

(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2014-506244

(P2014-506244A)

(43) 公表日 平成26年3月13日(2014.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/08 (2006.01)	C O 7 K 7/08 Z N A	4 C 0 8 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C 2 0 6
GO 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 O 1 A	4 H O 4 5
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18	
A61K 31/185 (2006.01)	A 6 1 K 31/185	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-544428 (P2013-544428)	(71) 出願人	513150753
(86) (22) 出願日	平成23年12月13日 (2011.12.13)		オーティズム バイオダイアグノスティック
(85) 翻訳文提出日	平成25年7月23日 (2013.7.23)		ク リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/SE2011/051504		英国 ロンドン セイント ジョン スト
(87) 国際公開番号	W02012/082056		リート 1 4 5 - 1 5 7
(87) 国際公開日	平成24年6月21日 (2012.6.21)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	1051330-7		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成22年12月16日 (2010.12.16)	(74) 代理人	100102118
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		弁理士 春名 雅夫
(31) 優先権主張番号	61/423, 636	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成22年12月16日 (2010.12.16)		弁理士 山口 裕孝
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
		(74) 代理人	100142929
			弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自閉症の診断、治療におけるバイオマーカーおよびその使用

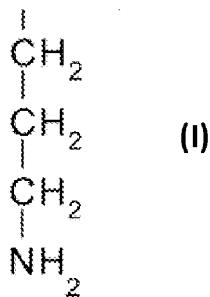
(57) 【要約】

本発明は、新規バイオマーカーである配列SSK1THRIHWESASLLR^{*}を有するペプチドを提供し、式中、アステリスクで示されるC末端のアルギニンの側鎖が、通常は側鎖に存在するNH2-C=NH分子を欠く。神経疾患および/または神経精神疾患(特に自閉症)の診断における本バイオマーカーの有用性が開示され、この新規バイオマーカーおよびこの新規バイオマーカーに対して向けられる抗体の濃度を測定するための方法も開示される。補体因子I阻害剤を対象に投与する工程を含む自閉症の治療も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列 $\text{NH}_2\text{-SSKITHRIHWESASLLR}^+\text{-COOH}$ (SEQ ID NO:1) を有するペプチドであって、 R^+ で示されるC末端残基が式(1)に表される側鎖を有する、ペプチド：



10

【請求項 2】

試料中の請求項1に基づくペプチドの有無および/または濃度を測定する工程を含む、分析方法。

【請求項 3】

試料が生体試料である、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

生体試料が、血液試料、血漿試料、ヘパリン加血漿試料、EDTA-血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料からなる群より選択される、請求項3記載の方法。

20

【請求項 5】

生体試料がヘパリン加血漿試料である、請求項4記載の方法。

【請求項 6】

測定する工程が、MALDI-TOF、SELDI-TOF、LC-MSもしくはLC-MS/MSなどの質量分析法に基づく方法を用いて、またはELISA、RIA、FIAもしくはDELFI Aなどの免疫化学的アッセイを用いて実施される、請求項2~5のいずれか一項記載の方法。

【請求項 7】

請求項1記載のペプチドに特異的な抗体。

30

【請求項 8】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体である、請求項7記載の抗体。

【請求項 9】

請求項1記載のペプチドおよび/または請求項7もしくは請求項8記載の抗体を含む、診断における使用のための製品パッケージ。

【請求項 10】

プロテアーゼ阻害剤；請求項1記載のペプチドの濃度を測定するための説明書；SEQ ID NO:2のペプチド；SEQ ID NO:3のペプチド；SEQ ID NO:2に特異的な抗体；SEQ ID NO:3に特異的な抗体の一つまたは複数をさらに含む、請求項9記載の製品パッケージ。

40

【請求項 11】

(a) 診断される対象からの試料を用意する工程；

(b) 該試料中の請求項1記載のペプチドの濃度を測定する工程；および

(c) 該濃度を、健常な対照者からの同様の試料中の請求項1記載のペプチドの濃度に基づく参照値と比較する工程

を含む、神経疾患または神経精神疾患の診断方法であって、

前記試料中の濃度が前記参照値よりも低いことが、神経疾患または神経精神疾患の存在を示唆する、方法。

【請求項 12】

(d) 前記試料中の

50

SSKITHRIHWESASLLR (SEQ ID NO: 3) および/または

SSKITHRIHWESASLL (SEQ ID NO: 2)

の配列を有するペプチドの濃度を測定する工程；および

(e) 該濃度を、健常な対照者からの同様の試料中の同一のペプチドの濃度に基づく参照値と比較する工程

をさらに含む、請求項11記載の方法であって、

前記試料中の濃度が前記参照値よりも高いことが、神経疾患もしくは神経精神疾患の存在を示唆する、請求項11記載の方法。 10

【請求項13】

濃度を測定する工程が請求項2～6のいずれか一項記載の方法によって実施される、請求項11～12のいずれか一項記載の方法。

【請求項14】

疾患が、自閉症、アスペルガー症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、統合失調症、うつ病および双極性障害から選択される、請求項11～13のいずれか一項記載の方法。

【請求項15】

疾患が自閉症である、請求項14記載の方法。 20

【請求項16】

診断方法における、請求項1記載のペプチドの使用。

【請求項17】

前記方法が自閉症の診断のためである、請求項16記載の使用。

【請求項18】

(a) 診断される対象からの試料を用意する工程；

(b) 該試料中の補体因子Iの活性のレベルを測定する工程；および

(c) 該活性を、健常な対照者からの同様の試料中の該補体因子Iの活性のレベルに基づく参照値と比較する工程

を含む、自閉症の診断方法であって、 30

前記試料中の活性が前記参照値よりも高いことが、前記対象における自閉症の存在を示唆する、方法。

【請求項19】

試料が、血液試料、血漿試料、ヘパリン加血漿試料、EDTA-血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料からなる群より選択される、請求項18記載の方法。

【請求項20】

請求項15記載の方法を実施する工程、および結果を統合する工程をさらに含む、請求項18または19記載の方法。

【請求項21】 40

請求項18または19記載の方法を実施する工程、および結果を統合する工程をさらに含む、請求項15記載の方法。

【請求項22】

それを必要とする対象に補体因子I阻害剤を投与する工程を含む、自閉症の治療方法。

【請求項23】

補体因子I阻害剤が、6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンスルホネート (FUT-175)、セルピン、ベンゼンスルホニルフルオリド、Pefabloc (登録商標) SC、スラミン、WAP型阻害剤、エラスターゼ特異的阻害剤 (エラフィン) から選択される、請求項22記載の方法。

【請求項24】 50

自閉症の治療用の薬剤の製造のための、補体因子I阻害剤の使用。

【請求項 2 5】

補体因子I阻害剤が、6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンスルホネート (FUT-175)、セルピン、ベンゼンスルホニルフルオリド、Pefabloc (登録商標) SC、スラミン、WAP型阻害剤、エラスターゼ特異的阻害剤 (エラフィン) から選択される、請求項24記載の使用。

【請求項 2 6】

自閉症の治療における使用のための補体因子I阻害剤。

【請求項 2 7】

6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンスルホネート (FUT-175)、セルピン、ベンゼンスルホニルフルオリド、Pefabloc (登録商標) SC、スラミン、WAP型阻害剤、エラスターゼ特異的阻害剤 (エラフィン) より選択される、請求項26記載の使用のための補体因子I阻害剤。

10

【請求項 2 8】

スラミンである、請求項26記載の使用のための補体因子I阻害剤。

【請求項 2 9】

FUT-175である、請求項26記載の使用のための補体因子I阻害剤。

【請求項 3 0】

エラフィンである、請求項26記載の使用のための補体因子I阻害剤。

【請求項 3 1】

20

(a) 治療に先立って、対象における請求項1記載のバイオマーカーのレベルのベースライン値を測定する工程；

(b) 評価される治療を該対象に施す工程；

(c) (b) に続いて、該対象における請求項1記載のバイオマーカーのレベルを測定する工程；ならびに

(d) (a) および (c) で得られたレベルを比較する工程を含む、対象における自閉症の治療の有効性を評価するための方法であって、請求項1記載のバイオマーカーのレベルの増加が、治療的応答を示唆する、方法。

【請求項 3 2】

(a) 治療に先立って、対象における補体因子I活性のレベルのベースライン値を測定する工程；

30

(b) 評価される治療を該対象に施す工程；

(c) (b) に続いて、該対象における補体因子I活性のレベルを測定する工程；ならびに

(d) (a) および (c) で得られたレベルを比較する工程を含む、対象における自閉症の治療の有効性を評価するための方法であって、該補体因子Iの活性の低下が、治療的応答を示唆する、方法。

【請求項 3 3】

請求項32記載の方法を実施する工程、および結果を統合する工程をさらに含む、請求項31記載の方法。

40

【請求項 3 4】

請求項31記載の方法を実施する工程、および結果を統合する工程をさらに含む、請求項32記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の技術分野

本発明は生体ペプチド、特に生体試料における生体ペプチドを分析するための方法、ならびに神経疾患および/または神経精神疾患、特に自閉症の診断に関連する方法に関する。本発明はさらに、自閉症の治療に関する。

50

【背景技術】

【0002】

発明の背景

医学の分野では、病理学的状態の診断または予後判定のためのおよび適用しようとする治療の有効性を評価するための新しい改善された生物学的マーカー（バイオマーカー）に対する一定の需要がある。一般的に、患者試料からのバイオマーカーの濃度は、統計学に関連して、病理学的状態の存在、重症度またはリスクの指標と見なされる。広く研究されたバイオマーカーのサブセットの一つは、血液、脳脊髄液または尿などの生体液中のペプチドである。生体試料中に存在する異なるペプチドの数は、分析の方法および試料のタイプに応じて、数十から数万まで多様である。従って、医学的に妥当性のある多くのペプチドバイオマーカーが未だに発見されていないことは明らかである。

10

【0003】

補体C3と呼ばれるヒトタンパク質は自然免疫系のよく研究された成分であり、相当な量の補体C3が血液中を循環する。古典的補体経路は典型的に、抗原：抗体複合体を活性のために必要とし（特異的免疫応答）、一方、代替のマンノース結合レクチン経路は、抗体の存在を伴うことなくC3加水分解または抗原によって活性化され得る（非特異的免疫反応）。3つの経路すべてにおいて、C3転換酵素は補体C3を開裂および活性化して、C3aおよびC3bを生成し、さらなる開裂および活性化のイベントのカスケードを惹起する。

【0004】

バイオマーカーとして有用な多くの補体C3ペプチドフラグメントが文献において公知である。例えば、WO/2004/079371（特許文献1）は自閉症の診断において有用なマーカーとして補体C3のペプチドフラグメントを開示する。別の例として、米国特許第20050048584A1号（特許文献2）は、補体C3に由来するペプチドバイオマーカーを用いてアルツハイマー病の検出およびアルツハイマー病を他の認知症と区別するための方法を開示する。

20

【0005】

自閉症は、世界中の子供の1000人中約2～5人、米国では恐らく1：110に至る程が冒される、様々な度合いの重症度を伴う神経精神疾患である。自閉症の病因は分かっていないが、遺伝的および環境的な要因の双方が一因であると考えられている。自閉症の診断には小児行動の専門家による評価が必要であり、診断が子供および家族に対してもたらす甚大な意味を考えると、確定診断を行うにはしばしば膨大な時間と労力を要する。従って、自閉症を診断するための、生物学的変数の客観的な測定値に基づく臨床アッセイには、大きな需要がある。

30

【0006】

自閉症の治療は、正の強化を用いた行動の訓練および管理、自助、ならびに行動およびコミュニケーションを改善するための社会的スキルの訓練を含む。応用行動療法（ABA）、自閉症および関連領域のコミュニケーションに障害をもつ子供たちの治療と教育（TEACH）、ならびに感覚統合を含む、複数の異なる治療セットが開発されている。特化された療法には、言語療法、作業療法および理学療法が含まれる。自閉症の標準的な内科的治療はないが、問題となる行動および症状は、抗うつ剤、抗精神病薬、抗痙攣剤およびメチルフェニデートなどの医薬で治療されることがある。しかしながら、疾患修飾性治療は存在しない。

40

【0007】

発明のいくつかの目的

このように、診断において有用な新しい生物学的マーカーを提供することが本発明の一つの目的である。例えば、診断目的のために、試料中、例えば、生体試料中の新規のマーカーの濃度を測定するための分析方法を提供することが、本発明のもう一つの目的である。さらに、特に自閉症、さらにはアスペルガー症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、統合失調症、うつ病および双極性障害などの神経疾患および/または神経精神疾患を診断するための生物学的マーカーに基づく新しい改善された方法を提供することも、本発明の一つの目的である。本発明のさらにもう一つの

50

目的は、単なる対症療法ではなく自閉症の疾患修飾性治療を提供することである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】WO/2004/079371

【特許文献2】米国特許第20050048584A1号

【発明の概要】

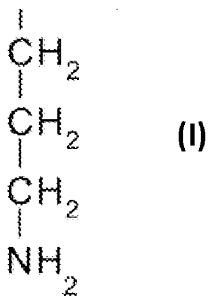
【0009】

第一の局面において、本発明はアミノ酸配列

NH₂-SSKITHRIHWESASLLR*-COOH (SEQ ID NO: 1)

10

を有するペプチドを提供し、式中、R'で示されるC末端残基は式(1)に示される通りの側鎖を有する：



20

【0010】

第二の局面において、試料中の第一の局面に基づくペプチドの有無および/または濃度を測定する工程を含む、分析方法が提供される。試料は好ましくは生体試料である。より好ましくは、生体試料は、血液試料、血漿試料、ヘパリン加血漿試料、EDTA-血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料からなる群より選択される。最も好ましくは、生体試料はヘパリン加血漿試料である。

30

【0011】

前記ペプチドの有無および/または濃度の測定は、MALDI-TOF、SELDI-TOF、LC-MS、もしくはLC-MS/MSなどの質量分析法に基づく方法を用いて、またはELISA、RIA、FIAもしくはDELFI Aなどの免疫化学的アッセイを用いて、実施することができる。

【0012】

第三の局面において、本発明は、第一の局面に基づくペプチドに特異的な抗体を提供する。本抗体はモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体であり得る。

【0013】

第四の局面において、第一の局面に基づくペプチドおよび/または第三の局面に基づく抗体を含む、診断における使用のための製品パッケージが提供される。本製品パッケージは、プロテアーゼ阻害剤；第一の局面のペプチドの濃度を測定するための説明書；SEQ ID NO:2のペプチド；SEQ ID NO:3のペプチド；SEQ ID NO:2に特異的な抗体；SEQ ID NO:3に特異的な抗体の一つまたは複数をさらに含み得る。

40

【0014】

第五の局面において、

- 診断される対象からの試料を用意するまたは得る工程；
- 該試料中の第一の局面のペプチドの濃度を測定する工程；および
- 該濃度を、健常な対照者からの同様の試料中の第一の局面のペプチドの濃度に基づく参照値と比較する工程

を含む、神経疾患または神経精神疾患の診断方法が提供され、

50

ここで、前記試料中の濃度が前記参照値よりも低いことが、神経疾患または神経精神疾患の存在を示唆する。

【0015】

第五の局面の方法は、

- 試料中の、配列：

SSKITHRIHWESASLLR (SEQ ID NO: 3) および/または

SSKITHRIHWESASLL (SEQ ID NO: 2)

を有するペプチドの濃度を測定する工程；ならびに

- 該濃度を、健常な対照者からの同様の試料中の同一のペプチドの濃度に基づく参照値と比較する工程

をさらに含み得、

ここで、前記試料中の濃度が前記参照値よりも高いことが、神経疾患または神経精神疾患の存在をさらに示唆する。

【0016】

第五の局面の方法において、濃度を測定する工程は第二の局面の方法を用いて実施してよい。

【0017】

第五の局面の神経疾患または神経精神疾患は、自閉症、アスペルガー症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、統合失調症、うつ病および双極性障害から選択され得る。最も好ましくは、前記疾患は自閉症である。

【0018】

第六の局面において、診断方法における、第一の局面に基づくペプチドの使用が提供される。好ましくは、前記ペプチドは、自閉症、アスペルガー症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、統合失調症、うつ病または双極性障害の診断において用いられる。最も好ましくは、前記ペプチドは自閉症の診断において用いられる。

【0019】

第七の局面において、

(a) 診断される対象からの試料を用意するまたは得る工程；

(b) 該試料中の補体因子Iの活性のレベルを測定する工程；および

(c) 該活性を、健常な対照者からの同様の試料中の補体因子Iの活性のレベルに基づく参照値と比較する工程

を含む、自閉症の診断方法が提供され、

ここで、前記試料中の活性が前記参照値よりも高いことが、対象における自閉症の存在を示唆する。

【0020】

第七の局面の方法における試料は、血液試料、血漿試料、ヘパリン加血漿試料、EDTA-血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料からなる群より選択され得る。最も好ましくは、試料は血漿試料である。

【0021】

第七の局面の方法は、自閉症を診断するための第五の局面の方法を実施する工程、ならびに自閉症のより高い感度および/または選択性の診断を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0022】

自閉症を診断するための第五の局面の方法は、第七の局面の方法を実施するための工程、ならびに自閉症のより高い感度および/または選択性の診断を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0023】

10

20

30

40

50

第八の局面において、自閉症の治療方法であって、それを必要とする対象に補体因子I - 阻害剤化合物を投与する工程を含む方法が提供される。

【0024】

第九の局面において、自閉症の治療のための薬剤の製造における補体因子I - 阻害剤化合物の使用が提供される。

【0025】

第十の局面において、自閉症の治療における使用のための補体因子I - 阻害剤化合物が提供される。

【0026】

第八、第九または第十の局面の補体因子I - 阻害剤化合物は、6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンスルホネート (FUT-175)、セルピン、Pefabloc (登録商標) SCなどのベンゼンスルホニルフルオリド、スラミン、エラスターゼ特異的阻害剤 (エラフィン) などのWAP型阻害剤からなる群より選択され得る。好ましくは、化合物はFUT-175、エラフィンおよびスラミンから選択される。

10

【0027】

第十一の局面において、

(a) 治療に先立って、対象における第一の局面に基づくバイオマーカーのレベルの基準値を測定する工程；

(b) 評価される治療を該対象に施す工程；

(c) (b) に続いて、該対象における第一の局面のバイオマーカーのレベルを測定する工程；ならびに

20

(d) (a) および (c) で得られたレベルを比較する工程

を含む、対象における自閉症の治療の有効性を評価するための方法が提供され、ここで、第一の局面に基づくバイオマーカーのレベルの増加が、治療に対する治療的応答を示唆する。

【0028】

第十二の局面において、

(a) 治療に先立って、対象における補体因子I活性のレベルの基準値を測定する工程；

(b) 評価すべき治療を該対象に施す工程；

(c) (b) に続いて、該対象における補体因子I活性のレベルを測定する工程；ならびに

30

(d) (a) および (c) で得られたレベルを比較する工程

を含む、対象における自閉症の治療の有効性を評価するための方法が提供され、ここで、補体因子Iの活性の低下が、治療に対する治療的応答を示唆する。

【0029】

第十一の局面の方法は、第十二の局面の方法を実施する工程、ならびに改善された感度および/または選択性を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0030】

第十二の局面の方法は、第十一の局面の方法を実施する工程、ならびに改善された感度および/または選択性を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【図面の簡単な説明】

40

【0031】

【図1】SEQ ID NO:1の新規のペプチドバイオマーカーにおけるC末端アルギニンの側鎖の修飾を示す。(A) アルギニンの通常の側鎖。(B) 本発明の新規のペプチドバイオマーカーのC末端アルギニンの修飾された側鎖の構造。修飾された側鎖を有するこのようなアミノ酸はオルニチンとして公知である。

【図2】自閉症と診断された4名の異なる対象 (Dで示す) および健常な対照小児である4名の異なる対象 (Cで示す) に由来する試料からの代表的な質量スペクトルを示す。マーカー1865 (SEQ ID NO:2)、1978 (SEQ ID NO:1) および2021 (SEQ ID NO:3) の位置を最上部に示す。マーカー1865および2021は自閉症の対象において増加して、1978のマーカーは健常な対象に比べて自閉症の対象において減少することが明らかである。Y軸の単位：

50

μA 。X軸：見かけのMW (Dalton)。Y軸は、関連するピークを明らかにするために自動的にスケールを変更した。各パネルのY軸の概算のスケールは次の通りである：D1：0～700；D2：0～1000；D3：0～350；D4：0～800；C1：0～300；C2：0～400；C3：0～650；C4：0～650。

【図3】マーカー1978 (SEQ ID NO:1) における実施例3の測定値 (表1の数値) をグラフ形式で示す。「0」で示す群は健常な対照者からの結果を含み、「1」で示す群は自閉症の対象からの結果を含む。

【図4】カットオフ基準、選択性および感度の間に存在する相互関係を例証する。

【図5】実施例3からのデータに基づく自閉症の診断における本発明の新規のペプチドバイオマーカー (SEQ ID NO:1) の受信者動作特性 (ROC) 曲線を示す。

10

【図6】実施例3からのデータに基づく自閉症の診断におけるSEQ ID NO:3の公知のペプチドバイオマーカーの受信者動作特性 (ROC) 曲線を示す比較例である。

【図7】実施例3からのデータに基づく自閉症の診断のためにSEQ ID NO:1の新規のペプチドバイオマーカーとSEQ ID NO:3の公知のマーカーを組み合わせることによって得られた受信者動作特性 (ROC) 曲線を示す。いずれかのマーカー単独に比べて、改善した感度および選択性が明らかである。

【図8】実施例3からのデータに基づく自閉症の診断のためにSEQ ID NO:1の新規のペプチドバイオマーカーとSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3の公知のマーカーを組み合わせることによって得られた受信者動作特性 (ROC) 曲線を示す。改善した感度が明らかである。

【図9】血漿インキュベーション時間の関数としての7-アミノ-4-メチルクマリンの遊離の蛍光強度 (平均 \pm SD；1時間 (974 \pm 44.2)、2時間 (1995 \pm 45.2) および3時間 (2374 \pm 1.2))。

20

【図10a】自閉症スペクトラム障害 (ASD) を有する小児 (n=30) および健常な対照小児 (n=30) からのEDTA血漿中の補体因子Iの活性。各個人の因子I活性の散布図を示す。調査時点で投薬を受けていないASDの小児からの試料、Risperdal、Ritalin、その組み合わせ、または抗精神病薬 (チオリダジン) もしくは抗痙攣剤 (フェノバルビタールおよびバルプロ酸ナトリウム) などのその他の薬剤を投薬中であるASDの小児からの試料を示す。ASD群では；年齢 5歳；男児 (n=17)、女児 (n=4)、および年齢 >5歳；男児 (n=6)、女児 (n=3)。健常な対照群では；年齢 5歳；男児 (n=4)、女児 (n=10)、および年齢 >5歳；男児 (n=9)、女児 (n=7)。

30

【図10b】EDTA血漿中の補体因子I活性の平均値および標準誤差を、ASDを有する小児および健常な対照群の双方について異なる年齢群および性別に示す。ASD群では；年齢 5歳；男児 (n=17)、女児 (n=4)、および年齢 >5歳；男児 (n=6)、女児 (n=3)。健常な対照群では；年齢 5歳；男児 (n=4)、女児 (n=10)、および年齢 >5歳；男児 (n=9)、女児 (n=7)。

【発明を実施するための形態】

【0032】

定義

自閉症および自閉症スペクトラム障害 (ASD) という用語は本発明の文脈において同一の意味を有して、DSM-IV基準 (米国精神医学会精神障害の診断と統計の手引き：American Psychiatric Association Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) に基づく自閉症の診断を指す。

40

【0033】

本発明の文脈における感度という用語は、そうであることが正しく同定された実際の陽性の対象の割合 (例えば、症状を有すると正しく同定された自閉症対象のパーセント) を意味する。

【0034】

本発明の文脈における特異性という用語は、そうであることが正しく同定された実際の陰性の対象の割合 (例えば、自閉症でないとして正しく同定された健常対象のパーセント) を意味する。

50

【 0 0 3 5 】

本明細書において、バイオマーカーは、時に、観察された概算の分子量を名称として用いて同定される。表IIは、観察された分子量/名称、配列、およびSEQ ID NO.の間の相関性を示す。

【 0 0 3 6 】

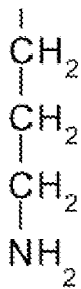
発明の詳細な説明

新規の修飾されたペプチドバイオマーカー

第一の局面において、本発明はアミノ酸配列

NH₂-SSKITHRIHWESASLLR*-COOH (SEQ ID NO: 1)

を有する修飾されたペプチドを開示し、式中、R^{*}で示されるC末端残基の側鎖はアルギニンに通常存在するNH₂-C=NH分子を欠き、これによってR^{*}残基の側鎖は式(1)に示される通りの構造を有する：



(I)

【 0 0 3 7 】

側鎖の修飾の性質をさらに例証するために、図1を参照する。式(1)の側鎖を有するアミノ酸はオルニチンとして公知であるが、通常はポリペプチドでは発現しない。

【 0 0 3 8 】

分析方法

第二の局面において、本発明は、好ましくは生体試料における第一の局面のペプチドの有無および/または濃度を分析するための方法を開示する。分析は、質量分析法に基づく方法(MALDI-TOF、SELDI-TOF、LC-MS、LC-MS/MSなどを含む)または適切な公知の免疫化学的方法(ELISA、RIA、DELFIAなどを含む)などの、このような分析に適した当技術分野において公知の任意の手段によって実施することができる。SELDI-TOFにおいて抗体でコーティングされたチップを用いるなど、分析のために免疫化学的方法と質量分析法に基づく方法とを組み合わせることも可能である。いくつかの場合において、試料は分析の前に濃縮または精製してもよい。濃縮は尿および脳脊髄液などの薄い試料において特に好ましい。このような濃縮および/または精製は、例えば、限外濾過(バイオマーカーの保持が望ましい場合は、好ましくは約1.0~1.5kDの適切なMWカットオフを用いる；またはより高い分子量のタンパク質を除去するために約10kDのMWカットオフを用いることもできる)を用いることによって、タンパク質の選択的な沈殿によって、または試料中の液体のすべてまたは一部を蒸発させることによって実施することができる。クロマトグラフィーの技術も、試料を濃縮するためおよび精製を実施するための双方に有効である。pH 7におけるCM10表面への結合特性(実施例3)は、クロマトグラフィーによる精製スキームを最適化するための適切な起点を提供する。

【 0 0 3 9 】

好ましくは、生体試料は、血液試料、血漿試料、ヘパリン処理した血漿試料、EDTA-血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料から選択される。より好ましくは、生体試料はヘパリン血漿試料である。最も好ましくは、生体試料は、EDTA無添加の阻害剤カクテル(Thermo Scientific, USAから

のHaltプロテアーゼ阻害剤) (例えば、10 µL/mL血漿) およびPefablock (登録商標) SC (Pentapharm Ltd Switzerland) (例えば、20 µL/mL血漿) などのプロテアーゼ阻害剤で処理したヘパリン血漿試料である。

【0040】

抗体

第三の局面において、本発明は第一の局面のペプチドに特異的な抗体に関する。本明細書に示されるペプチド自体の開示を助けとして、当業者は本ペプチドに対する特異的なポリクローナルまたはモノクローナル抗体を得て、かつ特徴決定するために、当技術分野において周知の方法を応用することができる。

【0041】

診断用の製品

第四の局面において、第一の局面のペプチドおよび/または第三の局面の抗体を含む診断用の製品(キットなど)が開示される。好ましくは、診断用の製品は使用のための説明書; プロテアーゼ阻害剤; SEQ ID NO:2のペプチド; SEQ ID NO:3のペプチド; SEQ ID NO:2に特異的な抗体; SEQ ID NO:3に特異的な抗体の一つまたは複数をさらに含む。ペプチドは陽性対照/参照試料として用いられてよく、抗体は分析の免疫学的方法での使用のための検出試薬として用いられてよい。

【0042】

診断方法

第五の局面において、第一の局面のペプチドマーカの測定に基づいて、好ましくは第二の局面の方法を用いて、神経疾患および/または神経精神疾患の診断方法が開示される。SEQ ID NO:1のペプチドマーカは、WO/2004/079371に開示されるもののように公知の診断マーカ(好ましくはSEQ ID NO:2およびSEQ ID NO:3)の測定と好都合に組み合わせることができる。第一の局面のペプチドマーカからの結果とさらなるマーカを組み合わせると、改善された特性および/または感度を有する診断方法が提供される。

【0043】

診断において有用であるためには、上記のマーカまたはマーカの濃度が参照値(「カットオフ」としても公知である)と比較されなければならない。適切には、参照値は健常な対照者からの(最も好ましくは同様の方法および同様の試料を用いて)同一のマーカの濃度を測定することによって、またはより好ましくは健常な対照者の群からの平均値を得ることによって得られる。第一の局面のマーカは健常な対照において見出されるが、自閉症などの神経疾患および/または神経精神疾患を有する対象では存在しないかまたはより低い濃度である傾向がある。

【0044】

大半の現実の症例では健常な集団および疾患を有する集団のマーカ濃度はある程度、部分的にオーバーラップするので、当業者は、疾患の存在を示唆するものと見なされる参照値からの差のレベルはケースによって様々であることを認識する。より大きな差を求めることは診断方法の特異性を高めるが、感度を引き替えにする; より小さな差を求めることは特異性の低下を犠牲にして感度を高める(例証として図4を参照)。特異性および感度の望ましいレベルは状況によって異なる: 例えば、疾患の事前の疑いのない対象を検査するスクリーニング手順においては、多数の偽陽性を避けるために極めて高い特異性が必要である; 既に疾患を有している疑いのある対象を検査する際は、代わりに高い感度が優先されてより低い特異性が受け入れられる場合がある。一つまたは複数のマーカの測定された濃度も、濃度をアッセイするために用いられる特定の分析方法の特徴、さらには試料のタイプおよび試料の取り扱いに応じて異なる可能性がある。これらの考慮すべき事項はすべて、当業者に周知である。同様に、上記に示した問題点(例えば、カットオフ値の測定)に対する解決策は、本明細書の教示と単なる慣例的な実験法および最適化とを組み合わせることによって当業者の想到の範囲内である。

【0045】

カットオフ値の決定に有用な統計学的なツールは受信者動作特性(ROC)曲線として公

10

20

30

40

50

知であり、これは次のように作成することができる。すべての対象（患者および対照）を測定されたパラメータに従ってランク付けする。表の上部から始めて、新しい各測定値について順に、すべての対象について感度および100 - 特異性を算出する（感度 = $\text{posP} / \text{allP}$ 、ここで、 posP はこの測定値を用いて病気を有すると分類される患者（患者は病気を有する対象を意味する）の数であり、特異性は $\text{negC} / \text{allC}$ であり、ここで negC は病気を有すると分類されない対照である）。これらの値を、「 $100 - \text{特異性} = x$ 」として、感度を y とする x - y の図にプロットするとROC-曲線が得られる。

【0046】

カットオフは、病気の罹患率、特に病気の重症度の度合いを含む実際の状況に関して常に調整されるが、統計学的なプログラム（臨床の状況に関しては何も把握しない）は通常、ROC曲線の左上の隅からの距離を最小限にする、即ち、 $(100 - \text{感度})^2 + (100 - \text{特異性})^2$ を最小限にすることによってカットオフを算出し、ここで \wedge は二乗を意味する（ピタゴラスの定理）。図5~8に示す「基準」（カットオフを意味する）、感度および選択性の値は、この方法を用いることによって得られた。

10

【0047】

バイオマーカーの組み合わせに関して、患者と対照の判別に寄与するという意味で、事実上独立であるものを選別することが重要である（少なくともある程度 - つまり例えば、あるピークは、別のピークと結合してはいるが、判別力に寄与する付加価値を有する）。例えば、判別分析またはロジスティック回帰など、いくつかの公知の統計学的方法を用いることができる。さらなる詳細のために、<http://www.medcalc.org/manual/index.php>においてオンラインで閲覧可能なMedCalc（登録商標）ソフトウェア（MedCalc Software, Mariakerke, Belgium）のマニュアルを参照されたい。

20

【0048】

上記のことを考慮して、例示的な分析が実施された（実施例5）。分析により、新規の1978マーカー（SEQ ID NO:1）が、公知のマーカーである2021（SEQ ID NO:3）および1865（SEQ ID NO:2）では判別力が同等である、自閉症の対象と自閉症でない対象との区別において大きな可能性を有することが明確に示された（表III、図3、5および6）。新規の1978マーカーと公知のマーカーである1865および2021の一つまたは双方を組み合わせると診断方法が改善されるという仮説を検証するために、1978と2021の組み合わせ（図7）、ならびに1865、1978および2021の組み合わせ（図8）についてもROC曲線を作成した（判別分析後）。図5および図6の曲線に対する図7のROC曲線の比較から、新規の1978マーカーを公知の2021マーカーと組み合わせると、いずれかのマーカー単独よりもより優れた結果が得られることが明らかである。この分析に第二の公知のマーカーである1865を加えるとさらに優れた結果が得られる（図7との比較における図8）。

30

【0049】

好ましくは、診断される神経疾患または神経精神疾患は、自閉症、アスペルガー症候群、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症、統合失調症、うつ病および双極性障害から選択される。より好ましくは、診断される神経疾患または神経精神疾患は自閉症である。

【0050】

第七の局面において、

(a) 診断される対象からの試料を用意するまたは得る工程；

(b) 該試料中の補体因子Iの活性のレベルを測定する工程；および

(c) 該活性を、健常な対照者からの同様の試料中の補体因子Iの活性のレベルに基づく参照値と比較する工程

を含む、自閉症の診断方法が提供され、

ここで、前記試料中の活性が前記参照値よりも高いことが、対象における自閉症の存在を示唆する。

40

【0051】

第七の局面の方法における試料は、血液試料、血漿試料、ヘパリン加血漿試料、EDTA-

50

血漿試料、血清試料、尿試料、唾液試料、涙液試料、脳脊髄液試料、腹水試料、組織試料および生検材料からなる群より選択され得る。好ましくは、試料は血漿試料である。

【0052】

補体因子Iの活性のレベルの測定は、実施例6に記載される蛍光アッセイを用いて実施され得る（セクション6.1.2.2 参照）。測定のためのその他の方法も当然、用いてよい。

【0053】

補体因子Iの参照値は、必要な変更を加えて上記に開示する通り得ることができる。

【0054】

第七の局面の方法は、自閉症を診断するための第五の局面の方法を実施する工程、および自閉症のより高い感度および/または選択性の診断を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。統合は、例えば、補体因子I活性が決定因子と見なされる場合に上記のROC法を用いて実施され得る。

10

【0055】

自閉症の診断のための第五の局面の方法は、第七の局面の方法を実施する工程、ならびに自閉症のより感度の高いおよび/または選択性の診断を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0056】

本発明は、診断方法、好ましくは自閉症を診断するための方法における、第一の局面のペプチドの使用をさらに開示する。

【0057】

自閉症の治療

Momeniらは、自閉症スペクトラム障害を有する小児が血漿中に高い補体因子I活性を有することを開示している（Autism Research and Treatment Volume 2012 (2012), Article ID 868576, doi:10.1155/2012/868576）（実施例6）。

20

【0058】

補体因子Iは、補体タンパク質C3bの分解に関与する、ヒト血漿中に存在するセリンプロテアーゼである。補体因子I活性の欠乏はヒトにおいて感染の発生数の増加に関連する。

【0059】

前掲の論文において、Momeniらは、ASD群における補体因子I活性の平均レベルが、典型的に発育した健常な小児の対照群におけるよりも有意に高いことを示し、補体因子Iの活性がASDの発症に影響を及ぼすことを示唆している。

30

【0060】

そこで、補体因子Iの阻害剤を用いた自閉症のための治療が提供される。6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンスルホネート（FUT-175）、セルピン、Pefabloc（登録商標）SCなどのベンゼンスルホニルフルオリド、スラミン、エラストラーゼ特異的阻害剤（エラフィン）などのWAP型阻害剤を含む、いくつかの補体因子I阻害剤化合物および化合物の分類が公知である（実施例7）。

【0061】

当業者は、単なる慣例的な実験法および最適化によって補体因子I阻害剤の適切な投与の確立を実施することができる。ヒトにおける使用に関する安全投与間隔が公知である公知の化合物の場合は、実験法における通常の起点は該間隔である。治療の有効性（機能の改善）は、6.1.1の実施例において記載したパラダイムに基づいて繰り返される（例えば、週1回）評価により、ベースライン（即ち、治療開始前）と比較して追跡調査することができる。

40

【0062】

FUT-175は経口投与してよい。投与は0.1mg/kg/日から開始されてよく（1日2回用量に分割）、必要な場合は0.25mg/kg/日（1日2回または4回用量に分割）およびその後0.5mg/kg/日（1日4回用量に分割）に増量することができる。

【0063】

スラミンは、週1回の静脈注射当たり0.1gから開始して、静脈内注射により投与してよ

50

い。必要ならば、用量は0.1gずつ段階的に増量して注射1回当たり1gまで増量される。

【0064】

エラフィン[®]は、10mgを1日2回から開始して、静脈内注射により投与してよい。必要ならば、用量は注射1回当たり20mg、100mg、200mgおよび続いて400mgに増量する。

【0065】

自閉症の治療の有効性を評価するための方法

第十一の局面において、

(a) 治療に先立って、対象における第一の局面に基づくバイオマーカーのレベルのベースライン値を測定する工程；

(b) 評価する治療を該対象に施す工程；

(c) (b)に続いて、該対象における第一の局面の該バイオマーカーのレベルを測定する工程；ならびに

(d) (a)および(c)で求められたレベルを比較する工程

を含む、対象における自閉症の治療の有効性を評価するための方法が提供され、

ここで、第一の局面に基づくバイオマーカーのレベルの上昇が、該治療に対する治療的応答を示唆する。

【0066】

数値の測定は、第五の局面において開示する方法で実施することができる。

【0067】

第十二の局面において、

(a) 治療に先立って、対象における補体因子I活性のレベルのベースライン値を測定する工程；

(b) 評価される治療を該対象に施す工程；

(c) (b)に続いて、該対象における補体因子I活性のレベルを測定する工程；ならびに

(d) (a)および(c)で測定されたレベルを比較する工程

を含む、対象の自閉症の治療の有効性を評価するための方法が提供され、

ここで、補体因子Iの活性の低下が、治療に対する治療的応答を示唆する。

【0068】

数値の測定は、第七の局面において開示する方法で実施することができる。

【0069】

第十一の局面の方法は、第十二の局面の方法を実施する工程、ならびに向上した感度および/または選択性を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0070】

第十二の局面の方法は、第十一の局面の方法を実施する工程、ならびに向上した感度および/または選択性を得るために結果を統合する工程をさらに含み得る。

【0071】

結論とする見解

以下の実施例は非限定的と見なされるべきである。本明細書で用いられる参考資料は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0072】

1. 患者および対照の選択

自閉症スペクトラム障害(ASD)を有するすべての小児は、自閉症の臨床専門家により検査を受けた。小児精神科医が、小児神経内科医または小児心理学者による検査も受けたすべての小児を調べた。すべての立ち会い医はDSM-IV基準(米国精神医学会精神障害の診断と統計の手引き)に基づく自閉症の診断に同意した。対照群は、同一の地域から募集された、神経疾患および/または神経精神疾患の徴候を持たない健常な小児から構成された。検査時点で過去2週間に何らかの種類の感染症を有した対照小児は本試験から除外した。

【0073】

10

20

30

40

50

年齢および性別に有意な差異はなかった。ASD群の小児は自閉症リハビリセンターから募集した。

【0074】

2. 試料採取

静脈血を3mLヘパリン試験管 (Vacutainer System; Becton-Dickinson Inc., Plymouth, UK) に採取して、直ちに4℃において1300gで10分間の遠心分離によって血漿を分離した。続いて、EDTA無添加の阻害剤カクテル (Thermo Scientific, USAからのHaltプロテアーゼ阻害剤) (10 μL/mL血漿) および追加でPefablock SC (Pentapharm Ltd Switzerland) 20 μL/mLを、得られた血漿の試料に加えた。得られた血漿を少量ずつ小分けして、直ちにドライアイスで凍結処理して、その後、さらなる保管のために(-80℃)に移した。採血から凍結処理までの手順全体を20分以内に完了した。

10

【0075】

3. 質量分析による分析 (SELDI-TOF)

CM10プロテインチップアレイ表面を、BioRadからの標準プロトコルに従って調製した。8スポットのCM10プロテインチップアレイ (COOH官能基を有する) を緩衝液 (低ストリンジেন্টな0.1M酢酸ナトリウム、pH 4) 100 μLで5分間、平衡化して、1回、反復した。血漿希釈液 (1:50希釈) の調製にはリン酸ナトリウム緩衝液 (25mM、pH- 7.0) を使用した。希釈した血漿をバイオプロセッサのウェルに適用した。チップアレイを強振盪しながら45分間、インキュベートした。インキュベート後、試料を150 μLの25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH-7 (希釈の緩衝液と同一) で3回洗浄処理して、その後、150 μLの1mM HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)、pH 7で2回、素早くすすいだ。チップアレイをバイオプロセッサから回収して、風乾した。その後、飽和CHCA (25mg/mL) の0.8 μLを各スポットに加えて風乾させて、この工程をもう1回、反復した。その後、チップアレイをBioRadプロテインチップリーダー-SELDIシステムパーソナルエディション (PCS 4000リーダー) により解析した。チップアレイの解析に先立って、約1000~7000 Daの範囲の7つの異なるペプチドの混合物であるBioradの「オールインワンペプチド標準」を用いることによって外部較正を実施した。

20

【0076】

試験では、22名の対照および25名の患者からの試料を上記の通りSELDI-TOFにより解析した。測定したデータは自然対数により標準化した (表1、図3)。

30

【0077】

健常な対照小児およびASDの群からのスペクトルにおいて、観察された分子量1865、1978および2021を有するいくつかの示差的に発現したペプチドが検出された。8名の対象 (4名の異なる患者および4名の異なる対照) からの代表的なSELDI-TOFスペクトルを図2に示す。

【0078】

(表I) 約1865、1978および2021の分子量 (MW) をそれぞれ有するマーカーの、標準化した (自然対数) ピーク強度

群	ID	1865	1978	2021
对照	c1	2.451	5.237	4.61
对照	c10	2.397	5.146	5.06
对照	c11	3.231	3.972	5.19
对照	c12	3.33	3.963	5.136
对照	c13	3.436	5.154	4.256
对照	c17	3.426	5.781	3.847
对照	C18	3.415	5.046	5.206

对照	c2	3.827	4.28	4.592
对照	c20	3.633	5.287	5.308
对照	c21	3.105	4.689	4.733
对照	c22	2.819	4.782	4.355
对照	c23	5.327	6.463	6.723
对照	c24	2.549	5.526	4.516
对照	c25	3.476	5.307	4.292
对照	c26	3.543	4.542	4.207
对照	c28	3.041	5.766	4.708
对照	c29	2.801	4.116	4.52
对照	c3	2.734	4.464	5.199
对照	c31	2.978	3.653	4.454
对照	c33	2.567	5.514	4.739
对照	c4	3.908	4.742	5.003
对照	c6	3.519	4.917	4.976
对照	c7	2.361	3.925	5.039
对照	c8	2.508	3.112	5.038
对照	c9	2.628	4.078	4.358
患者	d10	4.253	4.504	6.548
患者	d11	3.534	5.209	7.229
患者	d13	6.522	4.731	5.353
患者	d14	5.462	4.483	6.577
患者	d15	3.427	4.244	5.13
患者	d17	3.934	4.358	5.135
患者	d19	3.811	3.522	5.055
患者	d20	1.937	3.214	5.328
患者	d21	3.616	3.517	6.03
患者	d22	3.623	3.883	5.791
患者	d25	3.229	3.064	6.077
患者	d26	3.497	3.467	4.5
患者	d27	3.288	4.105	5.311

10

20

30

40

患者	d28	2.662	3.312	5.547
患者	D3	5.297	5.76	6.936
患者	d30	3.379	6.022	4.273
患者	d4	3.311	4.072	4.987
患者	D5	3.745	4.116	5.153
患者	D6	4.652	4.146	4.651
患者	d7	5.667	4.016	6.23
患者	d8	3.528	3.448	6.404
患者	d9	3.559	3.362	5.15

10

【 0 0 7 9 】

4. 示差的に発現したバイオマーカーの構造の決定

実施例3の示差的に発現したバイオマーカーの構造を、MALDI-TOFTOF MSを用いることによって決定し、LC-FTICR MS/MSの情報によって確認した。関心対象のペプチド (SELDI-TOFによって同定されて、対照群と自閉症群で有意に異なったもの) を同定して配列を決定した。

20

【 0 0 8 0 】

血漿試料100 μ Lを緩衝液 (25mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0) 300 μ Lおよびアセトニトリル (AcN) 100 μ Lで希釈して十分に混合した後、カットオフ10kDaのMicroconメンブレン (Millipore Bedford, MA, USA) を使用して限外濾過を実施した。限外濾過液をSpeed vac遠心分離器で乾燥処理して、続いて、緩衝液 (25mMリン酸ナトリウム、pH 7.0) の10 μ Lで再構成して、ZipTip (登録商標) C₁₈カラム (Millipore, Bedford, MA, USA) で脱塩した。再構成した試料5 μ Lを、調製したSELDI-TOF CM-10ターゲット (Biorad, USA) に適用して、インキュベートし、洗浄処理して乾燥した。

【 0 0 8 1 】

飽和Matrix CHCA (25mg/mL) 1.0 μ Lを試料スポットに加えて、風乾させ、この工程をもう1回、反復した。

30

【 0 0 8 2 】

ペプチドの検証のために使用したMALDI-TOF-MSの装置はUltraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) であった。この装置はSmartBeam (商標) レーザーを備えていた。スペクトルはすべて、リフレクトロンモードを用いて取得した。MS/MSスペクトルを取得するために、レーザーで惹起した解離によるポストソース分解 (PSD) TOF/TOFを実施した。

【 0 0 8 3 】

MALDIアプローチのための選択の標的はSELDI-TOFターゲット (BioRad, USA) であった。SELDI-TOFターゲット上の調製したマトリックス / 試料スポットをUltraflex IIに導入して、調製した試料スポットからのMSスペクトルを記録した。用いた較正は、外部近接較正 (external near neighbor calibration) であった。較正に用いた試料は、質量が1000から5000 Daの範囲にわたるペプチドの混合物であった。取得したペプチドの質量 (TOF MSデータ) から、後続の実験 / 配列決定に備えてペプチド候補を手作業で選択した。スペクトルはデータ処理ソフトウェア (FlexAnalysis (商標)) で注釈を付けて、最後にデノボで配列解析を支援するソフトウェア (BioTools (商標)) により解釈した。示差的に発現したペプチドの結果を以下の表IIに示す。

40

【 0 0 8 4 】

(表II) 示差的に発現したペプチドの構造決定

50

観察された MW/名称	アミノ酸配列	SEQ ID NO:
1978	SSKITHRIHWESASLLR* *は修飾されたC末端のアルギニンを示す：NH ₂ -C=NH 分子が側鎖から消失している（図1も参照）	1
1865	SSKITHRIHWESASLL	2
2021	SSKITHRIHWESASLLR	3

10

【 0 0 8 5 】

5. 示差的に発現したバイオマーカーの、診断における価値

実施例3で得られた結果（表I）の統計学的分析は、MedCalc（登録商標）ソフトウェア（MedCalc Software, Mariakerke, Belgium）などのコンピュータプログラムを用いて実施した。

20

【 0 0 8 6 】

すべてのマーカーが対照群と自閉症群との間で統計学的な有意差（ $p < 0.05$ ）を示した（両側t検定）。表IIIを参照されたい。

【 0 0 8 7 】

（表III）表IIに示すデータの統計学的分析

マーカー	平均値	平均値	t 値	差	p	分離分散t		p 値	標準偏差	標準偏差
	自閉症群	対照群				検定推定値	差		両側	患者
2021	5.608718	4.802606	4.05927	45	0.000194	3.96775	36.806	0.000323	0.798449	0.554487
1865	3.906028	3.160416	2.97598	45	0.004686	2.8918	34.333	0.006603	1.043658	0.65134
1978	4.116157	4.778406	-2.89728	45	0.005795	-2.89437	44.059	0.005888	0.788326	0.776276

30

【 0 0 8 8 】

新規のマーカー1978は、公知のマーカーである2021および1865では同等の判別力を有する、自閉症の対象と自閉症でない対象の区別において、大きな可能性を明確に示した。

【 0 0 8 9 】

マーカー1978について、受信者動作特性（ROC）曲線を作成した（図5）。比較のため、公知のマーカー2021についてもROC曲線を作成した（図6）。

40

【 0 0 9 0 】

上記のバイオマーカーの組み合わせの有用性を分析するために、臨床において病気の診断に用いることができると予想される判別に対する寄与に応じて、ピーク（対数値）に異なる重みを与えて、判別分析を用いた。

【 0 0 9 1 】

（表IV）ROC曲線作成のためのマーカーの組み合わせに関する判別分析

マーカーの組み合わせ	判別分析に基づく重み付け	得られたROC曲線
1865 および 1978	1865*(1.73)+1978*(-1.87)	示さず
1865 および 2021	2021*(1.48)+1865*(0.62)	示さず
1978 および 2021	2021*(1.99)+1978*(-1.36)	図 7
1865, 1978 および 2021	2021*(1.52)+1978*(-1.90)+1865*(1.33)	図 8

10

【 0 0 9 2 】

図7および8のROC曲線は、新規マーカー1978と公知のマーカーとの組み合わせが判別力の向上をもたらすことを明確に示している。

【 0 0 9 3 】

6. 自閉症患者では補体因子Iが過活性である。

この試験はMomeniら (Autism Research and Treatment Volume 2012 (2012), Article ID 868576, doi:10.1155/2012/868576) によって以前に刊行されている。該刊行物は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。一部の重要な部分を以下に再現する。

20

【 0 0 9 4 】

6.1 材料および方法

6.1.1 参加者

ASDを有する30名の小児および典型的な対照小児30名が本試験に参加した。ASD群は男児23名および女児7名を含み、平均年齢は4.5歳（年齢範囲 3～9歳）であった。対照群は男児13名および女児17名を含み、平均年齢は6.0歳（年齢範囲 3～12歳）であった（表V）。

【 0 0 9 5 】

（表V）参加者の年齢 / 歳、性別および投薬

*ASDと対照との差。年齢についてはMann-WhitneyのU検定、年齢カテゴリーおよび性別についてはFisherの直接検定。

30

パラメータ		ASD (n = 30)	対照 (n = 30)	P値*
年齢	平均値 (SD)	4.8 (1.7)	6.1 (2.3)	
	中央値 (範囲)	4.5 (3-9)	6 (3-12)	0.033
	≤5 歳	21	14	
	>5 歳	9	16	0.115
性別	男	23	13	
	女	7	17	0.017
投薬	特別な投薬なし	8	30	----
	Risperdal単独または組み合わせ	18	0	----
	Ritalin単独または組み合わせ	4	0	----

【 0 0 9 6 】

ASD群の小児は、イラン、テヘランのUniversity of Social Welfare and Rehabilitation SciencesのAutism Rehabilitation Centreから募集した。親からインフォームドコンセントを取得した後、血液を採取した。ASDを有するすべての小児を自閉症の臨床専門家が検査した。小児精神科医および小児神経科医または小児心理学者がすべての小児を検査した。すべての立ち会い医がDSM-IV基準に基づく自閉症の診断に同意した。但し、欧州および米国/カナダで適用される自閉症診断観察尺度 (ADOS) および自閉症診断面接-改訂版を用いる診断手順は、イランで適用される診断過程では用いられなかった。この欠陥は、2007年以降発表禁止の、米国小児科学会により述べられた自閉症におけるコア行動に精通した小児神経学者/小児精神科医による広範な臨床経験によって補われた。対照群は、ASDを有する小児と同一の地域から募集された神経発生的な疾患の徴候を示さない典型的

40

50

に発育した健常な小児からなつた。検査時点の過去2週間以内に何らかの種類の感染/感染症を有した小児は本試験から除外した。

【0097】

試験は、Iran University of Medical Sciences, Tehranの倫理委員会より承認された(MT/1247)。

【0098】

6.1.2 手順

6.1.2.1 血液試料の採取

血液試料は小児科の看護師が採取して、自閉症と診断された小児からの血液試料は小児精神病の分野において特別な訓練を受けた小児精神科医の監督下にて採取された。静脈血を3mLのEDTA試験管(Vacutainer System; Becton-Dickinson Inc., Plymouth, UK)に採取して、その後、直ちに4℃において1,300gで10分間の遠心分離によって血漿を分離した。続いて、阻害剤カクテル(血漿1mL当たり30μL)を得られた血漿試料に加えた(カクテル阻害剤溶液: 2.0M Tris、0.9M Na-EDTA、0.2Mベンズアミジン、92μM E-64、および48μM ペプスタチン; Sigma, St. Louis, Mich, USA)。血漿は-80℃で保存した。

【0099】

6.1.2.2 アッセイ

蛍光発生基質の加水分解に基づく方法は、TsiftoglouおよびSim(Journal of Immunology, vol. 173, no.1, pp. 367-375, 2004)およびGuptaら(Journal of Autism and Developmental Disorders, vol. 26, no. 4, pp. 439-452, 1996)によって以前に説明されている。以下のアッセイ手順は、血漿中の補体因子I(fI)のアッセイに最適であることが見出された。血漿20μLを緩衝液(100mMリン酸緩衝液、pH 7.5、1mM EDTA、1mM DTTおよび1mM アジ化ナトリウムを含む)80μLと共に、温度平衡に達するように37℃で10分間、インキュベートした。続いて、25mMリン酸緩衝液、pH 7.4中、基質液(200μM Boc-Asp(OBz)-Pro-Arg-7-アミノ-4-メチルクマリン; Bachem, Bubendorf, Switzerland)100μLを加えて、混合液を37℃で60分間、インキュベートした(図9参照)。反応を1.5M酢酸1mLの添加によって阻害して、7-アミノ-4-メチルクマリンの遊離を分光蛍光光度計(Hitachi-i-f 2000; λ_{ex} : 360nm; λ_{em} : 440nm; スリット幅: 2.5)で測定した。測定はすべて無作為化して二反復で実施した。基質の不在下での血漿の使用により、アッセイにおけるバックグラウンドの蛍光をモニターして、基質の存在下で得られる数値から引き算した。

【0100】

6.1.3 データの分析および統計

血漿中fI活性は対数正規分布を示し、従って、ASD群と対照群の差の分析時には対数値を用いた。年齢(中央値の5歳を用いて二分した)および性別について調整するために、要因ANOVAを用いた。<0.05の値を統計学的に有意と判断した。Statistica 8.0(StatSoft(著作権)、Tulsa, Okla, USA)を用いた。血漿fI活性のアッセイ内およびアッセイ間の変動は、次式を用いて1回の測定の標準誤差($S_{方法}$)として表した:

$$S_{方法} = \sqrt{\left(\frac{\sum d_i^2}{(2n)}\right)} \quad (1)$$

式中、 d_i は*i*回目の対の測定の差であり、*n*は差の数である。 $S_{方法}$ は変動係数(%)として表された。

【0101】

6.2 結果

ASD群の小児の血漿fIが有意に高い活性を示した(幾何学平均(95%信頼限界): 対照群: 361(135~967)に比べて、523(154~1776); ANOVA $P=0.015$ 、年齢および性別について調整した; 図10a)。

【0102】

性別および年齢に関して統計学的に有意な相互作用は見出されず、fI活性と年齢または

10

20

30

40

50

性別の間に有意な関連性は見出されなかった（ANOVA；性別に関して $p = 0.25$ および2つの年齢群に関して0.42、図10b）。ASD群では重度の自閉症を有する数人の小児が運動亢進および暴力的な行動を抑制するためにRisperdalの投薬下であり、数名は注意力を向上させるためにRitalinの投薬下にあった（表V）。実験計画を調節する目的で投薬を中止することは倫理的に問題であった。実験者らは図10aに示すデータとASD群の小児が受けていた投薬のタイプを関連付けた。実験者らは投薬と散布図のデータの分布の間にいかなる明らかな関連性も認めなかったが、パターンにおけるいくつかの差が投薬の影響を受け得たことを排除することはできない。

【0103】

数値はASDを有する小児において統計学的に有意に高く、性別との弱い相関性があった。しかし、年齢群の間には統計学的な有意差は見出されなかった。

10

【0104】

方法上のアッセイ内誤差は小さく、0.5%であった。アッセイ間の方法上の誤差は13%であった。実験者らは、ほぼ同一年齢の対照群に比べて、ASDを有する小児において有意に高い補体因子I酵素活性を見出した。このことは、実験者らが知る限り、ASDを有する小児におけるfI活性の機能障害に関する最初の報告である。統計学的に有意ではなかったが、男児は女児よりも高いfI活性を示す傾向があり、対照群とASD群の差は、図10に示す通り、小児の年齢が低ければ低いほどより明白であった。補体系の経路における調節因子としてのfIの役割に起因して、fIの異常はASDの発症において役割を担っている可能性がある。この経路の異常により、個人は様々な炎症に対してより脆弱となる。

20

【0105】

7. 補体因子I阻害剤を用いた自閉症の治療
スラミン

自閉症と診断された患者に、週1回の静脈内注射当たり0.1gから開始して、スラミンを投与する。必要ならば、用量を0.1gずつ段階的に増量して注射1回当たり1gまで増量する。投与は、監督臨床医によって個別にさらに調整される。重度の副作用がある場合は、用量を下げるか治療を中断する。機能の改善は、上記の6.1.1で記載したパラダイムに基づいて週1回の評価によりベースラインと比較して追跡調査する。治療のコース期間中、ベースラインと比較して、機能における有意な改善を観察する。

【0106】

FUT-175（6-アミジノ-2-ナフチルp-グアニジノベンゾエートジメタンシルホネート）

自閉症と診断された患者にFUT-175を経口投与する。投与は0.1mg/kg/日（1日2回用量に分割）で開始して、必要ならば0.25mg/kg/日（1日2回または4回用量の分割）に、その後、0.5mg/kg/日（1日4回用量に分割）に増量する。投与は監督臨床医によって個別にさらに調整される。機能の改善は、上記の6.1.1で記載したパラダイムに基づいて週1回の評価によりベースラインと比較して追跡調査する。治療のコース期間中、ベースラインと比較して、機能における有意な改善を観察する。

30

【0107】

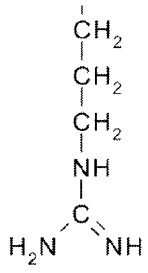
エラフィン

自閉症と診断された患者に、10mgを1日2回から開始して、エラフィンを静脈内注射により投与する。必要ならば、用量は注射1回当たり20mg、100mg、200mgおよび続いて400mgまで増量する。投与は監督臨床医によって個別にさらに調整される。重度の副作用がある場合は、用量を下げる、または治療を中断する。機能の改善は、上記の6.1.1で記載したパラダイムに基づいて週1回の評価によりベースラインと比較して追跡調査する。治療のコース期間中、ベースラインと比較して、機能における有意な改善を観察する。

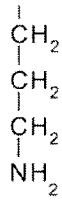
40

【 図 1 】

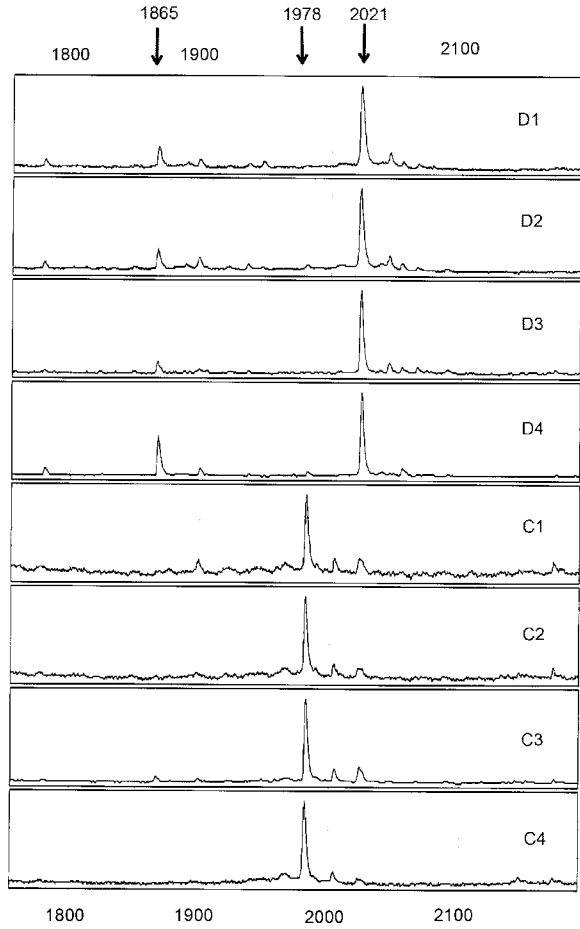
A



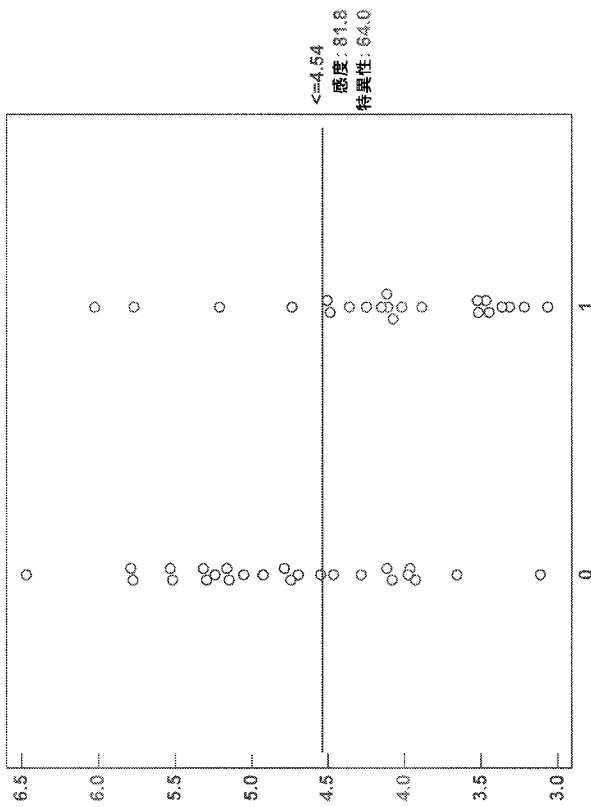
B



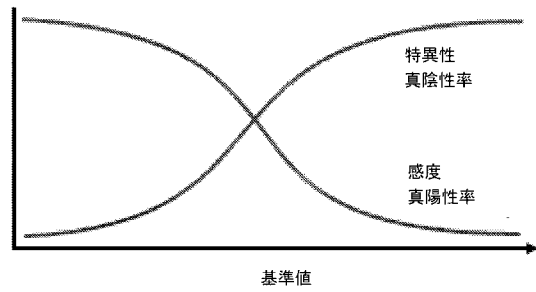
【 図 2 】



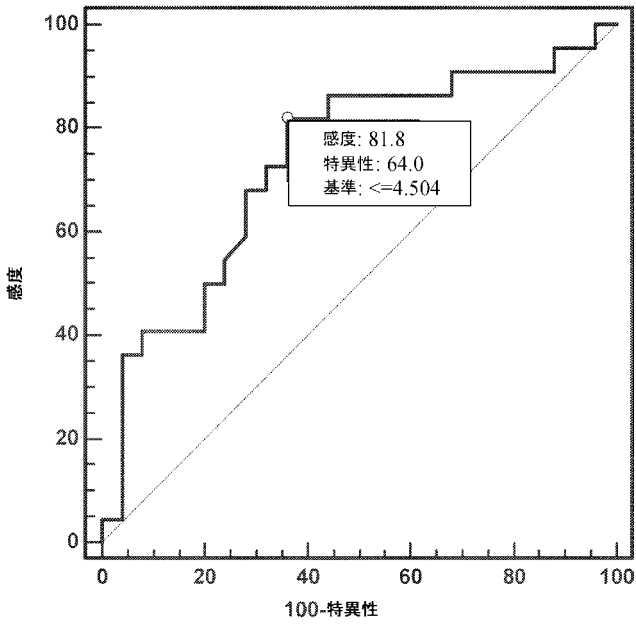
【 図 3 】



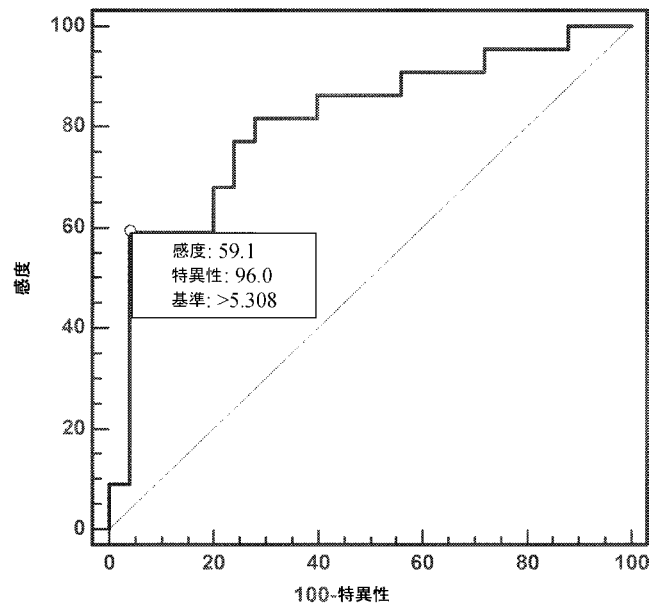
【 図 4 】



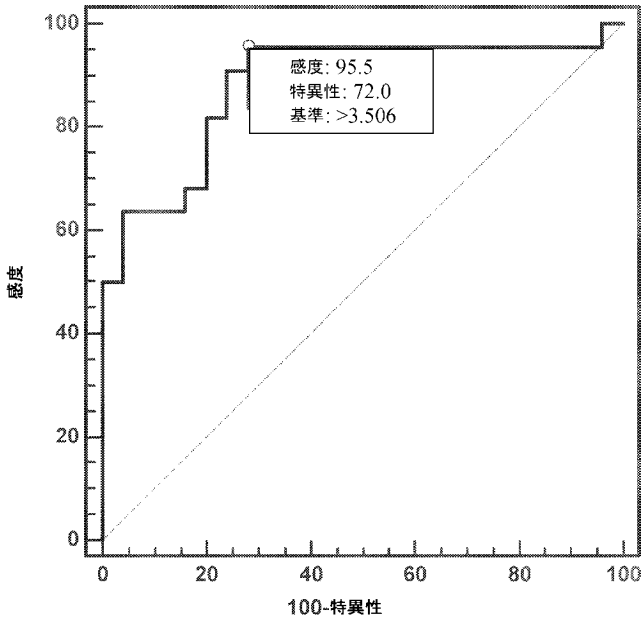
【 图 5 】



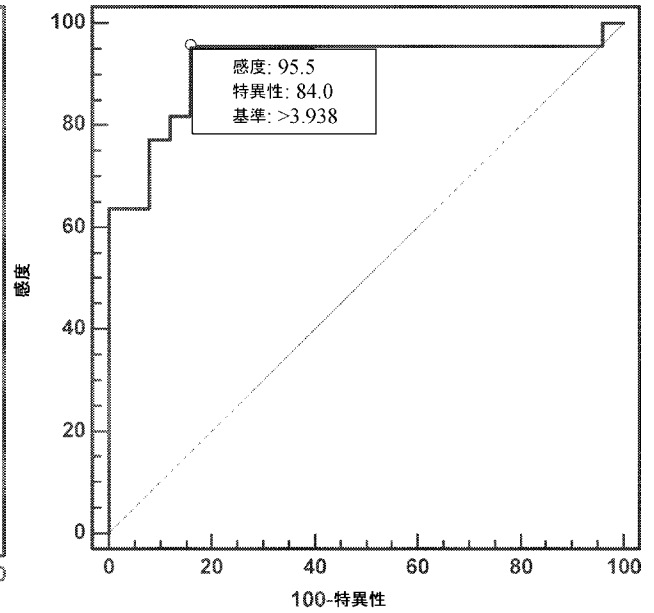
【 图 6 】



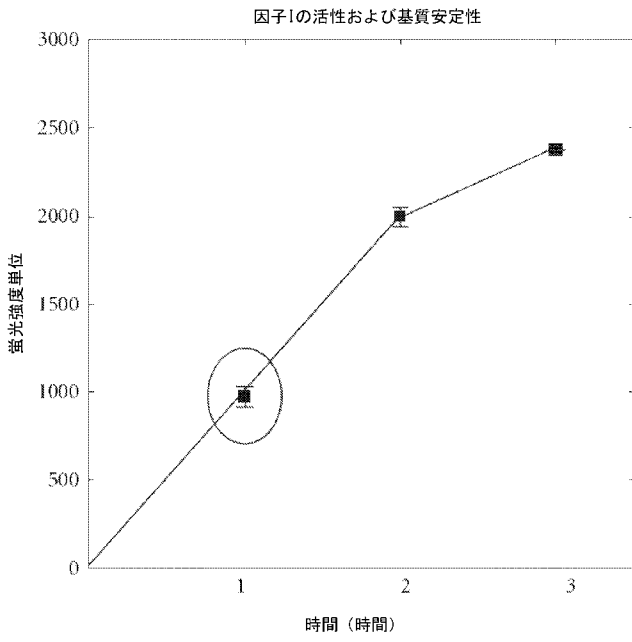
【 图 7 】



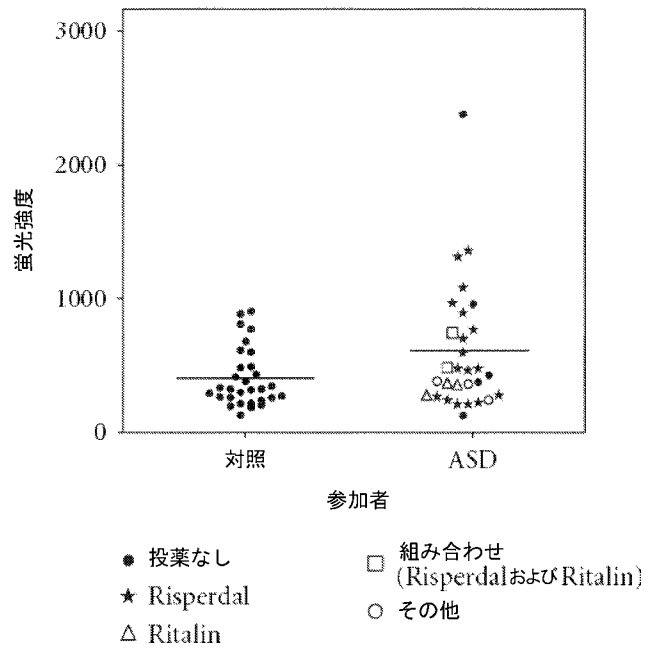
【 图 8 】



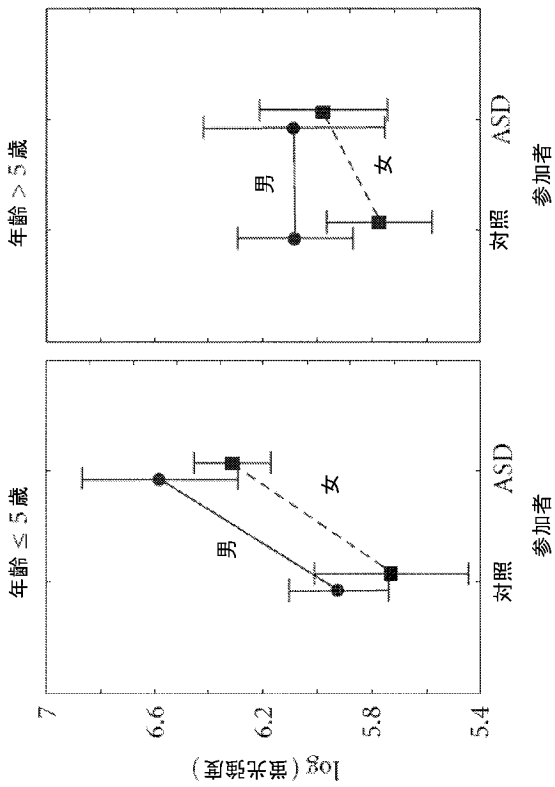
【 図 9 】



【 図 10 a 】



【 図 10 b 】



【手続補正書】

【提出日】平成25年10月4日(2013.10.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2014506244000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/SE2011/051504

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/47 A61K38/04 ADD.		
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) C07K A61K		
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, CHEM ABS Data, BIOSIS, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/079371 A1 (FORSKAPATENT I SYD AB) 16 September 2004 (2004-09-16) cited in the application page 4	7-9
X	----- WO 02/088725 A2 (SYN.X PHARMA INC.) 7 November 2002 (2002-11-07) claims 30-32	7-9
X	----- WO 02/088707 A2 (SYN.X PHARMA) 7 November 2002 (2002-11-07) claims 30-32	7-9
X	----- WO 02/088174 A2 (SYN.X PHARMA) 7 November 2002 (2002-11-07) claims 30-32	7-9
	----- -/--	
<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. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
8 March 2012		21/03/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Masturzo, Pietro

3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/SE2011/051504

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	A CHAUHAN ET AL.: "Increased serum complement C3 and C4 levels in autism: a correlation with severity and language disability", FEBS JOURNAL, vol. 272, no. Suppl. 1, July 2005 (2005-07), pages 492-493, XP002671086, BLACKWELL PUBLISHING, LONDON ISSN: 1742-464X the whole document -----	1-22, 24-34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/SE2011/051504

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004079371 A1	16-09-2004	AT 371192 T	15-09-2007
		AU 2004217571 A1	16-09-2004
		BR PI0408067 A	14-02-2006
		CA 2518066 A1	16-09-2004
		CN 1795386 A	28-06-2006
		DE 602004008439 T2	21-05-2008
		DK 1608982 T3	26-11-2007
		EP 1608982 A1	28-12-2005
		ES 2293234 T3	16-03-2008
		JP 4452715 B2	21-04-2010
		JP 2006519391 A	24-08-2006
		KR 20060006774 A	19-01-2006
		NZ 542149 A	28-03-2008
		PT 1608982 E	09-11-2007
		RU 2340900 C2	10-12-2008
		SE 0300586 A	05-09-2004
		WO 2004079371 A1	16-09-2004
ZA 200507082 A	28-02-2007		
WO 02088725 A2	07-11-2002	AU 2002254828 A1	11-11-2002
		US 2002160419 A1	31-10-2002
		WO 02088725 A2	07-11-2002
WO 02088707 A2	07-11-2002	AU 2002252906 A8	20-12-2007
		US 2002160532 A1	31-10-2002
		WO 02088707 A2	07-11-2002
WO 02088174 A2	07-11-2002	AU 2002254831 A1	11-11-2002
		US 2002161182 A1	31-10-2002
		WO 02088174 A2	07-11-2002

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 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/24	(2006.01)	A 6 1 P 25/24	
A 6 1 P 25/22	(2006.01)	A 6 1 P 25/22	
A 6 1 K 38/55	(2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 31/245	(2006.01)	A 6 1 K 31/245	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 25/16	(2006.01)	A 6 1 P 25/16	
A 6 1 P 25/18	(2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 21/00	

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

(74) 代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74) 代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74) 代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74) 代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74) 代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74) 代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74) 代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72) 発明者 モメニ ナギ

スウェーデン王国 カルマル ビョークベージェン 1 3 シー

(72) 発明者 ペルッソン ベント エル .

スウェーデン王国 カルマル ペルストープスベージェン 3

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA44 DC41 NA14 ZA011 ZA121 ZA151 ZA161 ZA181 ZA941

ZC202

4C206 AA01 AA02 HA31 JA09 MA01 MA04 NA14 ZA01 ZA12 ZA15

ZA16 ZA18 ZA94 ZC20

4H045 AA10 AA11 BA10 BA17 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA20

FA50

专利名称(译)	生物标志物用于诊断和治疗孤独症及其使用		
公开(公告)号	JP2014506244A	公开(公告)日	2014-03-13
申请号	JP2013544428	申请日	2011-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	BIOTECH AUTISM		
申请(专利权)人(译)	Otizumu生物诊断有限公司		
[标]发明人	モメニナギ ペルソンベントエル		
发明人	モメニ ナギ ペルソン ベント エル.		
IPC分类号	C07K7/08 G01N33/53 G01N33/543 C07K16/18 A61K31/185 A61P25/28 A61P25/24 A61P25/22 A61K38/55 A61K31/245 A61P43/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/00 A61P21/00		
CPC分类号	A61K31/17 A61K31/245 A61K38/55 A61K38/57 A61P21/00 A61P25/00 A61P25/16 A61P25/18 A61P25 /22 A61P25/24 A61P25/28 A61P43/00 C07K14/472 C40B20/00 G01N33/6896 G01N2800/28		
FI分类号	C07K7/08.ZNA G01N33/53.D G01N33/543.501.A C07K16/18 A61K31/185 A61P25/28 A61P25/24 A61P25/22 A61K37/64 A61K31/245 A61P43/00.111 A61P25/16 A61P25/18 A61P25/00 A61P21/00		
F-TERM分类号	4C084/AA02 4C084/BA44 4C084/DC41 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA121 4C084/ZA151 4C084/ZA161 4C084/ZA181 4C084/ZA941 4C084/ZC202 4C206/AA01 4C206/AA02 4C206/HA31 4C206/JA09 4C206/MA01 4C206/MA04 4C206/NA14 4C206/ZA01 4C206/ZA12 4C206/ZA15 4C206 /ZA16 4C206/ZA18 4C206/ZA94 4C206/ZC20 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA17 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA50		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	1051330 2010-12-16 SE 61/423636 2010-12-16 US		
其他公开文献	JP2014506244A6 JP5960717B2 JP2014506244A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种新的生物标志物，具有序列SSKITHRIHWESASLLR *的肽，其中用星号表示的C-末端精氨酸的侧链缺少通常存在于侧链中的NH₂-C = NH部分。公开了生物标志物在神经和/或神经精神病症（特别是孤独症）的诊断中的有用性，以及用于确定新生物标志物和针对新生物标志物的抗体的浓度的方法。治疗孤独症，包括向受试者施用补体因子I抑制剂。

群	ID	1865	1978	2021
对照	c1	2.451	5.237	4.61
对照	c10	2.397	5.146	5.06
对照	c11	3.231	3.972	5.19
对照	c12	3.33	3.963	5.136
对照	c13	3.436	5.154	4.256
对照	c17	3.426	5.781	3.847
对照	C18	3.415	5.046	5.206