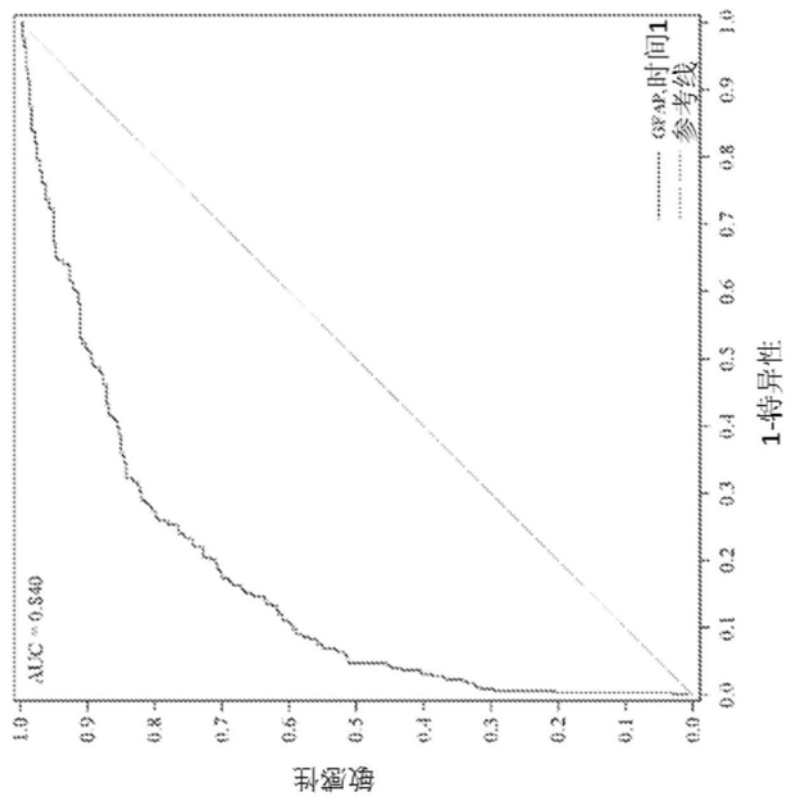


图6B

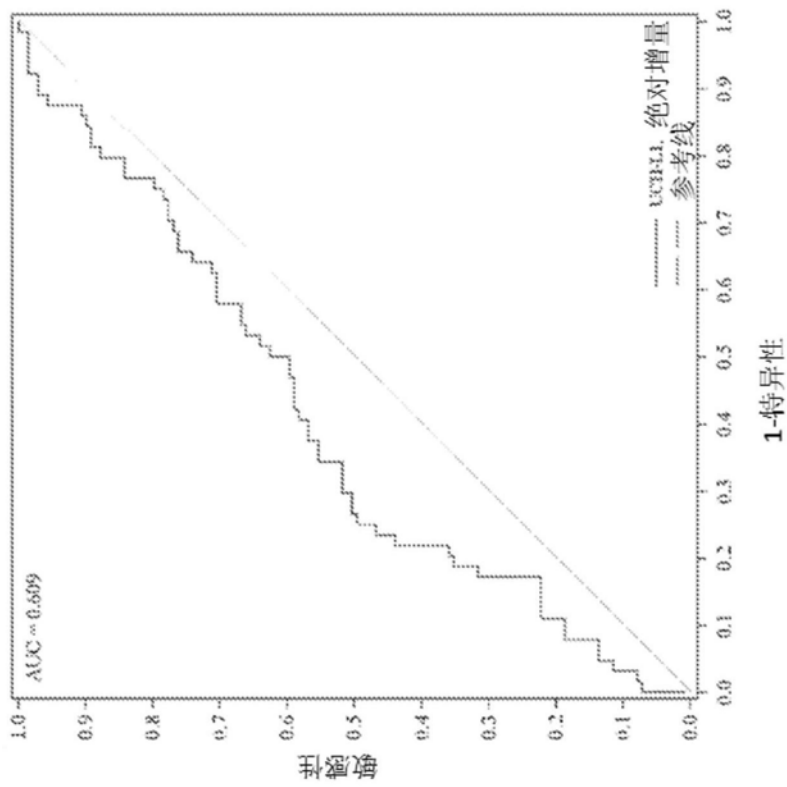


图7A

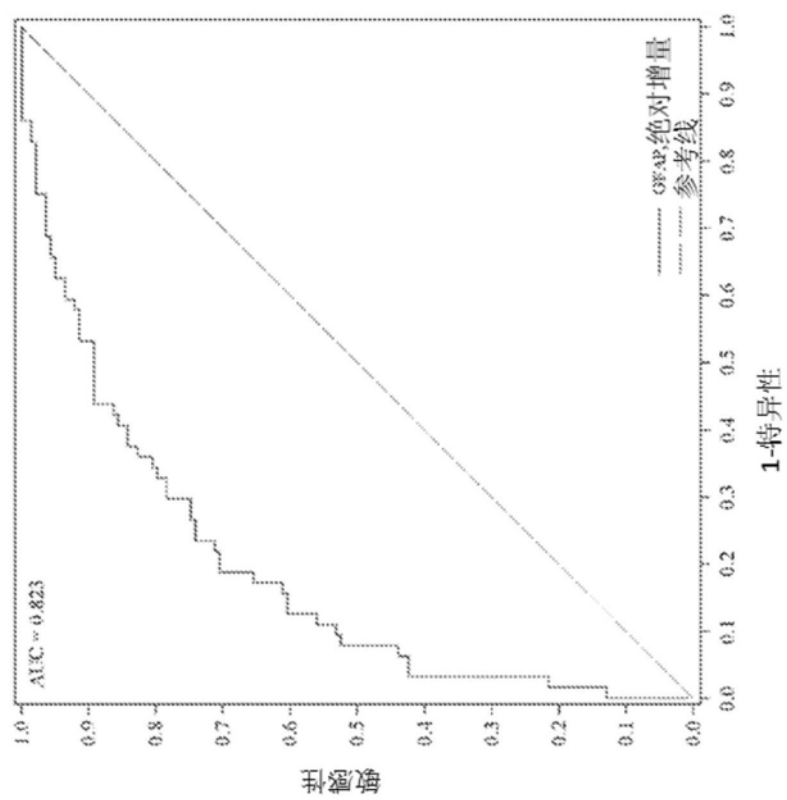


图7B

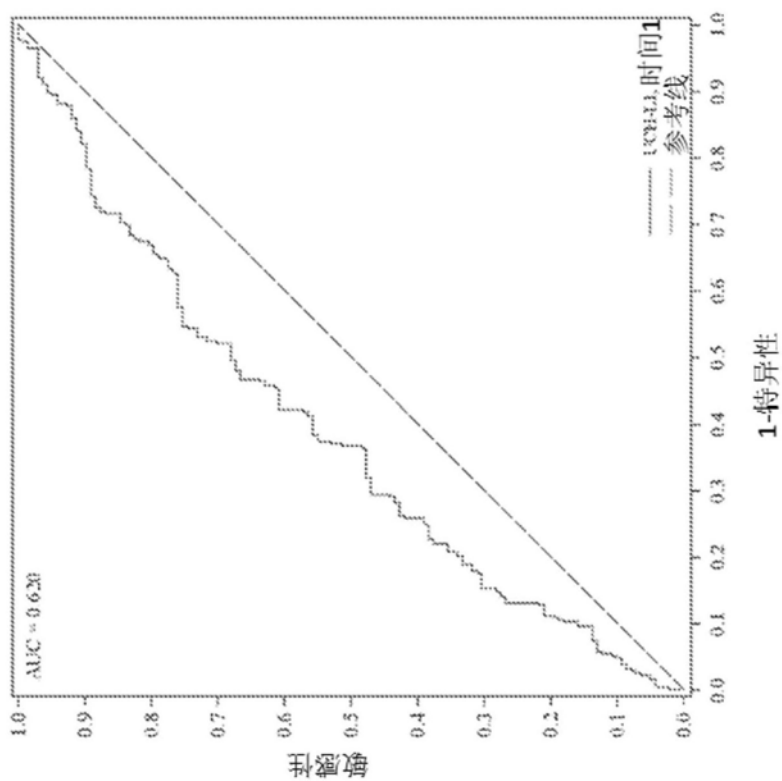


图8A

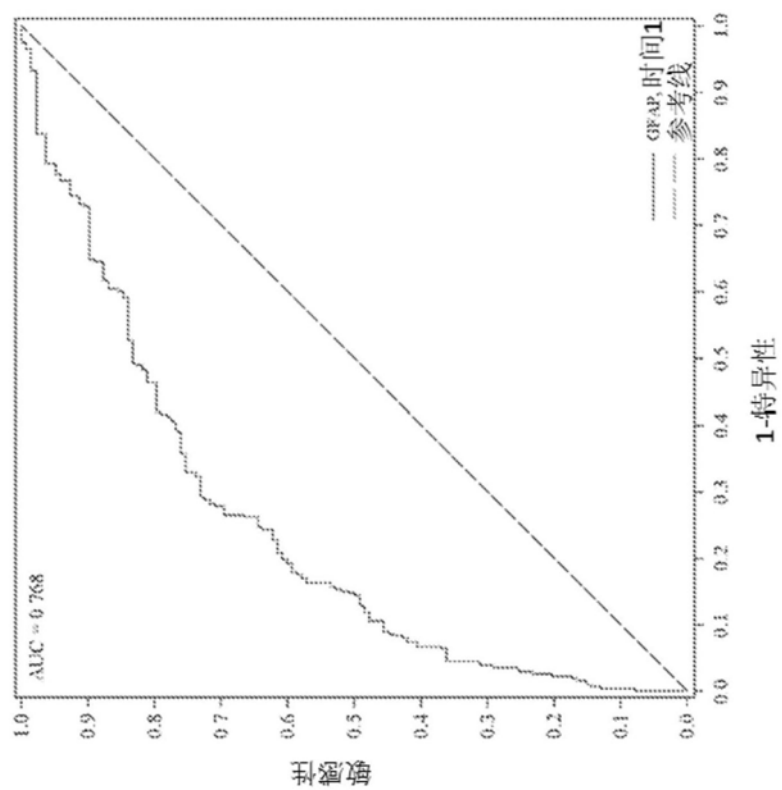


图8B

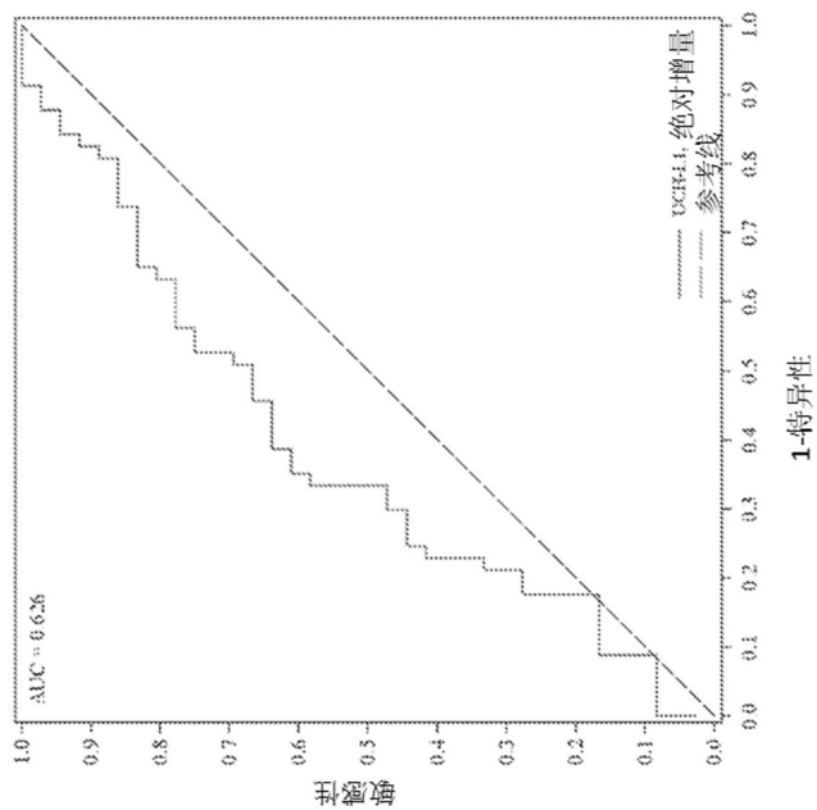


图9A

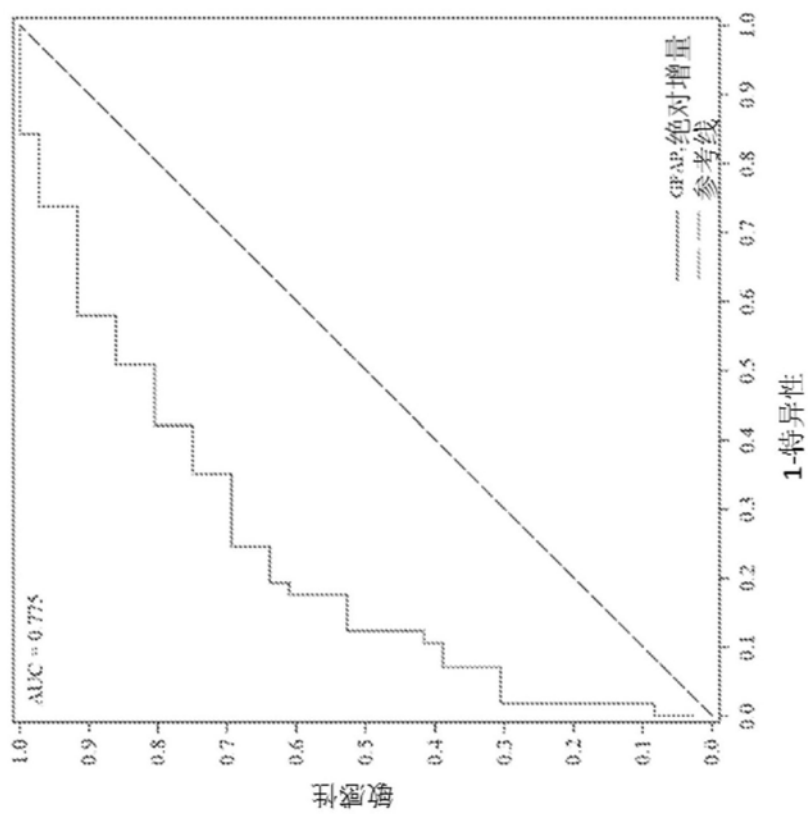


图9B