

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-532494

(P2008-532494A)

(43) 公表日 平成20年8月21日(2008.8.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	2 G O 4 5
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 45/00 (2006.01)</b>	A 6 1 K 45/00	4 C O 8 4
<b>A 6 1 P 25/28 (2006.01)</b>	A 6 1 P 25/28	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 35 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-555728 (P2007-555728)  
 (86) (22) 出願日 平成18年2月16日 (2006.2.16)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年10月15日 (2007.10.15)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2006/000469  
 (87) 国際公開番号 W02006/087634  
 (87) 国際公開日 平成18年8月24日 (2006.8.24)  
 (31) 優先権主張番号 60/653, 502  
 (32) 優先日 平成17年2月17日 (2005.2.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501358068  
 アンテグラジャン  
 I N T E G R A G E N  
 フランス国、エフ-91000 エヴリ、  
 リュ・アンリ・デブリュエール 5、ジェ  
 ノポール・カンピュス 1、ジュネヴェニ  
 ール 8  
 (74) 代理人 100078662  
 弁理士 津国 肇  
 (74) 代理人 100113653  
 弁理士 東田 幸四郎  
 (74) 代理人 100116919  
 弁理士 齋藤 房幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キナーゼをコード化するヒトの自閉症感受性遺伝子の使用

## (57) 【要約】

本発明ではヒトの自閉症感受性遺伝子の同定が開示されており、該遺伝子は医薬的に活性化薬剤のスクリーニングの他、自閉症および関連する障害の診断、予防、治療に有用となりうる。本発明ではより具体的には、1番染色体上のMARK 1およびその特定の対立遺伝子が自閉症への感受性と関連しており、治療的診断の新しい標的を示していることが開示されている。本発明は、MARK 1遺伝子内の特定の突然変異および発現産物、そしてこれらの突然変異に基づいた診断ツールおよびキットと関連する。本発明は、アスペルガー症候群、広汎性発達障害、精神遅滞、心配、憂うつ、注意不足活動過多症障害、発語の遅れ、てんかん、代謝異常、免疫障害、双極性疾患および精神分裂症などの他の精神疾患および神経疾患の素因の診断、発見、予防および/または治療に使用可能である。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因を検出する方法であって、(i)該被験者からの検体の提供、(ii)該検体の M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

**【請求項 2】**

被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害からの防御を検出する方法であって、(i)該被験者からの検体の提供、(ii)該検体の M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

**【請求項 3】**

自閉症、または関連の障害の治療に対する被験者の反応を評価する方法であって、(i)該被験者からの検体の提供、(ii)該検体の M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

**【請求項 4】**

自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の有害反応を評価する方法であって、(i)該被験者からの検体の提供、(ii)該検体の M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

**【請求項 5】**

被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の予防方法であって、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の素因の指標である被験者の検体の M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出すること、および自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する予防的治療を施行することを含む方法。

**【請求項 6】**

M A R K 1 遺伝子座における変化の存在が、塩基配列決定、選択的ハイブリダイゼーション、および/または選択的増幅によって検出される、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 7】**

該変化が、自閉症と関連する 1 または複数の S N P または S N P のハプロタイプである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 8】**

自閉症と関連する該ハプロタイプが、S N P 9、S N P 10、S N P 11、S N P 12、S N P 13、S N P 28、S N P 31、S N P 90 からなる群から選択される複数の S N P を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 9】**

自閉症と関連する該 S N P が S N P 13 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の方法。

**【請求項 10】**

自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する生物活性化合物の選択方法であって、試験化合物を M A R K 1 ポリペプチドまたはその遺伝子ないしそれらの断片と接触させること、および該 M A R K 1 ポリペプチド、またはその遺伝子ないしその断片と結合する該試験化合物の能力を決定することを含む方法。

**【請求項 11】**

自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する生物活性化合物の選択方法であって、M A R K 1 ポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞と試験化合物とを接触させること、および該 M A R K 1 ポリペプチドと結合するおよび M A R K 1 ポリペプチド活性を調節する該試験化合物の能力を決定することを含む方法。

**【請求項 12】**

自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する生物活性化合物の選択方法であって、試験化合物と M A R K 1 遺伝子とを接触させること、および該試験化合物が該 M A R K 1 遺伝子の発現を調節する能力を決定することを含む方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 13】

自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する生物活性化合物の選択方法であって、試験化合物と、MARK1遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含むレポーター構築物を含む組み換え宿主細胞とを接触させること、および該レポーター遺伝子の発現を調節する（例えば、促進または減少させる）試験化合物を選択することを含む方法。

## 【請求項 14】

該MARK1遺伝子またはそのポリペプチドまたはその断片が、変化または突然変異MARK1遺伝子またはポリペプチド、または変化または突然変異を含むそれらの断片である、請求項10～13のいずれか一項記載の方法。

10

## 【請求項 15】

該調節が活性化である、請求項10～14のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 16】

該調節が抑制である、請求項10～14のいずれか一項記載の方法。

## 【請求項 17】

被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療または予防のための医薬組成物の製造における、MARK1のアゴニストまたはアンタゴニスト、MARK1のアンチセンスまたはRNAi、MARK1ポリペプチドに特異的な抗体、もしくはその断片もしくはその派生物からなる群から選択される化合物の使用。

## 【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は概して、遺伝学および医学の分野に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

自閉症は、社会的相互作用および言葉・非言語コミュニケーションにおける障害、限定的で、型にはまったパターンの興味および活動、そして3歳までの発育障害の存在を特徴とする、神経精神病的な発育障害である（Baileyら、1996）。彼の小児自閉症に関する先駆的な記述において、Kanner（1943年）は以下の症状を挙げた：言語障害、アイコンタクトの欠如、社会的相互作用の欠如、反復行動、日常的に融通が利かない。彼は、大半の症例において、子供の行動が幼児期から異常であったことを指摘した。これに基づき、彼は、生まれつきの、恐らくは遺伝性の異常の存在を示唆した。1年後、ドイツのHans Aspergerは同様の患者について記載しており、この症状を「自閉的精神病質」と呼んだ。

30

## 【0003】

自閉症については、これまで疾患を診断するための具体的、生物学的指標は知られていないため、行動基準を利用して定義されている。自閉症の臨床像については、重症度が変動し、教育、能力、気質などの多くの因子によって変わる。さらに、臨床像は個人の発育過程においても変わる。また、自閉症は、注意欠陥障害、運動失調、心配や憂うつなどの精神科的症状といった他の障害と関連付けられることが多い。自閉症が、てんかん性、代謝性、そして免疫性障害も含みうるとの証拠が存在する。該変動性に関する臨床的認識に沿って、全てのレベルの知能、言語能力および全ての重症度にある個人を含めた、一連の自閉症障害が存在するとの一般的な合意が現在存在する。

40

## 【0004】

自閉症領域の一部であるが、特別なサブグループと見なされているのが、アスペルガー症候群（AS）である。ASは、自閉症領域障害（ASD）の特徴である、社会的相互作用の障害および限定された反復的行動、興味、活動の存在下で、临床上の有意な言語発達の遅れの欠如によって自閉性障害とは区別される。

## 【0005】

ASDは広汎性発達障害（PPD）型である。PPD, (not otherwise

50

specified (他に規定のない限り) (PPD-NOS) は、非定型自閉症を呈する、または2、3の重要な領域においてほぼ診断基準を満たすことによって、自閉症についての厳密な基準を満たさないが、自閉症に近い小児を分類するために使用される。

#### 【0006】

自閉症の診断を標準化するために、診断基準が世界保健機構(国際疾病分類第10改訂(ICD-10), 1992)およびアメリカ精神医学協会(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th edition (DSM-IV), 1994)によって定義された。自閉症診断インタビュー(ADI)が開発された(Le Couteur ら, 1989; Lord ら, 1994)。ADIは、標準化され、厳しく検証され、そして広く一般に認識されているASD診断のために利用可能な唯一の診断ツールである。ADIは、ICD-10改訂および自閉症の診断に関するDSM-IV基準に基づく、採点方式による親の半構造的面接である。ここでは、3つの主要分野(社会的相互作用の質、コミュニケーションおよび言語、限定的かつ反復的で型にはまった関心および行動)において、行動に焦点を合わせる。これらの基準を利用した場合、自閉症が稀な障害であるとはもはや見なされない。Kannerの基準に基づいた10,000人毎に4-5症例という過去に報告された有病率(Folstein and Rosen-Sheidley, 2001)と比較して、10,000人毎に10-12症例という高い有病率が最近の研究において報告された(Gillberg and Wing, 1999)。自閉性障害の全領域の有病率に関する推定値は1.5~2.5倍高い。女性と比較して、男性では4倍高い発生率の報告には矛盾がない。精神遅滞がASD症例の25~40%に存在する(Baird ら, 2000; Chakrabarti and Fombonne, 2001)。脳が関与する別の病状が、母集団の約10%で認められる(Gillberg and Coleman, 2000)。

#### 【0007】

自閉症の報告症例数の増加の根本にあるメカニズムは不明である。この差が、自閉症の有病率の増加、診断基準の段階的变化、病気発現のより大きな変動性の認識、あるいは障害に関する意識の高まりを反映しているのか否かについては大いに議論の余地がある。また、見掛け上の増加が主に環境因子に起因するという広範囲に及ぶ一般の認識がある(Nelson, 1991; Rodier and Hyman, 1998)。しかし、有病率の上昇の大部分が、これらの基準のより広範な適用と共に、診断基準の広幅化によって説明できる可能性は高いと思われる。

#### 【0008】

病気を改善させるための有効な処置が存在するが、利用可能な治療法はなく、処置の有益性は低くなる傾向がある。様々な行動・発育上の戦略を利用したいくつかのプログラムにおいて有望な結果が得られている。最も有望なものに、応用挙動解析(ABA)に基づくプログラムがある。いくつかの薬物療法が、自閉症に関連する様々な症状を改善して、それによって教育的および行動的診断からの個人の受益能を高めると思われた。最も広範に研究されている薬剤はドーパミンアンタゴニストである。数例の研究によって、様々な選択的セロトニン再取り込み阻害薬の有用性が示唆されている。

#### 【0009】

双生児に関する研究3例が、自閉症の遺伝率を推定するために実施されている(Folstein and Rutter, 1977; Bailey ら, 1995; Steffenburg ら, 1989)。地理的に定義された集団内に生活していた全ての双生児を探し出した。統合データにおいて、一卵性(MZ)双生児36人および二卵性(DZ)双生児30人が調査された。DZ率0%と比較して、平均MZ一致率は70%である。MZとDZとの一致率および約2~4%と推定された兄弟での再発リスクから、遺伝率90%以上が算出された(Jorde ら, 1991; Szatmari ら, 1998)。自閉症ではない血縁者に関する研究によって、社交場での寡黙、コミュニケーションにおける困難、日常での嗜好、変化の困難を含めた、ASDのいくつかの特徴が、対照と

10

20

30

40

50

する親よりも、自閉症の子供達の親においてより頻繁に見いだされることが明らかにされた (Folstein and Rutter, 1977)。発語開始の遅れおよび読みの困難も自閉症患者の家族においてより多く見られ、再発性の憂うつ、不安障害、血小板セロトニンの上昇、そして頭囲の増大も同様であった (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001)。

#### 【0010】

自閉症の発生率は罹患した個人との血縁度の低下に応じて有意に低下し、一遺伝子モデルによって大半の自閉症症例が説明される可能性は低いことを示している (Jorde ら, 1990)。報告された分離比解析は、多遺伝子性遺伝様式と全く矛盾がなかった (Jorde ら, 1991)。最も節約的な遺伝モデルは、数種の遺伝子が自閉症表現型を生じるために互いに相互作用するモデルである (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001)。

10

#### 【0011】

相当な状況証拠によって、自閉症における自己免疫の果たし得る役割が示されている。1例の研究では、対照の発端者と比較して、自閉症の発端者のいる家族においてより多くの自己免疫疾患を患う家族メンバーが認められた (Comi ら, 1999)。2, 3例の研究では、自閉症を患う一部の子供、または彼らの母親に存在する主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) 遺伝子座のハプロタイプによって、彼らの自閉症の子供たちが自己免疫病にかかりやすくなると報告されている (Burger and Warren, 1998)。2例の研究では、ミエリン塩基性タンパク質、神経フィラメントタンパク質、血管上皮などの特定の脳組織およびタンパク質に対する自己抗体が、対照と比較して、自閉症の子供たちにおいてより多く認められた (Singh ら, 1993; Connolly ら, 1999; Weizman ら, 1982)。

20

#### 【0012】

自閉症の大半の症例について、*oligogenicity* およびエピスタシスという示されたメカニズムと矛盾はないが、少数については染色体異常および特定の病因を伴う障害と関連して認められた。Smalley (1997年) は、既知の遺伝性疾患または染色体異常を伴う5~14%を含めた、自閉症症例の約15~37%が合併症を伴うと記述している。ほぼ全てのヒト染色体の関与する染色体異常が報告されている。これらには常染色体の異数性、性染色体異常、欠失、重複、転座、環状染色体、逆位、マーカー染色体が含まれる (Gillberg, 1998)。15番染色体上のブラダーウィリ/アンジェルマン症候群の領域の異常が最も多く見られる。自閉症とメンデル性疾患 (Mendelian condition) または遺伝的症候群との関連には、未治療のフェニルケトン尿症、脆弱X症候群、結節性脳硬化症、神経線維腫症が含まれる。近年、Carney ら (2003) は、MECP2 遺伝子 (メチル CpG - 結合蛋白2) の突然変異が症例の80%における原因となっている、レット症候群の症状を伴わない、自閉症を患う2人の女性におけるMECP2 遺伝子の突然変異を同定した。

30

#### 【0013】

様々なグループが、自閉症またはASDのより広範な表現型に関するゲノムスキャンを実施している。このアプローチは、組織的でモデルを使用しないため、非常に有望と思われる。また、既に成功していることが示されている。このように比較的小さな試験群での解析によってさえ、陽性の連鎖結果が得られている。より重要なことは、一部の知見が既に再現されていることである。最も一致した結果が染色体7qにおいて得られたが、染色体2qおよび16pにもかなりの重複が認められる (Folstein and Rosen-Sheidley, 2001)。染色体領域の特定における重要な進歩が、同じく15番染色体およびX染色体上において成されている。NLGN (ニューロリジン) 3 およびNLGN 4 をコード化する2つのX連鎖遺伝子における突然変異が、自閉症領域障害を患う兄弟において同定された (Jamain ら, 2003)。いくつかの証拠によって、ニューロリジンの突然変異が自閉性障害に関与しているという事実が裏付けられた。第一に、報告された突然変異は予測されたタンパク質の立体構造に重大な変化を生じる

40

50

。第二に、NLGN4を含むXp22.3の欠失が数人の自閉症の小児において報告されている。第三に、NLGN4の突然変異が、1人の罹患者の母親においてデノボで現れた。

#### 【0014】

##### 発明の概要

本発明では、治療効果のある薬剤のスクリーニングの他、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の診断、予防、治療のために利用可能なヒトの自閉症感受性遺伝子の同定について開示されている。

#### 【0015】

本発明では特に、治療効果のある薬剤のスクリーニングの他、自閉症および関連する障害の診断、予防、治療のために利用可能なヒトの自閉症感受性遺伝子の同定について開示されている。本発明は具体的には自閉症への感受性と関連しており、治療的介入のための新しいターゲットを示すMAP/微小細管親和性調節キナーゼ1(MARK1)遺伝子の特定の対立遺伝子を開示している。本発明は、MARK1遺伝子内の特定の突然変異および発現産物、そしてこれらの突然変異に基づいた診断ツールおよびキットと関連する。本発明は、アスペルガー症候群、広汎性発達障害、精神遅滞、心配、うつ病、注意不足活動過多症障害、発語の遅れ、てんかん、代謝異常、免疫障害、双極性疾患および精神分裂症などの他の精神疾患および神経疾患の素因の診断、発見、予防および/または治療に使用可能である。

10

#### 【0016】

本発明は、自閉症、自閉症領域障害(autism spectrum disorder)、または自閉症関連の障害(autism associated disorder)の素因の診断、防御、発見、予防および/または治療において使用可能であり、方法は、被験者の検体におけるMARK1遺伝子またはポリペプチドにおける変化の存在、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因の指標となる該変化の存在の検出を含む。該変化の存在は自閉症からの防御においても指標となりうる。

20

#### 【0017】

特に本発明の目的は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因の検出方法にあり、該方法は、被験者の検体でのMARK1遺伝子座における変化の存在の検出を含み、該変化の存在が自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因の指標となる。

30

#### 【0018】

特に本発明の別の目的は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害からの防御の検出方法にあり、該方法は、被験者の検体でのMARK1遺伝子座における変化の存在の検出を含み、該変化の存在が自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害からの防御の指標となる。

#### 【0019】

特に本発明の別の目的は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応の評価方法にあり、該方法は、被験者の検体でのMARK1遺伝子座における変化の存在の検出を含み、該変化の存在が該治療に対する特定の反応の指標となる。

40

#### 【0020】

特に本発明の別の目的は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の有害反応の評価方法にあり、該方法は、被験者の検体でのMARK1遺伝子座における変化の存在の検出を含み、該変化の存在が該治療に対する有害反応の指標となる。

#### 【0021】

本発明は、被験者の検体におけるMARK1遺伝子座における変化の存在、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の素因の指標となる該変化の存在の検出、および自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する予防的治療の施行を含む、自

50

閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の素因の予防方法とも関連する。

【0022】

好ましい一実施態様では、該変化は、自閉症と関連する1つ以上のSNPまたはSNPのハプロタイプである。より好ましくは、該ハプロタイプは、SNP9、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90からなる群から選択される複数のSNPを含む、もしくは複数のSNPを含む。さらに好ましくは、該ハプロタイプは、表4に開示されるハプロタイプから選択される。より好ましくは、自閉症と関連する該SNPはSNP13でありうる。

【0023】

好ましくは、MARK1遺伝子座の変化は、ハイブリダイゼーションアッセイ、シーケンシングアッセイ、マイクロシーケンシングアッセイ、対立遺伝子特異的増幅アッセイの実施によって判定される。

【0024】

本発明の特定の態様は、MARK1遺伝子を含むゲノム領域内の自閉症と関連する少なくとも1つのSNPまたはハプロタイプを特異的に検出するように設計された、プライマー、プローブ、および/またはオリゴヌクレオチドを含む組成物、またはそれらの組み合わせにある。より好ましくは、自閉症と関連する該ハプロタイプは、SNP9、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90からなる群から選択される複数のSNPを含む、もしくは複数のSNPを含む。さらに好ましくは、該ハプロタイプは、表4に開示されるハプロタイプから選択される。より好ましくは、自閉症と関連する該SNPはSNP13でありうる。

【0025】

本発明は、MARK1の発現または活性の調節を介した、被験者における自閉症および/または関連する障害の治療法にもある。該治療には、例えば、MARK1の発現または活性を調節する、MARK1ポリペプチド、MARK1 DNA配列(MARK1遺伝子座を標的とするアンチセンス配列およびRNAiを含む)、抗MARK1抗体または薬剤が使用される。

【0026】

本発明は、遺伝子治療、タンパク質の補給療法、またはMARK1タンパク質の模倣薬および/または阻害剤の投与による、発症前治療または併用療法を含めた、MARK1遺伝子の有害対立遺伝子を有する個人の治療法とも関連している。

【0027】

本発明の別の態様は、自閉症または関連する障害に関わるMARK1遺伝子の対立遺伝子、またはその遺伝子産物の調節または結合に基づく、自閉症または関連する障害の治療薬のスクリーニングにある。

【0028】

本発明の別の態様には、MARK1ポリペプチド断片に特異的な抗体および該抗体の派生物、該抗体を分泌するハイブリドーマ、これらの抗体を含む診断キットが含まれる。より好ましくは、該抗体は、MARK1の活性を変える変化を含むMARK1ポリペプチドまたはその断片に特異的である。

【0029】

本発明は、MARK1の活性を変える変化を含むMARK1遺伝子またはその断片にも関する。本発明は、MARK1の活性を変える変化を含むMARK1ポリペプチドまたはその断片にも関する。

【0030】

発明の詳細な説明

本発明では、ヒトの自閉症感受性遺伝子としてMARK1の同定を開示している。自閉症を患う114の家族からの様々な核酸検体が、特別なGenomeHIPプロセスに提出された。このプロセスによって、自閉症の被験者において変化している、該集団における特定の同一家系(identical-by-descent)内の断片が同定された

10

20

30

40

50

。IBD断片のスクリーニングによって、自閉症および関連する表現型に対する候補として、染色体1q14上のMAP/微小細管親和性調節キナーゼ1遺伝子(MARK1)を同定した。この遺伝子は実際に重要な間隔内に存在しており、自閉症での遺伝子調節と一致した機能的表現型を発現する。ヒトの被験者における自閉症と相関があるとして、MARK1遺伝子のSNPも同定された。MARK1遺伝子座に位置するSNP13が自閉症と関連することが見出された。SNP9、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90からなる群から選択される数種のSNPを含む、表4に開示されるハプロタイプも自閉症と関連するものとして同定されている。

#### 【0031】

このように本発明は、治療効果のある薬剤のスクリーニングの他、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の、診断、予防、治療のためにMARK1遺伝子および対応する発現産物を使用することを提案している。

#### 【0032】

##### 定義

自閉症および自閉症領域障害(ASD)：自閉症は通常、アスペルガー症候群(AS)および他の広汎性発達障害(PPD)を含む自閉症領域(ASD)の一部と特徴付けられる。自閉症は、健康が損なわれうる程度にまで、3歳までの行動、興味、活動の様式が限定的、反復的で、型にはめられている、社会的相互作用およびコミュニケーションが損なわれた状態と解釈される。ASは、自閉症領域障害(ASD)の特徴である、社会的相互作用の障害および限定された反復的行動、興味、活動の存在下で、言語発達における臨床上の有意な遅れの欠如によって、自閉性障害から区別される。PPD-NOS(PPD, "not otherwise specified" (他に規定のない限り))は、非定型自閉症を呈する、または2、3の重要な領域においてほぼ診断基準を満たすことによって、自閉症についての厳密な基準を満たさないが、自閉症に近い子供たちを分類するために使用される。

#### 【0033】

自閉症関連の障害、疾患、病状として、具体的には代謝異常、免疫障害、てんかん、心配、憂うつ、精神分裂症、注意欠陥多動性障害、発語の遅れ、運動失調が挙げられる。本発明は、様々な被験者、特に成人、子供、胎児を含めたヒトにおいて使用可能である。

#### 【0034】

本発明の文脈中で、MARK1遺伝子座は、MARK1コード配列、MARK1非コード配列(例、イントロン)、転写、翻訳(例、プロモーター、エンハンサー、ターミネーターなど)、RNAおよび(または)タンパク質の安定性を制御するMARK1調節配列そしてMARK1 RNA(例、mRNA)およびMARK1ポリペプチド(例、タンパク質前駆体および成熟タンパク質)などの対応する発現産物を含めた、細胞または生物内の全てのMARK1配列または産物を示す。MARK1遺伝子座は、MARK1遺伝子内に位置するSNPと連鎖不平衡にあるSNPを含むMARK1の周辺配列も含む。

#### 【0035】

本出願において使用されているとおり、「MARK1遺伝子」という用語は、自閉症および自閉症関連の障害への感受性と関係する、ヒト染色体1q41上のMAP/微小細管親和性調節キナーゼ1遺伝子、そして対立遺伝子(例、生殖細胞系突然変異)を含めた、その変異体、類似体、断片を示す。MARK1遺伝子の別名は、MAP/微小細管親和性調節キナーゼ、MARK、KIAA1477である。

#### 【0036】

「遺伝子」という用語は、ゲノムDNA(gDNA)、相補的DNA(cDNA)、合成または半合成DNA、対応する任意の形のRNAを含めた、任意の種類のコッド核酸を含むと解釈される。遺伝子という用語は特に、MARK1をコードする組み換え型核酸、つまり人工的に作成された(例、配列の組み立て、切断、連結、増幅による)非天然核酸を含む。

#### 【0037】

10

20

30

40

50

通常、MARK 1 遺伝子は二本鎖であるが、一本鎖などの他の形も検討できる。MARK 1 遺伝子は、DNAライブラリーのスクリーニング、または様々な天然材料からの増幅など、様々な材料から、周知の様々な技術によって得ることができる。組み換え核酸は、化学合成、遺伝子工学、酵素技術、これらの組み合わせを含めた、従来の方法によって比較可能である。適当なMARK 1 遺伝子配列は、Unigene Cluster for MARK 1 (Hs. 497806) および Unigene Representative Sequence NM\_018650 などのジーンバンクにおいて見出すことができる。MARK 1 遺伝子の特定の実施例は配列番号：1を含む。

【0038】

「MARK 1 遺伝子」という用語は、配列番号：1もしくは先に同定された任意のコード配列の変異体、断片、類似体を含んでいる。該変異体には、例えば、個人間での対立遺伝子の変化に起因する天然の変異体（例、多型）、自閉症と関連する突然変異対立遺伝子、選択的スプライシング形態などが含まれる。変異体という用語には、別の材料または生物由来のMARK 1 遺伝子配列も含まれる。変異体は、好ましくは配列番号：1とかなりの相同性を有しており、つまり配列番号：1と少なくとも約65%、通常は少なくとも約75%、好ましくは少なくとも約85%、より好ましくは少なくとも約95%のヌクレオチド配列の同一性を示す。MARK 1 遺伝子の変異体および類似体は核酸配列も含んでおり、これはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で先に定義された配列（またはその相補的鎖）とハイブリダイズする。

10

【0039】

通常ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件として、温度30 以上、好ましくは35 以上、より好ましくは42 以上、および/または塩分約500 mM未満、好ましくは200 mM未満が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、温度、塩分および/またはSDS、SSCなどの他の薬剤の濃度を変えることで当業者によって調節可能である。

20

【0040】

MARK 1 遺伝子断片は、先に開示された少なくとも約8個、好ましくは少なくとも約15個、より好ましくは少なくとも約20個、さらに好ましくは少なくとも約30個の連続する核酸配列の任意の一部を示す。断片には、ヌクレオチド8~100個、好ましくは15~100個、より好ましくは20~100個の全ての可能なヌクレオチド長を含む。

30

【0041】

MARK 1 ポリペプチドは、先に開示されたMARK 1 遺伝子によってコード化される任意のタンパク質またはポリペプチドを示す。「ポリペプチド」という用語は、アミノ酸の伸長を構成する任意の分子を示している。この用語は、ペプチドおよびタンパク質などの様々な長さの分子を含む。ポリペプチドは、グリコシル化および/またはアセチル化および/または化学反応または結合などによって変性が可能であり、1つ以上の非天然型アミノ酸または合成アミノ酸を含みうる。MARK 1 ポリペプチドの特定の実施例には、配列番号：2 (NP\_061120) の全体または一部を含む。

【0042】

「治療への反応」という用語は、治療化合物の代謝能力およびプロドラッグの活性薬剤への変換能を含めるが、これらに限定されない治療効果、そして個人における薬剤の薬物動態（吸収、分布、排出）および薬力学（受容体関連）を示す。

40

【0043】

「治療に対する有害反応」という用語は、薬剤の主な薬理作用の延長に起因する治療の有害反応、または薬剤と固有の宿主因子との相互作用に起因する特有の有害反応を示す。「治療に対する副作用」として、皮膚、血液、肝臓への毒性などの有害反応、さらに胃腸での潰瘍形成、血小板機能の障害、腎臓傷害、全身性の蕁麻疹、気管支狭窄、低血圧、ショックが挙げられるが、これらに限定されない。

【0044】

50

## 診断

今回、本発明では、被験者における M A R K 1 遺伝子座のモニタリングに基づく診断方法が提供されている。本発明の文脈中において、「診断」という用語は、成人、子供、胎児における、初期、発症前、後期を含めた様々な段階での、検出、モニタリング、投薬、比較などを含む。通常、診断には、予後、素因または発症リスクの評価、最適な治療を定義するための被験者の特性付け（薬理遺伝）などが含まれる。

## 【0045】

本発明は、個人において、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を発症するリスクがあるのか、もしくは M A R K 1 遺伝子座の突然変異または多型に起因する自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を患うか否かを判定するための診断方法を提供する。本発明は、個人が治療薬に対して前向きな反応を示す可能性があるのか否か、または個人が治療薬に対する有害反応を生じるリスクがあるのか否かを判定する方法を提供する。

10

## 【0046】

本発明の特定の目的は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因を検出する方法にあり、該方法は被験者の検体の M A R K 1 遺伝子座における変化の存在の検出を含む。該変化の存在は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因の指標である。場合により、該方法は被験者から検体を提供する前段階を含む。好ましくは、該検体中の M A R K 1 遺伝子座内の変化の存在は、検体の遺伝子型決定によって検出される。

20

## 【0047】

本発明の別の特定の目的は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害からの防御方法にあり、該方法は被験者の検体の M A R K 1 遺伝子座における変化の存在の検出を含み、該変化の存在は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の存在または素因の指標である。

## 【0048】

好ましい一実施態様では、該変化は、自閉症と関連する 1 つ以上の S N P または S N P のハプロタイプである。より好ましくは、自閉症と関連する該ハプロタイプは、S N P 9、S N P 10、S N P 11、S N P 12、S N P 13、S N P 28、S N P 31、S N P 90 からなる群から選択される複数の S N P を含む、もしくは複数の S N P からなる。さらに好ましくは、該ハプロタイプは、表 4 に開示されるハプロタイプから選択される。より好ましくは、自閉症と関連する該 S N P は S N P 13 である。

30

## 【0049】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応を評価する方法であり、該方法が ( i ) 被験者の検体の提供、( i i ) 該検体の M A R K 1 遺伝子座における変化の存在の検出を含む。

## 【0050】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応を評価する方法にあり、該方法は被験者の検体の M A R K 1 遺伝子座における変化の存在の検出を含む。該変化の存在は、該治療に対する特定の反応の指標である。好ましくは、該検体中の M A R K 1 遺伝子座内の変化の存在は、検体の遺伝子型決定によって検出される。

40

## 【0051】

本発明の別の特定の目的は、自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の治療に対する被験者の有害反応を評価する方法にあり、該方法は被験者の検体の M A R K 1 遺伝子座における変化の存在の検出を含む。該変化の存在は、該治療に対する有害反応の指標である。好ましくは、該検体中の M A R K 1 遺伝子座内における変化の存在は、検体の遺伝子型決定によって検出される。

## 【0052】

好ましい一実施態様では、該変化は、自閉症と関連する 1 つ以上の S N P または S N P のハプロタイプである。より好ましくは、自閉症と関連する該ハプロタイプは、S N P 9

50

、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90からなる群から選択される複数のSNPを含む、もしくは複数のSNPからなる。さらに好ましくは、該ハプロタイプは、表4に開示されるハプロタイプから選択される。より好ましくは、自閉症と関連する該SNPはSNP13である。

【0053】

別の一実施態様では、本発明は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の予防方法に関するものであり、被験者の検体のMARK1遺伝子座における変化の存在の検出、ここで該変化の存在が自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害の素因の指標となり、および自閉症、自閉症領域障害、または自閉症関連の障害に対する予防的治療の施行を含む。該予防的治療は、薬物投与でありうる。

10

【0054】

治療または薬剤に対する反応、もしくは治療または薬剤に対する副作用を解析・予測する診断法を利用して、個人を特定の治療薬で治療すべきか否かを判断できる。例えば、仮に診断において個人が特定の薬物治療に対して前向きな反応を示す可能性が示される場合、その個人に薬剤を投与できる。反対に、仮に診断において個人が特定の薬物治療に対して否定的な反応を示す可能性が示される場合、代替りの治療コース(course)を処方できる。否定的な反応を示すとは、有効な反応の欠如または有毒な副作用の存在のいずれかとして定義できる。

【0055】

臨床試験ではMARK1 SNPの別の用途が示される。上記の方法を利用して、薬剤への反応または薬剤への副作用の指標となる1つ以上のMARK1 SNPを同定可能である。その後、該薬剤の臨床試験における潜在的な参加者をスクリーニングして、該薬剤に良好な反応を示す可能性の最も高い個人を特定して、副作用を経験する可能性の高い個人を除外できる。このようにして、試験において前向きな反応を示す可能性の低い個人を含めた結果、測定値を低下させることなく、また好ましくない安全性の問題という危険を冒すことなく、薬剤に前向きな反応を示す個人において薬物療法の有効性を判定可能である。

20

【0056】

変化は、MARK1 gDNA、RNA、またはポリペプチドのレベルで判定可能である。場合により、MARK1遺伝子の全体または一部分の塩基配列決定、またはMARK1遺伝子の全体または一部分の選択的ハイブリダイゼーションまたは選択的増幅によって検出される。より好ましくは、変化の同定段階より前に、MARK1遺伝子の特異的に増幅させる。

30

【0057】

MARK1遺伝子座の変化は、単独または様々な組み合わせで、遺伝子座のコード領域および/または非コード領域内の突然変異、欠失、再配列および/または挿入の任意の形でありうる。突然変異はより具体的には点突然変異を含む。欠失は、残基2個から遺伝子または遺伝子座全体までの、遺伝子座のコード部分または非コード部分内の2つ以上の残基の任意の領域を含みうる。典型的な欠失は、約50個未満の連続する塩基対のドメイン(イントロン)または反復配列または断片などの、小さな領域に影響を及ぼすが、より大きな欠失も生じうる。挿入は、遺伝子座のコード部位または非コード部位内の1個または数個の残基の付加を含みうる。挿入は通常、遺伝子座内の1~50個の塩基対の付加を含みうる。再配列には配列の逆位が含まれる。MARK1遺伝子座の変化は、停止コドンの形成、フレームシフト変化、アミノ酸置換、特定のRNAスプライシングまたはプロセシング、産物の不安定化、切断ポリペプチドの産生などをもたらしうる。該変化は、機能、安定性、標的化、構造の変化したMARK1ポリペプチドの産生をもたらしうる。該変化は、タンパク質発現の減少、あるいは該生産量の増加の原因にもなりうる。

40

【0058】

本発明に従った方法での特定の一実施態様では、MARK1遺伝子座における変化は、MARK1遺伝子または対応する発現産物における点突然変異、欠失、挿入、より好まし

50

くは点突然変異、欠失から選択される。該変化は、MARK1 gDNA、RNA、またはポリペプチドのレベルで判定される。

【0059】

この点において、今回、本発明ではMARK1遺伝子内のSNPおよび特定のハプロタイプを開示しており、これらには自閉症と関連するSNP9、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90からなる群から選択されるSNPが含まれる。SNPは以下の表1において報告されている。

【0060】

【表1】

表1

SNPの識別	dbSNPの参照	対立遺伝子1	対立遺伝子2	NCBI Build 34に基づく1番染色体のゲノム配列におけるヌクレオチドの位置	遺伝子座における位置	配列番号
SNP9	rs10779402	A=1	G=2	217510465	5' of MARK1	3
SNP10	rs2589588	A=1	G=2	217776269	Intron of MARK1	4
SNP11	rs2786604	C=1	G=2	217820394	Intron of MARK1	5
SNP12	rs1193032	A=1	T=2	217852989	Intron of MARK1	6
SNP13	rs2889895	A=1	G=2	217884421	Intron of MARK1	7
SNP28	rs10495200	C=1	G=2	219956664	3' of MARK1	8
SNP31	rs2789910	G=1	T=2	220229321	MARK1 locus	9
SNP50	rs1499289	C=1	T=2	221747296	MARK1 locus	10
SNP90	rs2073489	C=1	T=2	224038302	MARK1 locus	11

【0061】

本発明に従った任意の方法では、MARK1遺伝子内の1つまたは数個のSNPおよびMARK1遺伝子内のSNPを含む特定のハプロタイプ、より好ましくはSNP9、SNP10、SNP11、SNP12、SNP13、SNP28、SNP31、SNP90を、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害と関連している、また他の遺伝子内に存在する、別のSNPまたはハプロタイプと併用可能である。

【0062】

別の変異体では、方法には、MARK1RNA発現の変化の存在の検出が含まれる。RNA発現の変化には、RNA配列の変化の存在、RNAスプライシングまたはプロセッシングの変化の存在、RNA量の変化の存在などが含まれる。これらは周知の様々な技術、例えば、MARK1RNAの全体または一部分の塩基配列決定、または該RNAの全体または一部分の選択的ハイブリダイゼーションまたは選択的増幅によって検出可能である。

【0063】

別の変異体では、方法には、MARK1ポリペプチド発現の変化の存在の検出が含まれる。MARK1ポリペプチド発現の変化には、ポリペプチド配列の変化の存在、MARK1ポリペプチド量の変化の存在、組織分布における変化の存在などが含まれる。これらは周知の様々な技術、例えば、配列決定および/または特定リガンド(抗体など)への結合によって検出可能である。

【0064】

上記のとおり、配列決定、ハイブリダイゼーション、増幅および/または特定リガンド

(抗体)への結合など、周知の様々な技術を利用して、MARK 1 遺伝子/RNA 発現または配列の変化を検出または定量可能である。他の適当な方法には、対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド(ASO)、対立遺伝子特異的増幅、サザンブロットティング(DNA に対して)、ノーザンブロットティング(RNA に対して)、一本鎖高次構造解析(SSCA)、PFGE、蛍光 *in situ* ハイブリデーション法(FISH)、ゲル移動、クランプ変性ゲル電気泳動法、ヘテロ二本鎖解析、RNAse プロテクション法、化学的ミスマッチ切断、ELISA、ラジオイムノアッセイ(RIA)、免疫酵素アッセイ(IEMA)が含まれる。

#### 【0065】

これらの方法の一部(例、SSCA および CGGE)は、配列の変化の存在に起因する、核酸の電気泳動移動度の変化に基づいている。これらの技術に従って、配列の変化をゲル上での移動度の変化によって可視化させる。次に、断片の配列を決定して、変化を確認する。

10

#### 【0066】

他の一部は、被験者の核酸と野生型または変化したMARK 1 遺伝子/RNA に特異的なプローブとの特異的ハイブリダイゼーションに基づいている。プローブは、浮遊状態にする(suspension)か、もしくは基質に固定できる。プローブは通常、標識して、ハイブリッドの検出を容易にする。

#### 【0067】

これらの方法の一部(ノーザンブロット、ELISA、RIA など)は、ポリペプチド配列または発現レベルの評価に特に適している、これらの後者では、ポリペプチドに特異的なリガンド、より好ましくは特異的抗体の使用が必要となる。

20

#### 【0068】

特に、好ましい一実施態様では、方法には、被験者の検体におけるMARK 1 遺伝子発現プロファイルの変化の存在の検出が含まれる。上記のとおり、これは、より好ましくは、該検体に存在する核酸の配列決定、選択的ハイブリダイゼーションおよび/または選択的増幅によって達成可能である。

#### 【0069】

##### 配列決定

自動シーケンサーを用いて、周知の技術を利用して配列決定を実施可能である。完全なMARK 1 遺伝子、より好ましくは、通常、有害な突然変異又は他の変化を有することが判明している、もしくは有することが疑われるMARK 1 遺伝子の特異的領域について配列決定を実施可能である。

30

#### 【0070】

##### 増幅

増幅は、核酸複製の開始に役立つ相補的な核酸配列間での特異的ハイブリッドの形成に基づいている。

#### 【0071】

ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、鎖置換増幅(SDA)、核酸配列増幅(NASBA)などの周知の様々な技術に従って増幅を実施する。これらの技術は、市販の試薬およびプロトコルを利用して実施可能である。好ましい技術では、対立遺伝子特異的PCRまたはPCR-SSCPが利用される。通常、増幅において、反応を開始させるために特異的な核酸プライマーの使用が必要である。

40

#### 【0072】

MARK 1 遺伝子または遺伝子座からの配列の増幅に有用な核酸プライマーは、該遺伝子座の標的領域に隣接するMARK 1 遺伝子座の一部に特異的にハイブリダイズ可能であり、該標的領域は、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を患う特定の個人において変化している。該標的領域の例を表1に示している。

#### 【0073】

表1において特定されているSNPを含むMARK 1 標的領域を増幅させるために使用

50

可能なプライマーは、配列番号：1の配列またはMARK1のゲノム配列に基づいて設計されうる。特定の一実施態様では、プライマーは配列番号：3-11の配列に基づいて設計されうる。

**【0074】**

本発明の別の特定の目的は、周辺領域を含めたMARK1遺伝子または遺伝子座からの配列の増幅に有用な核酸プライマーにある。該プライマーは、好ましくはMARK1遺伝子座内の核酸配列と相補的であり、特異的にハイブリダイズする。特定のプライマーは、該遺伝子座の標的領域に隣接するMARK1遺伝子座の一部と特異的にハイブリダイズ可能であり、該標的領域は、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を患う特定の個人において変化している。

10

**【0075】**

本発明は核酸プライマーとも関連しており、該プライマーは自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を患う特定の被験者において変化しているMARK1コード配列（例、遺伝子またはRNA）の一部と相補的であり、特異的にハイブリダイズする。この点について、本発明の特定のプライマーはMARK1遺伝子/RNAの変化した配列に特異的である。該プライマーを使用した増幅産物の検出は、MARK1遺伝子座における変化の存在を示す。対照的に、増幅産物の非存在は、検体中に特定の変化が存在しないことを示す。

**【0076】**

本発明の通常のプライマーは、約5~60ヌクレオチド長、好ましくは約8~25ヌクレオチド長の一本鎖核酸分子である。配列は、MARK1遺伝子座の配列に直接由来できる。高い特異性を保証するには、完全な相補性が好ましい。しかし、一定のミスマッチは許容できる。

20

**【0077】**

本発明は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の存在または素因の検出方法、または自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応の評価方法における上記の核酸プライマーまたは核酸プライマー対の使用とも関連している。

**【0078】****選択的ハイブリダイゼーション**

30

ハイブリダイゼーションの検出方法は、核酸配列の変化の検出に役立つ相補的な核酸配列間での特異的ハイブリッドの形成に基づいている。

**【0079】**

特定の検出方法には、野生型または変異MARK1遺伝子もしくはRNAに特異的な核酸プローブの使用、そしてその後のハイブリッドの存在の検出が含まれる。プローブは、浮遊状態にするか、もしくは基材または担体上に固定できる（核酸アレイまたはチップ技術など）。プローブは通常、標識付きで、ハイブリッドの検出を容易にする。

**【0080】**

この点について、本発明の特定の一実施態様は、被験者の検体を変化したMARK1遺伝子座に対して特異的な核酸プローブと接触させること、およびハイブリッド形成を評価することを含む。特に、好ましい一実施態様では、該方法は、検体を野生型MARK1遺伝子座および野生型MARK1遺伝子座の様々な変化型に対して特異的な一連のプローブと同時に接触させることを含む。この実施態様では、検体中のMARK1遺伝子座における様々な変化の存在を直接検出できる。また、様々な被験者の様々な検体を同時に処理できる。

40

**【0081】**

本発明の文脈中では、プローブは、MARK1遺伝子もしくはRNA（の標的部位）と相補的かつ特異的なハイブリダイゼーションが可能であり、また自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害に罹りやすくする、または関連するMARK1対立遺伝子と関連するポリヌクレオチド多型の検出に適したポリヌクレオチド配列を示す。プローブは好ましく

50

は M A R K 1 遺伝子、R N A、またはその標的部位と完全に相補的である。通常、プローブは、8 ~ 1, 0 0 0ヌクレオチド長、例えば1 0 ~ 8 0 0、より好ましくは1 5 ~ 7 0 0、通常は2 0 ~ 5 0 0ヌクレオチド長の一本鎖核酸を含んでいる。より長いプローブも使用可能であることを理解する必要がある。本発明の好ましいプローブは、8 ~ 5 0 0ヌクレオチド長の一本鎖核酸分子であり、これは変化を有するM A R K 1 遺伝子あるいはR N Aの領域に特異的にハイブリダイズできる。

#### 【0082】

本発明の具体的な一実施態様は、変化した(例、突然変異を起こした)M A R K 1 遺伝子あるいはR N Aに特異的な核酸プローブ、つまり該変化したM A R K 1 遺伝子あるいはR N Aに特異的に結合するが、該変化を欠くM A R K 1 遺伝子あるいはR N Aには基本的にハイブリダイズしない核酸プローブである。特異性とは、標的配列へのハイブリダイゼーションが、非特異的ハイブリダイゼーションによって生じるシグナルとは区別可能な特異的シグナルを生じることを示している。本発明に従ったプローブを設計するためには、完全に相補的な配列が好ましい。一方で、特異的シグナルが非特異的シグナルと区別可能である限り、ある程度のミスマッチは許容可能であることを理解する必要がある。

10

#### 【0083】

該プローブの特定例は、上記の表1に記載されている点突然変異を有するM A R K 1 遺伝子あるいはR N Aを含むゲノム領域の標的部位と相補的な核酸配列である。より特にプローブは、配列番号: 3 ~ 1 1、またはS N PまたはS N Pの相補的配列を含むその断片からなる群から選択される配列を含みうる。

20

#### 【0084】

該プローブの配列は、本出願において示されるM A R K 1 遺伝子およびR N Aの配列由来とすることができる。プローブの化学的変化の他、ヌクレオチドの置換も可能である。該化学的変化は、ハイブリッドの安定性の向上(例、挿入基)またはプローブの標識化のために実施できる。標識の典型例として放射能、蛍光、発光、酵素標識などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0085】

本発明は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の存在または素因の検出方法、または自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応の評価方法における上記の核酸プローブの使用にも関する。

30

#### 【0086】

特異的なリガンド結合

上記のとおり、M A R K 1 遺伝子座の変化は、M A R K 1 ポリペプチド配列または発現レベルにおける変化を検査することによっても検出可能である。この点において、本発明の具体的な一実施態様には、検体とM A R K 1 ポリペプチド特異的なリガンドとの接触および複合体の形成の決定が含まれる。

#### 【0087】

特異的抗体などの異なる種類のリガンドを使用可能である。具体的な一実施態様では、検体をM A R K 1 ポリペプチド特異的抗体と接触させて、免疫複合体の形成を判定する。E L I S A、ラジオイムノアッセイ(R I A)、免疫酵素アッセイ(I E M A)などの免疫複合体を検出するための様々な方法を使用可能である。

40

#### 【0088】

本発明の文脈中では、抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、そして実質的に同じ抗原特異性を有するこれらの断片または派生物を示す。断片には、F a b、F a b' 2、C D R領域などが含まれる。派生物には、一本鎖抗体、ヒト化抗体、多機能性抗体などが含まれる。

#### 【0089】

M A R K 1 ポリペプチドに特異的な抗体は、M A R K 1 ポリペプチドに選択的に結合する抗体、つまりM A R K 1 ポリペプチドまたはそのエピトープを含む断片に対して作成された抗体を示す。他の抗原に対して非特異的な結合も生じるが、標的であるM A R K 1 ポ

50

リペプチドに高い親和性で結合し、非特異的な結合とは確実に識別可能である。

【0090】

具体的な一実施態様では、該方法は、被験者からの検体を変異型 M A R K 1 ポリペプチドに対して特異的な抗体（でコーティングされた担体）と接触させること、および免疫複合体の存在を測定することからなる。特定の一実施態様では、野生型およびその様々な変化型のような M A R K 1 ポリペプチドの様々な形態に対して特異的な様々な抗体（でコーティングされた担体）と検体とを同時または並行して、または連続的に接触させることができる。

【0091】

本発明は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の存在または素因の検出方法、または自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の治療に対する被験者の反応の評価方法における上記のリガンド、好ましくは抗体、断片またはその派生物の使用にも関する。

【0092】

本発明は、被験者の検体における M A R K 1 遺伝子またはポリペプチド、M A R K 1 遺伝子またはポリペプチドの発現、および/または M A R K 1 活性における変化の存在を検出するための産物および試薬を含む診断キットにも関する。本発明に従った該診断キットは、本発明に記載のプライマー、プライマー対、核酸プローブおよび/またはリガンドを含む。本発明に従った該診断キットはさらにハイブリダイゼーション、増幅、抗原抗体免疫反応を実施するための試薬および/またはプロトコルをさらに含むことができる。

【0093】

診断方法は、インビトロ、エクスピボ、インピボ、好ましくはインビトロまたはエクスピボで実施可能である。これらにおいては、被験者の検体を用いて、M A R K 1 遺伝子座の状態を評価する。検体は、核酸またはポリペプチドを含む、被験者由来の任意の生物検体が可能である。該検体の例として、体液、組織、細胞検体、器官、生検などが挙げられる。最も好ましい検体は、血液、血漿、唾液、尿、精液などである。例えば胎児細胞や胎盤細胞の検査によって出生前診断を実施することも可能である。従来の方から従って検体を採取して、診断に直接使用するか、保存することが可能である。検査において核酸またはポリペプチドの利用性を与える、もしくは向上させるために、該方法の実施前に検体を処理可能である。処理としては、例えば溶解（例、機械的、物理的、化学的など）、遠心分離などが挙げられる。また、核酸および/またはポリペプチドを従来の方からで前精製または濃縮する、および/または複雑性を低減させることができる。核酸およびポリペプチドに酵素処理、もしくは他の化学的処理または物理的処理を施して、その断片を作成することもできる。請求の範囲に記載されている方法の高い感度を考慮すると、アッセイの実施にはごく微量の検体で十分である。

【0094】

示されたように、変化した M A R K 1 遺伝子座の存在を評価するために、好ましくはプローブ、プライマー、リガンドなどの試薬を検体と接触させる。プレート、チューブ、ウェル、ガラスなどの適当なデバイス内で接触させることができる。具体的な実施態様では、核酸アレイまたは特異的リガンドアレイなど、試薬でコーティングされた基材上で接触させることができる。該基材は、ガラス、プラスチック、ナイロン、紙、金属、ポリマーなどを含む任意の担体といった固形または半固形基材でありうる。基材は、スライド、メンブレン、ビーズ、カラム、ゲルなどの様々な形状および大きさでありうる。薬剤と検体の核酸またはポリペプチド間で複合体を形成するのに適した条件下で接触させることができる。

【0095】

検体中の変化した M A R K 1 ポリペプチド、R N A、D N A に関する知見は、被験者における変化した M A R K 1 遺伝子座の存在の指標であり、これは自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の存在、素因、または進行の段階と相関する可能性がある。例えば、生殖細胞系に M A R K 1 突然変異を有する個人では、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関

10

20

30

40

50

連の障害を発症するリスクが増大している。被験者における変化した M A R K 1 遺伝子座の存在の判定によって、より効果的で特別あつらえの、適切な治療的介入の計画が可能となる。また、発症前の段階でのこの判定によって、予防計画の適用が可能となる。

【 0 0 9 6 】

連鎖不平衡

第一の S N P が目的のゲノム領域内、より具体的には M A R K 1 遺伝子座内で同定されれば、通常の技量を有する専門家であれば、最初の S N P と連鎖不平衡にある追加の S N P を容易に同定可能である。実際に、自閉症または関連する障害と関連する第一の S N P と連鎖不平衡にある任意の S N P は、この特性と関連しうる。したがって、ひとたび任意の S N P と自閉症または関連する障害との関連が実証されれば、この特定領域内において S N P 密度を増すために、この特性と関連する追加の S N P を発見することが重要となる。

10

【 0 0 9 7 】

所定の S N P と連鎖不平衡にある追加の S N P の同定には、( a ) 複数の個人由来の第一の S N P を含む、もしくは第一の S N P の周辺のゲノム領域からの断片の増幅、( b ) 第一の該 S N P を含む、もしくは第一の S N P の周辺のゲノム領域内の第二の S N P の同定、( c ) 第一の S N P と第二の S N P 間での連鎖不平衡解析の実施、( d ) 第一の該マーカーと連鎖不平衡にあるものとしての第二の該 S N P の選択が含まれる。( b ) および( c ) の段階を含むサブコンビネーションも検討される。

20

【 0 0 9 8 】

S N P を同定して、連鎖不平衡解析を実施するための方法は、過度の実験もなく、周知の方法によって当業者によって実施可能である。

【 0 0 9 9 】

連鎖不平衡にあるこれらの S N P は、本発明に従った方法、特に本発明に従った診断方法においても使用可能である。

【 0 1 0 0 】

クローン病の連鎖遺伝子座は、染色体 5 q 3 1 上の 1 8 c M に及ぶ広範な領域にマッピングされている ( R i o u x ら , 2 0 0 0 a n d 2 0 0 1 ) 。領域全体に及ぶマイクロサテライトマーカーおよび S N P の高密度マップを利用して、連鎖不平衡 ( L D ) の有力な証拠が見出された。L D の証拠を発見したため、著者らは、超高密度 S N P マップを作成して、このマップから選択されたマーカーのより高密度な一群について研究した。多遺伝子座解析によって、T D T を利用してそれぞれ個別に関連付けられた複数の S N P を特徴とする単一の共通したリスクハプロタイプを明確にした。これらの S N P はリスクハプロタイプに固有であり、互いにほぼ完全な L D にあるために、本質的に情報の内容は同一である。これらの S N P の同等の特性によって、遺伝的証拠のみに基づいてこの領域内の原因となる突然変異の同定が可能となる。

30

【 0 1 0 1 】

原因となる突然変異

自閉症または関連する障害に關与する M A R K 1 遺伝子の突然変異は、自閉症または関連する障害を呈する患者と対照の個人由来の M A R K 1 遺伝子の配列を比較することで同定できる。M A R K 1 の S N P と自閉症または関連する障害との同定された関連に基づいて、同定された遺伝子座の突然変異をスキャンできる。好ましい一実施態様では、M A R K 1 遺伝子のエクソンおよびスプライシング部位、プロモーターなどの調節領域などの機能的領域の突然変異がスキャンされる。好ましくは、自閉症または関連する障害を呈する患者が、自閉症または関連する障害と関連することが示されている突然変異を有しており、対照の個人は自閉症または関連する障害と関連する突然変異または対立遺伝子を有していない。自閉症または関連する障害を呈する患者が、対照である個人よりも高い頻度で、自閉症または関連する障害と関連することが示される突然変異を有することもありうる。

40

【 0 1 0 2 】

該突然変異を検出するために使用される方法は、通常、以下の段階からなる：自閉症ま

50

たは関連する障害を呈する患者および対照である個人由来の M A R K 1 遺伝子の D N A 検体から、自閉症または関連する障害と関連する S N P または S N P 群を含む M A R K 1 遺伝子領域の増幅；増幅された領域の配列決定；自閉症または関連する障害を呈する患者および対照である個人由来の M A R K 1 遺伝子の D N A 配列の比較；自閉症または関連する障害を呈する患者に対して特異的な突然変異の決定。

【 0 1 0 3 】

したがって、M A R K 1 遺伝子の原因となる突然変異の同定は、過度の実験もなく、周知の方法によって当業者によって実施可能である。

【 0 1 0 4 】

例えば、原因となる突然変異は、以下の実施例において通常の方法を利用して同定されている。

【 0 1 0 5 】

H u g o t ら ( 2 0 0 1 ) は、ポジショナルクローニング戦略を適用して、過去にクローン病に対する感受性と関連していることが見出されている 1 6 番染色体の領域内においてクローン病への感受性の強い遺伝子変異体を同定した。潜在的な感受性の遺伝子座の位置を狭めるために、2 6 種のマイクロサテライトマーカーについて遺伝子型を特定して、伝達不平衡試験 ( t r a n s m i s s i o n d i s e q u i l i b r i u m t e s t ) を利用してクローン病との関連を調べた。マイクロサテライトマーカー D 1 6 S 1 3 6 の 1 つの対立遺伝子間においてボーダーライン上の有意な関連性 ( b o r d e r l i n e s i g n i f i c a n t a s s o c i a t i o n ) が発見された。周辺領域から 1 1 種の追加の S N P を選択して、数種の S N P が有意な関連性を示した。

【 0 1 0 6 】

N O D 2 / C A R D 1 5 遺伝子の単一のエクソン内にこの領域由来の S N P 5 - 8 が存在することが発見されており、非同義変異であることが示されている。これによって、著者らによる 5 0 C D 患者におけるこの遺伝子の完全コード配列の配列決定が促された。さらに 2 つの非同義変異 ( S N P 1 2 および S N P 1 3 ) が見出された。家系伝達不平衡試験 ( p e d i g r e e t r a n s m i s s i o n d i s e q u i l i b r i u m t e s t ) を利用して、S N P 1 3 が最も有意に関連していた (  $p = 6 \times 10^{-6}$  )。別の独立した研究では、4 人の対照と比較して、1 2 人の罹患者由来のこの遺伝子のコード領域の配列決定によっても同じ変異が発見された ( O g u r a ら , 2 0 0 1 )。S N P 1 3 の稀な対立遺伝子は、N O D 2 / C A R D 1 5 タンパク質を断片にすることが予測される 1 b p の挿入と一致した。この対立遺伝子は、対照と比較して頻度はかなり低いものの、健常な個人にも存在していた。

【 0 1 0 7 】

同様に、L e s a g e ら ( 2 0 0 2 ) は、散发性症例 1 6 6 例および家族性症例 2 8 7 例を含む C D 患者 4 5 3 例、潰瘍性大腸炎 ( C D ) 患者 1 5 9 例、健常な対照患者 1 0 3 例において、コード領域の系統的配列決定によって C A R D 1 5 の突然変異解析を実施した。同定された 6 7 の配列変異の内、C D 患者における対立遺伝子頻度は  $> 5 \%$  であった。これらの内 6 例は多型と考えられ、3 つ ( S N P 1 2 - R 7 0 2 W、S N P 8 - G 9 0 8 R、S N P 1 3 - 1 0 0 7 f s ) は C D の感受性と独立して関連していることが確認された。2 7 の稀な突然変異も潜在的な疾患の原因となる突然変異 ( D C M : d i s e a s e - c a u s i n g m u t a t i o n ) と見なされた。3 つの主な変異 ( R 7 0 2 W、G 9 0 8 R、1 0 0 7 f s ) は、全ての C D 突然変異のそれぞれ 3 2 %、1 8 %、3 1 % を示していたが、合計 2 7 の稀な突然変異は D C M の 1 9 % を示していた。全体で、突然変異の 9 3 % は、遺伝子の 3 番目の末端に位置していた。U C と関連する突然変異は発見されなかった。対照的に、二重突然変異を有する 1 7 % を含め、C D 患者の 5 0 % は少なくとも 1 つの D C M を有していた。

【 0 1 0 8 】

薬剤スクリーニング

本発明は、新しい標的および薬剤候補又はリード ( l e a d ) のスクリーニング方法も提供

10

20

30

40

50

する。方法には、結合解析および/または機能解析が含まれ、インビトロ、細胞系、動物などにおいて実施できる。

【0109】

本発明の特定の目的は、生物活性化合物の選択方法にあり、該方法は、試験化合物を本発明のMARK1遺伝子またはポリペプチドとインビトロで接触させること、および該試験化合物と該MARK1遺伝子またはポリペプチドとの結合能を測定することからなる。該遺伝子またはポリペプチドとの結合は、化合物が該標的の活性を調節して、ひいては被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を招く経路に影響を及ぼす能力に関する指標となる。好ましい一実施態様では、方法は、試験化合物を本発明に従ったMARK1ポリペプチドまたはその断片とインビトロで接触させること、および該試験化合物が該MARK1ポリペプチドまたは断片と結合する能力を測定することからなる。該断片は好ましくは、該MARK1ポリペプチドの結合部位を含む。好ましくは、該MARK1遺伝子またはポリペプチドまたはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1遺伝子またはポリペプチドまたはその断片である。

10

【0110】

本発明の特定の目的は、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害に対して活性を有する化合物の選択方法にあり、該方法は、試験化合物を本発明のMARK1ポリペプチドまたは結合部位を含むその断片とインビトロで接触させること、および該試験化合物が該MARK1ポリペプチドまたはその断片と結合する能力を測定することからなる。好ましくは、該MARK1ポリペプチドまたはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1ポリペプチドまたはその断片である。

20

【0111】

別の特定のー実施態様では、方法は、本発明に従ったMARK1ポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞を試験化合物と接触させること、および該試験化合物が該MARK1に結合してMARK1ポリペプチドの活性を調節する能力を測定することからなる。好ましくは、該MARK1ポリペプチドまたはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1ポリペプチドまたはその断片である。

【0112】

試験化合物の標識化、標識済み対照リガンドとの競合など、様々な方法を利用して結合を測定可能である。

30

【0113】

本発明の別の目的は、生物活性化合物の選択方法にあり、該方法は、試験化合物を本発明のMARK1ポリペプチドとインビトロで接触させること、および該試験化合物が該MARK1ポリペプチドの活性を調節する能力を測定することからなる。好ましくは、該MARK1ポリペプチドまたはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1ポリペプチドまたはその断片である。

【0114】

本発明の別の目的は、生物活性化合物の選択方法にあり、該方法は、試験化合物を本発明のMARK1遺伝子とインビトロで接触させること、および該試験化合物が該MARK1ポリペプチドの発現を調節する能力を測定することからなる。好ましくは、該MARK1遺伝子またはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1遺伝子またはその断片である。

40

【0115】

別のー実施態様では、本発明は、活性のある化合物、特に自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害に対して活性を有する化合物のスクリーニング、選択、同定の方法と関連しており、該方法は、試験化合物をレポーター構築物を含む組み換え宿主細胞と接触させること、ここで該レポーター構築物はMARK1遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含む、およびレポーター遺伝子の発現を調節する（例えば、促進または減少させる）試験化合物を選択することからなる。好ましくは、該MARK1遺伝子プロモーターまたはその断片は、変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1遺伝

50

子またはその断片である。

【0116】

スクリーニング方法の特定の一実施態様では、調節は抑制である。スクリーニング方法の別の特定の一実施態様では、調節は活性化である。

【0117】

上記のスクリーニングアッセイは、プレート、チューブ、ディッシュ、フラスコなどの適当な機器内において実施可能である。通常、アッセイはマルチウェルプレート内で実施する。数種の試験化合物を同時にアッセイ可能である。さらに、試験化合物の由来、性質、組成は多様でありうる。分離された、もしくは他の物質との混合での、脂質、ペプチド、ポリペプチド、核酸、小分子などの有機物質または無機物質でありうる。化合物は、例えば産物の組み合わせライブラリーの全体または一部でありうる。

10

【0118】

薬学的組成物、治療

本発明の別の目的は、(i) MARK 1 ポリペプチドまたはその断片、MARK 1 ペプチドまたはその断片をコードする核酸、上記のベクターまたは組み換え宿主細胞、および(ii) 医薬的に許容可能な担体または賦形剤を含む医薬的組成物である。

【0119】

本発明は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を治療または予防する方法とも関連しており、該方法は機能的(例、野生型) MARK 1 ポリペプチドまたはこれをコード化する核酸の該被験者への投与を含む。

20

【0120】

本発明の別の実施態様は、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害を治療または予防する方法にあり、該方法は、本発明に従った MARK 1 遺伝子またはタンパク質の発現または活性を調節する、好ましくは活性化または模倣する化合物の該被験者への投与を含む。該化合物は、MARK 1 のアゴニストまたはアンタゴニスト、MARK 1 のアンチセンスまたは RNAi、本発明に従った MARK 1 ポリペプチドに対して特異的な抗体または断片またはその派生物が可能である。該方法の特定の一実施態様では、調節は抑制である。該方法の別の特定の一実施態様では、調節は活性化である。

【0121】

本発明は概して、被験者における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の治療または予防のための医薬的組成物の製造における、機能的な MARK 1 ポリペプチド、これをコード化する核酸、本発明に従った MARK 1 遺伝子またはタンパク質の発現または活性を調節する化合物の使用とも関連している。該化合物は、MARK 1 のアゴニストまたはアンタゴニスト、MARK 1 のアンチセンスまたは RNAi、本発明に従った MARK 1 ポリペプチドに対して特異的な抗体または断片またはその派生物が可能である。該方法の特定の一実施態様では、調節は抑制である。該方法の別の特定の一実施態様では、調節は活性化である。

30

【0122】

本発明によって、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害と MARK 1 遺伝子座との相関が実証される。このように、本発明によって治療的診断の新しい標的を提供される。被験者、特に変化した MARK 1 遺伝子座を有する被験者における MARK 1 の活性または機能を回復または調節するための様々なアプローチを検討可能である。野生型の機能を該被験者に与えることで、病的な細胞または生物における自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の表現型の発現が抑制されることが期待される。該機能の供給は、遺伝子またはタンパク質治療、または MARK 1 ポリペプチドの活性を調節または模倣する化合物(例、上記のスクリーニングアッセイにおいて同定されたアゴニスト)の投与によって達成可能である。

40

【0123】

上記のベクターを利用して、野生型 MARK 1 遺伝子またはその機能的部分を、これらを必要としている被験者の細胞内に導入可能である。ベクターはウイルスベクターまたは

50

プラスミドでありうる。該遺伝子を裸のDNAとしても導入可能である。受容者の宿主細胞のゲノム内に取り込ませる、もしくは染色体外に残存させるように、該遺伝子を供給可能である。組み込みは、相同組み換えなどによって、ランダムに、または正確に定められた部位で生じうる。特に、相同組み換えによる細胞内の変化したバージョンとの置換で機能的MARK1遺伝子のコピーを挿入可能である。別の方法として、遺伝子銃、リボソーム媒介のトランスフェクション、陽イオン性脂質媒介のトランスフェクションなどが挙げられる。遺伝子治療は、直接の遺伝子注入、または機能的なMARK1ポリペプチドを発現するエクスピボで改変された遺伝子組み換え細胞の投与によって達成可能である。

【0124】

MARK1活性を伴う他の分子（例、ペプチド、薬剤、MARK1アゴニスト、有機化合物）を使用して、被験者における機能的なMARK1活性を回復させる、もしくは細胞内の有害な表現型を抑制させることが可能である。

10

【0125】

細胞内での機能的なMARK1遺伝子の機能の回復を利用して、自閉症、自閉症領域障害、自閉症関連の障害の発症を予防する、もしくは該疾患の進行を低下させることが可能である。該治療は、細胞、特に有害対立遺伝子を有する細胞の自閉症と関連する表現型を抑制可能である。

【0126】

本発明の別の態様および利点は、以下の実験の項で開示されており、これらは実例として見なすべきであり、本出願の範囲を限定しない。

20

【0127】

遺伝子、ベクター、組み換え細胞、ポリペプチド

本発明の別の態様は、診断、治療、スクリーニングに使用される新しい産物にある。これらの産物には、MARK1ポリペプチドまたはその断片をコード化する核酸分子、これらを含むベクター、組み換え宿主細胞、発現ポリペプチドを含む。

【0128】

より特に、本発明は、該変化または突然変異を含む、変化または突然変異MARK1遺伝子またはその断片と関連する。本発明は、該変化または突然変異を含む、変化または突然変異MARK1ポリペプチドまたはその断片をコード化する核酸分子とも関連する。該変化または突然変異によってMARK1の活性が修飾される。修飾された活性は増加又は減少してもよい。本発明はさらに、該変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1遺伝子またはその断片、もしくは該変化または突然変異を含む変化または突然変異MARK1ポリペプチドまたはその断片をコード化する核酸分子を含むベクター、組み換え宿主細胞、発現ポリペプチドに関連している。

30

【0129】

本発明の別の目的は、本発明に従ったMARK1ポリペプチドをコード化する核酸を含むベクターである。該ベクターとして、クローニングベクター、より好ましくは発現ベクター、つまりコンピテント宿主細胞内の該ベクターからMARK1ポリペプチドを発現させる調節配列を含むベクターが可能である。

【0130】

これらのベクターを使用して、インビトロ、エクスピボ、インピボでのMARK1ポリペプチドの発現、トランスジェニックまたは「ノックアウト」動物の作成、核酸の増幅、アンチセンスRNAの発現などが可能となる。

40

【0131】

本発明のベクターは通常、調節配列（例、プロモーター、ポリAなど）と作動的に連結された、本発明に従ったMARK1コード配列を含む。「作動的に連結された（operably linked）」という用語は、コード配列および調節配列が機能的に関連しており、該調節配列がコード配列の発現（例、転写）を起こすことを示す。ベクターはさらに1個または数個の複製起点および/または選択マーカを含みうる。プロモーター領域は、コード配列に関してホモ接合性またはヘテロ接合性であり、インピボでの使用を含

50

め、適当な任意の宿主細胞内において普遍的かつ構成的な、調節された、および/または組織特異的発現をもたらす。プロモーターの例として、細菌プロモーター（T7、pTAC、Trpプロモーターなど）、ウイルスプロモーター（LTR、TK、CMV-IEなど）、哺乳動物遺伝子のプロモーター（アルブミン、PGKなど）などが挙げられる。

#### 【0132】

ベクターは、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、BAC、YACなどが可能である。プラスミドベクターは、pBluescript、pUC、pBRなどの市販のベクターから調製可能である。ウイルスベクターは、周知の組み換えDNA技術に従って、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAVなどから作成可能である。

10

#### 【0133】

この点について、本発明の特別な目的は、先に定義されているMARK1ポリペプチドをコードする組み換えウイルスにある。組み換えウイルスは、好ましくは複製能を欠いており、さらに好ましくは、E1および/またはE4欠損アデノウイルス、Gag、polおよび/またはenv欠損レトロウイルス、Repおよび/またはCap欠損AAVから選択される。該組み換えウイルスは、パッケージング細胞へのトランスフェクション、またはヘルパープラスミドまたはウイルスの一過性トランスフェクションなどの周知の技術によって作成可能である。ウイルスのパッケージング細胞の典型例として、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv+細胞、293細胞などが挙げられる。複製能を欠損した該組み換えウイルスの作成のための詳細なプロトコールは、例えば国際公開広報第95/14785号、国際公開広報第96/22378号、米国特許第5,882,877号、米国特許第6,013,516号、米国特許第4,861,719号、米国特許第5,278,056号、国際公開広報第94/19478号において見ることができる。

20

#### 【0134】

本発明の別の目的は、先の定義されている組み換えMARK1遺伝子またはベクターを含む組み換え宿主細胞にある。適当な宿主細胞として、原核生物細胞（細菌など）および真核生物細胞（酵母細胞、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞など）が挙げられるが、これらに限定されない。具体例として、哺乳動物の初代培養細胞または確立された培養細胞（例、繊維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞などから作成）の他、大腸菌、KluyveromycesまたはSaccharomyces酵母、哺乳動物細胞株（例、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞など）が挙げられる。

30

#### 【0135】

本発明は、本発明に従ったMARK1ポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞の作成方法とも関連しており、該方法には、(i)コンピテント細胞への上記の核酸またはベクターのインピトロまたはエキスピボでの導入、(ii)得られた組み換え宿主細胞の培養、(iii)場合により、MARK1プロペプチドを発現する細胞の選択を含む。

#### 【0136】

該組み換え宿主細胞は、下記のとおり、活性分子のスクリーニングの他、MARK1ポリペプチドの生産に使用可能である。該細胞は、自閉症を研究するためのモデル系としても使用可能である。これらの細胞は、適当な培養器（プレート、フラスコ、ディッシュ、チューブ、ポーチなど）内で、DMEM、RPMI、HAMなどの適当な培地で維持可能である。

40

#### 【0137】

実施例

1. 1番染色体の感受性遺伝子を同定するためのGenomeHIPプラットフォーム  
自閉症の感受性遺伝子を迅速に同定を可能とするために、GenomeHIPプラットフォームを適用した。

#### 【0138】

簡単に説明すると、該技術は、関係する個人でのDNAの対形成を含む。各DNAを特

50

異的標識で印を付けて、同定可能にする。次に、2つのDNA間でハイブリッドを形成させる。次に、特定のプロセス（国際公開広報00/53802）を適用して、複数段階の手順で2つのDNAから同祖的（identical-by-descent（IBD））な全ての断片を選択する。次に、IBDフラクションの染色体上のポジショニングを可能にするBACクローン由来のDNAマイクロアレイに対して、残りのIBD濃縮DNAをスコアリングする。

【0139】

多くの異なる家族にこのプロセスを適用することで、各家族由来の各対についてIBDフラクションのマトリクスがもたらされる。次に、統計解析によって、被験家族間で共有される最小IBD領域が計算される。有意な結果（p値）は、目的の特性（自閉症）を伴う陽性領域での連鎖の証拠である。有意なp値を示す最も遠い2つのクローンによって連鎖間隔の範囲を定めることが可能である。

10

【0140】

今回の研究では、厳密な自閉症（ADI-Rにより定義）と一致する米国の114の家族（独立した114の血縁者組）が、GenomeHIPプロセスを受けた。次に、結果として得られたIBD濃縮DNAフラクションをCy5蛍光色素で標識して、平均間隔1.2Mbpのヒトゲノム全体をカバーする2,263個のBACクローンからなるDNAアレイに対してハイブリダイズさせた。Cy3標識された非選択DNAを使用して、各クローンのシグナル値を標準化し、比率を計算した。次に、比率結果のクラスタリングを実施して、各クローンおよび対になったクローンのIBD状態を判定した。

20

【0141】

この手順を適用することで、自閉症との連鎖に関する有意な証拠（ $p = 1.2 \times 10^{-5}$ ）を示したBACクローン（BACA26ZG11）を同定した。連鎖の有意な証拠を示すBACクローンの近位および遠位のクローンによって特徴づけられる連鎖領域は1番染色体上の約5.85メガ塩基に及んでいた（塩基217176539～223029765）。

【0142】

表2：MARK1遺伝子座内の1番染色体に関する連鎖結果：連鎖の証拠を示すBACクローンと一致する領域が示されている。クローンの開始及び停止位置は、染色体の開始位置（p-ter）に関するNCBI Build34に基づくゲノム位置と一致する。

30

【0143】

【表2】

表2

ヒト染色体	クローン	開始	停止	情報を与える対の割合	p値
1	BACA4ZA02v	217176263	217176539	0.91	0.013
1	BACA26ZG11v	220982905	220983030	0.70	1.2e-05
1	BACA14ZD03v	223029765	223030144	0.70	0.074

40

【0144】

2. 1番染色体上の自閉症感受性遺伝子の同定

連鎖している染色体領域内の上記の5.85メガ塩基をスクリーニングすることで、自閉症および関連する表現型の候補として、MAP/微小細管親和性調節キナーゼ1遺伝子を同定した。この遺伝子は実際に重要な間隔内に存在しており、上にまとめられたクローンによって範囲を定められた連鎖が証拠である。

【0145】

MARK1遺伝子は、NP\_061120（mRNA NM\_018650, 4638bp）の推定758アミノ酸のポリペプチドをコード化しており、ゲノム配列の135.7kbにわたって広がっている。この遺伝子によってコード化されるタンパク質は、微小

50

管関連タンパク質 (MAP) をリン酸化して、微小管の破壊を引き起こすタンパク質キナーゼ群の一員である。

【0146】

MARKは、微小管結合ドメインにおいて微小管関連タンパク質tau、MAP2、MAP4をリン酸化して、それらの微小管からの解離および微小管ダイナミクスの増大を起こす(Drewesら, 1997)。細胞内でのMARK過剰発現はKXGSモチーフ上のMAPの過剰リン酸化および微小管配列の破壊につながり、形態変化および細胞死を引き起こす。

【0147】

脳内で発現している大型タンパク質をコード化する配列を探索することで、Nagaseら(2000)はMARK1をコード化する部分的cDNAを同定して、KIAA1477と名付けた。RT-PCR解析によって、睾丸と脳に偏在する最高レベルの発現を検出した。脳内では、海馬で最高レベルを検出した。

【0148】

Mandelkowら(2004)は、細胞極性をもたらすこと、およびアルツハイマー病神経変性中のtauタンパク質をリン酸化することへの関与が知られているキナーゼの一群であるMARK/PAR1キナーゼが、微小管依存性の軸索輸送の調節因子であることを報告した。

【0149】

興味深いことに、フィンランドの集団における統合失調症に関する連鎖解析によって、同定された自閉症感受性遺伝子座のすぐ近傍の遺伝子座との連鎖の証拠が得られており、同じ遺伝子が2つの疾患に関与する可能性を示している。この研究では、遺伝子型決定の結果を、フィンランドの隔離された内陸部出身の家族と、フィンランドの他の残りの地域出身の家族について別々に、および全家族を一緒にして解析している(Ekelundら, 2001)。総合した検体(Z(max)2.71)および隔離された内陸部外出身の核家族(Z(max)3.21)においてD1S2709(位置: 229065355-229065645)について連鎖の証拠が得られた。

【0150】

まとめると、本出願において提供された、軸索内輸送に関与する、1番染色体上の自閉症と関連する遺伝子変化の重要な間隔でヒトのMARK1遺伝子を同定している連鎖結果から、MARK1遺伝子変化またはその調節配列の変化(例、突然変異および/または多型)がヒトでの自閉症発症の一因となっており、診断または治療的診断の新しい標的が示されると結論付けた。

【0151】

3. 関連研究

連鎖研究において使用された同じ家族を、問題になっている特定の表現型(本明細書の自閉症)と伝達不平衡試験(TDT: Transmission Disequilibrium Test)を利用する特定マーカーの対立遺伝子を含む遺伝子マーカー対立遺伝子またはハプロタイプとの間の関連研究にも使用した。TDTは被験体における集団階層化が問題とならないため、強力な関連研究である。簡単に説明すると、ヘテロ接合性の両親から罹患した子供への対立遺伝子の分離について試験した。伝達されない対立遺伝子と比べた、罹患した子供へ伝達された対立遺伝子の一部を、ランダム分布下において予測される比率と比較した。予測値を超える有意に過剰の対立遺伝子の伝達は、各対立遺伝子またはハプロタイプと試験した自閉症の表現型とが関連する証拠である。

【0152】

この解析での結果によって、MARK1遺伝子の特定の対立遺伝子が自閉症と正に関連しており、ひいては疾患に対する感受性を高めることが示されている。被験集団において、SNP13の対立遺伝子Gは、TDTによって判定された自閉症と相関している(p値0.011)。対照的に、SNP13の対立遺伝子Aの自閉症患者への伝達は有意に低く、この対立遺伝子が該疾患から守る手助けとなることを示している。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 5 3 】

対立遺伝子の自閉症患者への伝達の例を表 3 に示している。

## 【 0 1 5 4 】

## 【 表 3 】

表 3

SNP	対立遺伝子	肥満患者に 伝達される 対立遺伝子 (N)	肥満患者に 伝達されない 対立遺伝子 (N)	p値
SNP13	1	55	85	0.01123
SNP13	2	85	55	0.01123

10

## 【 0 1 5 5 】

また、SNP 9、SNP 10、SNP 11、SNP 12、SNP 28、SNP 50、SNP 90 のハプロタイプを構築して、全ての SNP の段階を同定した。

## 【 0 1 5 6 】

被験集団におけるこの解析での結果によって、SNP 12 の対立遺伝子 2 ( T ) の存在を特徴とする全ての特定ハプロタイプが自閉症と有意に関連しており、対立遺伝子 1 ( A ) を欠く特定ハプロタイプが選択的に自閉症患者に伝達されないことが示された。一例は、SNP 12 - SNP 90 におけるハプロタイプ 2 - 2 ( T - T ) である (  $p = 0.003484$  )。SNP 12 において対立遺伝子 G の代わりに対立遺伝子 A を有するハプロタイプは、自閉症患者において低く示されるという有意な証拠を示している。一例は、SNP 10 - SNP 11 - SNP 12 におけるハプロタイプ 2 - 2 - 1 ( G - G - A ) である (  $p = 0.00165$  )。

20

## 【 0 1 5 7 】

自閉症患者に選択的に伝達されるハプロタイプおよび伝達されないハプロタイプの例を表 4 に示している。

## 【 0 1 5 8 】

## 【 表 4 】

表 4

ハプロタイプの構築に使用された SNP	ハプロタイプを構成する対立遺伝子	自閉症患者に伝達されたハプロタイプの頻度	自閉症患者に伝達されなかったハプロタイプの頻度	p値
9-12	1-2	0.6334	0.5145	0.0258
12-28	1-2	0.2007	0.3309	0.01056
12-31	1-2	0.04656	0.132	0.00748
12-31	2-1	0.5984	0.4858	0.03895
12-90	1-1	0.1536	0.2344	0.04171
12-90	2-2	0.3201	0.1754	0.003484
10-11-12	1-1-2	0.7374	0.6421	0.05553
10-11-12	2-2-1	0.14	0.2817	0.00165

40

## 【 0 1 5 9 】

## 【表 5】

## 参考文献

Asperger (1944) Die autistischen Psychopathen im Kindesalter. *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten*, 2:217-250.

Bailey A, Le Couteur A, Gottesman I, et al. (1995) Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med*, 25:63-77. 10

Bailey A, Phillips W, Rutter M (1996) Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. *J Child Psychol Psychiatry* 37(1):89-126.

Baird G, Charman T, Baron-Cohen S et al. (2000) A screening instrument for autism at 18 months of age: a 6-year follow-up study. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 39(6):694-702. 20

Burger R and Warren R (1998) Possible immunogenetic basis for autism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 4:137-141.

Carney RM, Wolpert CM, Ravan SA et al. (2003) Identification of MeCP2 mutations in a series of females with autistic disorder. *Pediatr Neurol*, 28(3):205-211. 30

Chakrabarti S and Fombonne E (2001) Pervasive developmental disorders in preschool children. *JAMA*, 285(24):3093-9

Comi AM, Zimmerman AW, Frye VH et al. (1999) Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol*, 14(6):388-394. 40

Connolly AM, Chez MG, Pestronk A et al. (1999) Serum autoantibodies to brain in Landau-Kleffner variant, autism, and other neurologic disorders. *J Pediatr*, 134(5):607-613.

Drewes G, Ebner A, Preuss U et al. (1997) MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*, 89: 297-308.

Ekelund J, Hovatta I, Parker A et al. (2001) Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families. *Hum Mol Genet*, 10(15):1611-1617.

10

Folstein S and Rutter M (1977) Infantile autism: a genetic study of 21 twin pairs. *J Child Psychol Psychiatry Allied Disciplines*, 18:297-321.

Folstein SE and Rosen-Sheidley BR (2001) Genetics of autism: complex aetiology for a heterogeneous disorder. *Nat Rev Genet*, 2:943-955.

Gillberg C (1998) Chromosomal disorders and autism. *J Autism Dev Disord*, 28(5):415-425.

20

Gillberg C and Coleman M (2000) *The biology of the autistic syndromes*, 3<sup>rd</sup> edn London: MacKeith Press.

Gillberg C and Wing L (1999) Autism: not an extremely rare disorder. *Acta Psychiatr Scand*, 99:339-406.

30

Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):599-603.

Jamain S, Quach H, Betancur C et al. (2003) Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet*, 34(1):27-29.

40

Jorde LB, Hasstedt SJ, Ritvo ER et al. (1991) Complex segregation analysis of autism. *Am J Hum Genet*, 49(5):932-938.

Jorde LB, Mason-Brothers A, Waldmann R et al. (1990) The UCLA-University of Utah epidemiologic survey of autism: genealogical analysis of familial aggregation. *Am J Med Genet*, 36(1):85-88.

Kanner L (1943) Autistic disturbances of affective contact. *Nervous Child*, 2:217-250.

Lander E and Kruglyak L (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet*, 11(3):241-247. 10

Le Couteur A, Rutter M, Lord C et al. (1989) Autism diagnostic interview: a standardized investigator-based instrument. *J Autism Dev Disord*, 19(3):363-387.

Lesage S, Zouali H, Cezard Jpet al. (2002) CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet*. 70(4):845-857. 20

Lord C, Rutter M, Le Couteur A (1994) Autism Diagnostic Interview-Revised: a revised version of a diagnostic interview for caregivers of individuals with possible pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord*, 24(5):659-685.

Mandelkow EM, Thies E, Trinczek B, et al. (2004) MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J Cell Biol*, 167(1):99-110. 30

Nagase T, Kikuno R, Ishikawa K et al. (2000) Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XVII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins in vitro. *DNA Res*, 7:143-150.

Nelson KB (1991) Prenatal and perinatal factors in the etiology of autism. *Pediatrics*, 87(5 Pt 2):761-766. 40

Ogura Y, Bonen DK, Inohara N (2001) A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 411(6837):603-606.

Rioux JD, Daly MJ, Silverberg MS et al. (2001) Genetic variation in the 5q31 cytokine gene cluster confers susceptibility to Crohn disease. *Nat Genet* 29(2): 223-228.

Rioux JD, Silverberg MS, Daly MJ (2000) Genomewide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. *Am J Hum Genet* 66(6):1863-1870. 10

Rodier P and Hyman S (1998) Early environmental factors in autism. *Mental Retard Dev Disord Res Rev*, 4:121-128.

Singh VK, Warren RP, Odell JD et al. (1993) Antibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. *Brain Behav Immun*, 7(1):97-103. 20

Smalley SL (1997) Genetic influences in childhood-onset psychiatric disorders: autism and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Am J Hum Genet*, 60(6):1276-1282.

Steffenburg S, Gillberg C, Hellgren L et al. (1989) A twin study of autism in Denmark, Finland, Iceland, Norway and Sweden. *J Child Psychol Psychiatry*, 30(3):405-416. 30

Szatmari P, Jones MB, Zwaigenbaum L et al. (1998) Genetics of autism: overview and new directions. *J Autism Dev Disord*, 28(5):351-368.

Weizman A, Weizman R, Szekely GA et al. (1982) Abnormal immune response to brain tissue antigen in the syndrome of autism. *Am J Psychiatry*, 139(11):1462-1465.

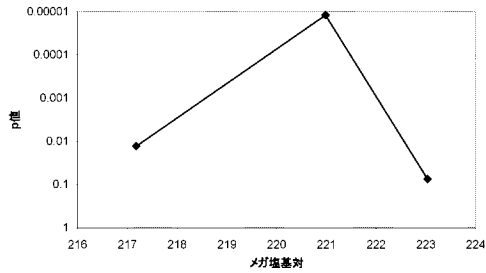
40

【図面の簡単な説明】

【0160】

【図1】 Genome Hybrid Identity Profiling (GenomeHIP) を利用した高密度マッピング。

【 図 1 】



## 【 配列表 】

2008532494000001.app

## 【 手続補正書 】

【 提出日 】平成19年10月18日(2007.10.18)

## 【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

## 【 請求項 1 】

被験者における自閉症または自閉症領域障害の存在または素因を検出するインビトロでの方法であって、該被験者からの検体において M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

## 【 請求項 2 】

被験者における自閉症または自閉症領域障害からの防御を検出するインビトロでの方法であって、該被験者からの検体において M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

## 【 請求項 3 】

自閉症または領域障害の治療に対する被験者の反応を評価するインビトロでの方法であって、該被験者からの検体において M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出することを含む方法。

## 【 請求項 4 】

自閉症または自閉症領域障害の治療に対する被験者の有害反応を評価するインビトロでの方法であって、該被験者からの検体において M A R K 1 遺伝子座の変化の存在を検出す

ることを含む方法。

【請求項 5】

M A R K 1 遺伝子座の変化の存在が、塩基配列決定、選択的ハイブリダイゼーション、および/または選択的増幅によって検出される、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 6】

該変化が自閉症と関連する 1 または複数の S N P または S N P のハプロタイプである、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

自閉症と関連する該ハプロタイプが、S N P 9、S N P 10、S N P 11、S N P 12、S N P 13、S N P 28、S N P 31、S N P 90 からなる群から選択される複数の S N P を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

自閉症と関連する該 S N P が S N P 13 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

自閉症または自閉症領域障害に対する生物学的活性化合物の選択方法であって、試験化合物を M A R K 1 ポリペプチドまたはその遺伝子ないしそれらの断片と接触させること、および M A R K 1 ポリペプチドまたは遺伝子ないしそれらの断片と結合する該試験化合物の能力を決定することを含む方法。

【請求項 10】

自閉症または自閉症領域障害に対する生物学的活性化合物の選択方法であって、M A R K 1 ポリペプチドを発現する組み換え宿主細胞を試験化合物と接触させること、および該 M A R K 1 ポリペプチドと結合するおよび M A R K 1 ポリペプチド活性を調節する該試験化合物の能力を決定することを含む方法。

【請求項 11】

自閉症または自閉症領域障害に対する生物学的活性化合物の選択方法であって、試験化合物を M A R K 1 遺伝子と接触させること、および該 M A R K 1 遺伝子の発現を調節する該試験化合物の能力を決定することを含む方法。

【請求項 12】

自閉症または自閉症領域障害に対する生物学的活性化合物の選択方法であって、試験化合物を、M A R K 1 遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を含むレポーター構築物を含む組み換え宿主細胞と接触させること、および該レポーター遺伝子の発現を調節する（例えば、促進または減少させる）試験化合物を選択することを含む方法。

【請求項 13】

該 M A R K 1 遺伝子またはそのポリペプチドまたはそれらの断片が、変化または突然変異 M A R K 1 遺伝子またはポリペプチド、または変化または突然変異を含むそれらの断片である、請求項 9 ~ 12 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

該調節が活性化である、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

該調節が抑制である、請求項 9 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/IB2006/000469
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, Sequence Search, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/010174 A (UNIVERSITY OF DUNDEE; HARDIE, DAVID, GRAHAME; ALESSI, DARIO; BOUDEAU,) 3 February 2005 (2005-02-03) pages 35-36; claims 30,33; sequences 143-147	1-17
X	THIES E ET AL: "P3-255 Mark/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons by phosphorylating tau protein" NEUROBIOLOGY OF AGING, TARRYTOWN, NY, US, vol. 25, July 2004 (2004-07), page S427, XP004626019 ISSN: 0197-4580 abstract	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 22 August 2006		Date of mailing of the international search report 08/09/2006
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 940-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 940-3018		Authorized officer Knudsen, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/IB2006/000469

G(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>CHIN JOANNA Y ET AL: "Microtubule-affinity regulating kinase (MARK) is tightly associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer brain: A fluorescence resonance energy transfer study" JOURNAL OF NEUROPATHOLOGY AND EXPERIMENTAL NEUROLOGY, vol. 59, no. 11, November 2000 (2000-11), pages 966-971, XP009071198 ISSN: 0022-3069 abstract page 969, right-hand column, paragraph 3</p>	1-9
A	<p>EKELUND J ET AL: "Chromosome 1 loci in Finnish schizophrenia families." HUMAN MOLECULAR GENETICS. 15 JUL 2001, vol. 10, no. 15, 15 July 2001 (2001-07-15), pages 1611-1617, XP002395541 ISSN: 0964-6906 the whole document</p>	1-17

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
PCT/IB2006/000469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005010174 A	03-02-2005	EP 1651673 A2	03-05-2006

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/14	(2006.01)	A 6 1 P 25/14	
A 6 1 P 25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/08	(2006.01)	A 6 1 P 25/08	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 3/00	(2006.01)	A 6 1 P 3/00	
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
A 6 1 K 38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02	
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53	M

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

(72)発明者 フィリッピ, アン  
フランス国、エフ - 7 7 3 1 0 サン・ファルゴール・ボンティエリー、レジダンス・デュ・ブリユール 8

(72)発明者 ルソー, フランシス  
フランス国、エフ - 9 1 3 0 0 サヴィニエ・スール・オルジェ、リュ・テオフィル・ゴージェ 1 1

(72)発明者 ロシュマン, エルケ  
ドイツ国、8 9 1 7 9 バイマーシュテッテン、シラーシュトラッセ 1 1

Fターム(参考) 2G045 AA25 DA13 FB01 FB02  
4B024 AA01 AA11 BA10 CA02 CA11 DA02 DA06 EA04 GA11 HA14  
HA17  
4B063 QA05 QA17 QA18 QA19 QQ06 QQ08 QQ13 QQ27 QQ43 QQ52  
QR07 QR32 QR56 QR57 QR62 QR75 QR77 QR80 QS25 QS34  
QS36 QX02  
4C084 AA01 AA02 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DC50 NA14  
ZA05 ZA06 ZA12 ZA15 ZA18 ZA22 ZB07 ZC21

专利名称(译)	使用人类孤独症易感基因编码激酶		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008532494A</a>	公开(公告)日	2008-08-21
申请号	JP2007555728	申请日	2006-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	英特盖根公司		
申请(专利权)人(译)	安特节吉恩		
[标]发明人	フィリッピアン ルソーフランシス ロシュマンエルケ		
发明人	フィリッピ,アン ルソー,フランシス ロシュマン,エルケ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/18 A61P37/02 A61P3/00 G01N33/15 G01N33/50 A61K38/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P3/00 A61P25/08 A61P25/14 A61P25/18 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/28 C12Q1/6883 C12Q2600/156 C12Q2600/158 C12Q2600/172		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12N15/00.A C12Q1/02 A61K45/00 A61P25/28 A61P25/14 A61P25/22 A61P25/24 A61P25/08 A61P25/18 A61P37/02 A61P3/00 G01N33/15.Z G01N33/50.Z A61K37/02 G01N33/53.M		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/DA13 2G045/FB01 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B024/HA17 4B063/QA05 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ08 4B063/QQ13 4B063/QQ27 4B063/QQ43 4B063/QQ52 4B063/QR07 4B063/QR32 4B063/QR56 4B063/QR57 4B063/QR62 4B063/QR75 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA05 4C084/ZA06 4C084/ZA12 4C084/ZA15 4C084/ZA18 4C084/ZA22 4C084/ZB07 4C084/ZC21		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
优先权	60/653502 2005-02-17 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了孤独症易感性基因的人类的鉴定，所述基因其它筛选药物活性剂，自闭症和相关病症，预防的诊断，可在治疗中是有用的。更具体地说，本发明中，MARK1和1号染色体上的特定等位基因与易感性孤独症有关的，表示公开了一种用于治疗性诊断的新的目标。本发明涉及MARK1基因内的特定突变和表达产物，以及基于这些突变的诊断工具和试剂盒。本发明，阿斯伯格综合征，广泛性发育障碍，智力低下，忧虑，抑郁症，注意力缺陷多动障碍，语音延迟，癫痫，代谢障碍，免疫功能紊乱，其他，如双相情感障碍和精神分裂症精神疾病和神经疾病的易感性的诊断，发现可以在预防和/或治疗中使用。

SNP の識別	dbSNP の参照	対立遺伝子 1	対立遺伝子 2	NCBI Build 34 に基づく 1 番染色体のゲノム配列 におけるヌクレオチドの 位置	遺伝子座における位置	配列番号
SNP9	rs10779402	A=1	G=2	217510465	5' of MARK1	3
SNP10	rs2589588	A=1	G=2	217776269	Intron of MARK1	4
SNP11	rs2786604	C=1	G=2	217820394	Intron of MARK1	5
SNP12	rs1193032	A=1	T=2	217852989	Intron of MARK1	6
SNP13	rs2889895	A=1	G=2	217884421	Intron of MARK1	7
SNP28	rs10495200	C=1	G=2	219956664	3' of MARK1	8
SNP31	rs2789910	G=1	T=2	220229321	MARK1 locus	9
SNP50	rs1499289	C=1	T=2	221747296	MARK1 locus	10
SNP90	rs2073489	C=1	T=2	224038302	MARK1 locus	11