

(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2015-504514
(P2015-504514A)

(43) 公表日 平成27年2月12日(2015.2.12)

(51) Int.Cl.

G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

F 1

G01N 33/53
G01N 33/68
G01N 33/53
G01N 33/53
A61P 25/00

D M V

テーマコード(参考)

2 G045
4 B063
4 C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 59 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-541200 (P2014-541200)
(86) (22) 出願日 平成24年11月7日 (2012.11.7)
(85) 翻訳文提出日 平成26年6月6日 (2014.6.6)
(86) 國際出願番号 PCT/US2012/063935
(87) 國際公開番号 WO2013/070760
(87) 國際公開日 平成25年5月16日 (2013.5.16)
(31) 優先権主張番号 61/556,810
(32) 優先日 平成23年11月7日 (2011.11.7)
(33) 優先権主張国 米国(US)
(31) 優先権主張番号 61/584,165
(32) 優先日 平成24年1月6日 (2012.1.6)
(33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 507159304
シャイアー ヒューマン ジェネティック
セラピーズ インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
2421 レキシントン シャイアー ウ
エイ 300
(74) 代理人 100078282
弁理士 山本 秀策
(74) 代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹
(74) 代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏
(74) 代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サンフィリポ症候群のためのバイオマーカーおよびそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、サンフィリポ症候群の効率的で正確な特徴決定のためのバイオマーカーを提供する。特に、本発明はサンフィリポ症候群において異なって発現するバイオマーカーを提供する。これらのバイオマーカーは、単独または組み合わせで使用され、サンフィリポ症候群のより正確で確実な特徴決定を可能にし、この症候群の種類および/または重篤度のより精密な決定をもたらし得る。加えて、本発明の独創的なバイオマーカーを使用して、サンフィリポ症候群患者の治療応答を効果的にモニターすること、および/またはサンフィリポ症候群の治療を最適化することができる。

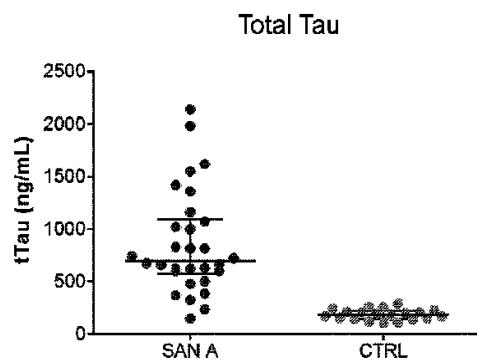


Fig. 18

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

サンフィリポ症候群を特徴決定する方法であって、

1つ以上のバイオマーカーのレベルを対象から得た試料において測定することであって、前記1つ以上のバイオマーカーが、表1に列記されているもの、およびそれらの組み合わせから選択されることと、

対照レベルと比較した前記1つ以上のバイオマーカーの前記測定レベルに基づいて、前記対象におけるサンフィリポ症候群の重篤度を決定することと、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記1つ以上のバイオマーカーが、表1から選択される少なくとも2つのバイオマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記1つ以上のバイオマーカーが、表1から選択される少なくとも3つのバイオマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 4】

前記1つ以上のバイオマーカーが、表1から選択される少なくとも4つのバイオマーカーを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも2つのバイオマーカーを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも3つのバイオマーカーを含む、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ(p181)、および肝細胞増殖因子を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、および肝細胞増殖因子を含む、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】

前記1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルが測定される、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】

前記1つ以上のバイオマーカーの前記タンパク質発現レベルが、前記1つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の抗体を使用するイムノアッセイの実施により測定される、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記1つ以上のバイオマーカーの前記タンパク質発現レベルが、二次元ゲル電気泳動の実施により測定される、請求項10に記載の方法。

【請求項 13】

前記1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルが測定される、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】

10

20

30

40

50

前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記核酸発現レベルが、ハイブリダイゼーションにより測定される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記核酸発現レベルが、R T - P C R 増幅により測定される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記試料が、脳脊髄液 (C S F) 、細胞、組織、全血、口腔洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、経頸部洗浄液、およびこれらの組み合わせから得られる、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

前記試料が脳脊髄液 (C S F) 試料である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記試料が末梢血試料である、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記対照レベルが、サンフィリポ症候群を有さない対照対象における前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルを示す、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記対照レベルが、1 人以上の健康な対照対象から対照試料を得た同じ条件下で測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルである、請求項 1 9 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

前記対照試料が、複数の健康な対照対象からのプールされた試料である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記対照レベルが、履歴データに基づいた参照数値である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記試料において測定された前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記レベルと前記対照レベルとの差が、前記対象におけるサンフィリポ症候群の前記重篤度と相關する、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

前記対照レベルが、既知の重篤度のサンフィリポ症候群を罹患している対照対象における前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルを示す、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記対照レベルが、予め決定されたサンフィリポ症候群の病期を示す履歴データに基づいて確立された閾値の数値である、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記対照レベルが、予め決定された種類のサンフィリポ症候群を示す、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 2 7】

前記 1 つ以上のバイオマーカーが、1 つ以上の追加のマーカーと一緒に使用される、請求項 1 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 1 つ以上の追加のバイオマーカーが、G A G 、ベータ - ヘキソサミニダーゼ、L A M P 1 、L A M P 2 、およびこれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

サンフィリポ症候群の前記重篤度を決定する前記ステップが、前記対象における前記サンフィリポ症候群が A 、 B 、 C 、または D 型であるかを決定することを含む、請求項 1 ~ 2

50

8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記サンフィリポ症候群が、サンフィリポ症候群 A 型である、請求項 1 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記方法が、前記対象の治療レジメンを確認するステップを更に含む、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】

サンフィリポ症候群患者において治療応答をモニターする方法であって、

サンフィリポ症候群の治療を受けた後のサンフィリポ症候群患者から得た試料における 1 つ以上のバイオマーカーのレベルを測定することであって、前記 1 つ以上のバイオマーカーが、表 1 に列記されているもの、G A G、およびそれらの組み合わせから選択されることと、

対照レベルと比較した前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記測定レベルに基づいて、前記治療を維持または調整することと、
を含む、方法。

【請求項 3 3】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および / または頻度を維持することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および / または頻度を増加することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 5】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および / または頻度を低減することを含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記対照レベルが、前記治療を受ける前の前記サンフィリポ症候群患者における前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルである、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記対照レベルが、前記治療中の初期時点で測定された前記サンフィリポ症候群患者における前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルである、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記対照レベルが、前記治療を受けない対照患者における前記 1 つ以上のバイオマーカーのレベルである、請求項 3 2 ~ 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記 1 つ以上のバイオマーカーの減少レベルが、前記患者が前記治療に対して肯定的な応答を有することを示す、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記サンフィリポ症候群が、サンフィリポ症候群 A 型である、請求項 3 6 ~ 3 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記治療が酵素補充療法である、請求項 4 0 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記酵素補充療法が、組み換えヘパラン N - スルファターゼ (H N S) タンパク質を投与することを含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記組み換え H N S タンパク質が、髄腔内送達により投与される、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

10

20

30

40

50

前記試料が、脳脊髄液（C S F）、細胞、組織、全血、血漿、血清、血液、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項36～43のいずれか1項に記載の方法。

【請求項45】

前記試料が脳脊髄液（C S F）試料である、請求項36～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項46】

前記試料が末梢血試料である、請求項36～44のいずれか1項に記載の方法。

【請求項47】

前記1つ以上のバイオマーカーがGAGを含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項48】

前記1つ以上のバイオマーカーが、表1から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項49】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ（p181）、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項50】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ（p181）、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも2つのバイオマーカーを含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項51】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ（p181）、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも3つのバイオマーカーを含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項52】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ（p181）、および肝細胞増殖因子を含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。

【請求項53】

前記1つ以上のバイオマーカーが、タウ、ホスホ-タウ（p181）、カルビンジンD-28K、および肝細胞増殖因子を含む、請求項36～46のいずれか1項に記載の方法。 30

【請求項54】

前記1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルが測定される、請求項36～53のいずれか1項に記載の方法。

【請求項55】

前記1つ以上のバイオマーカーの前記タンパク質発現レベルが、前記1つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の抗体を使用するイムノアッセイの実施により測定される、請求項54に記載の方法。

【請求項56】

前記1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルが測定される、請求項36～53のいずれか1項に記載の方法。 40

【請求項57】

表1に列記されたもの、およびこれらの組み合わせから選択される1つ以上のバイオマーカーのレベルを測定する1つ以上の試薬と、

予め決定されたサンフィリポ症候群の種類または段階を示す、対照レベルまたは前記1つ以上のバイオマーカーの前記対照レベルを決定するための対照試料と、を含む、キット。

【請求項58】

前記キットが、サンフィリポ症候群の不在を示す、追加の対照レベルまたは前記追加の対

50

照レベルを決定するための追加の対照試料を更に含む、請求項 5 7 に記載のキット。

【請求項 5 9】

前記キットが、G A S を測定する試薬を更に含む、請求項 5 7 または 5 8 に記載のキット。
。

【請求項 6 0】

前記 1 つ以上の試薬が、前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記タンパク質発現レベルを測定する、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 6 1】

前記 1 つ以上の試薬が、前記 1 つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する 1 つ以上の抗体を含む、請求項 5 5 に記載のキット。 10

【請求項 6 2】

前記 1 つ以上の試薬が、前記 1 つ以上のバイオマーカーの前記核酸発現レベルを測定する、請求項 5 7 ~ 5 9 のいずれか 1 項に記載のキット。

【請求項 6 3】

前記 1 つ以上の試薬が、前記 1 つ以上のバイオマーカーの m R N A に特異的にハイブリダイズする 1 つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む、請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 4】

サンフィリポ症候群患者において治療応答をモニターする方法であって、

サンフィリポ症候群の治療を受けた後のサンフィリポ症候群患者から得た 1 つ以上の神経発生的バイオマーカーのレベルを測定すること、
。

対照対象と比較した前記 1 つ以上の神経発生的バイオマーカーにおいて測定された変化に基づいて、前記治療を維持または調整すること、
を含む、方法。

【請求項 6 5】

前記 1 つ以上の神経発生的バイオマーカーが、脳の解剖学的マーカーを含む、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記脳の解剖学的マーカーが脳の体積を示す、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記脳の体積が、白質体積、灰白質体積、皮質体積、脳室 + C S F の合計体積、小脳体積、総脳体積、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 6 に記載の方法。 30

【請求項 6 8】

前記対照レベルが、前記治療を受ける前の前記サンフィリポ症候群患者における前記 1 つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記対照レベルが、前記治療中の初期時点で測定された前記サンフィリポ症候群患者における前記 1 つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記対照レベルが、前記治療を受けない対照患者における前記 1 つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである、請求項 6 4 に記載の方法。 40

【請求項 7 1】

前記 1 つ以上の脳の解剖学的マーカーの減少レベルが、前記患者が前記治療に対して肯定的な応答を有することを示す、請求項 6 4 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記サンフィリポ症候群が、サンフィリポ症候群 A 型である、請求項 6 4 ~ 6 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記治療が酵素補充療法である、請求項 6 4 ~ 7 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7 4】

10

20

30

40

50

前記酵素補充療法が、組み換えヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質を投与することを含む、請求項73に記載の方法。

【請求項75】

前記組み換えHNSタンパク質が、髄腔内送達により投与される、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および／または頻度を維持することを含む、請求項64～75のいずれか1項に記載の方法。

【請求項77】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および／または頻度を増加することを含む、請求項64～75のいずれか1項に記載の方法。 10

【請求項78】

治療を維持または調整する前記ステップが、前記治療の用量および／または頻度を低減することを含む、請求項64～75のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2012年1月6日出願の米国仮出願第61/584,165号および2011年11月7日出願の同第61/556,810号の優先権を主張し、それぞれその全體が参照として本明細書に組み込まれる。 20

【背景技術】

【0002】

ムコ多糖症III(MPS-III)は、サンフィリポ症候群としても知られており、グリコサミノグリカン(以前はムコ多糖と呼ばれていた)のヘパラン硫酸を分解するために必要な酵素のうちの1つの欠如により引き起こされる、まれな常染色体劣性リソソーム蓄積症である。ヘパラン硫酸は必須の細胞表面糖タンパク質であり、細胞外マトリックスを形成および維持し、かつ細胞表面のレセプターリガンド相互作用において複数の役割を有する重要な成分である。4つの異なる種類のMPS-IIIが確認されており、MPS-III A、B、CおよびDである(それぞれ、サンフィリポ症候群A型、B型、C型、およびD型としても知られている)。4つのMPS-III型は、それぞれ異なる酵素欠如によって区別される。症候群A型(MSP-III A)は、今までヘパランN-スルファターゼ遺伝子において発見された、酵素機能を低減または無効にする70個を超える異なる突然変異の結果として生じることが示されている。症候群B型(MSP-III B)は、酵素N-アセチル-アルファ-D-グルコサミダーゼの破損に関連している。症候群C型(MPS-III C)は、アセチル-C₀A:アルファ-グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼに関連している。症候群D型(MPS-III D)は、酵素N-アセチルグルコサミン-G-スルフェートスルファターゼに関連している。これらの酵素は、全てヘパラン硫酸の調節に関与している。 30

【0003】

サンフィリポ症候群の発症は、地域により大きく変わり、100,000件の出産あたりおよそ1件の平均発症率であり、症候群A型(MPS-III A)が全ての症例の60%を占める。遺伝子疾患の性質に起因して、小児発育期の初期に現れ、通常は十代後半から二十代前半を超えて延びない寿命をもたらす。疾患の異なる遺伝的な原因にもかかわらず、症候群の診断および病期分類は、4つの種類のMPS-IIIの全てが臨床的に区別不能と考慮されるため問題が多い。幼児では正常に見え、小児で幾つかの軽度な顔異形を後期に発生し得る。他の形態のムコ多糖症に典型的に関連する関節の硬直および薄毛は、通常、疾患の後期になるまで現れない。比較的無症状の幼児期および極めて早期の小児期の後、患者は、通常、発育の遅延および／または行動の問題、続いて、重篤な認知症をもたらす進行性の知的低下、進行性の運動能力の喪失、および最終的には運動機能の喪失を 40

50

50

50

現す。主に神経症状を伴う微妙で非特異的な臨床的特徴の発症は、初期段階での病気の診断を困難にする。M S P - I I I の診断に使用される現在の方法は、酵素レベル測定および遺伝子配列決定のアッセイであり、両方とも高価であり、時間がかかる。加えて、ヘパラン硫酸の一次蓄積は、原発性C N S 発現を伴う不十分にしか理解されていない病理学的カスケードを誘発し、このことは、現存の診断方法を使用して疾患の重篤度を正確に評価すること、およびサンフィリポ症候群患者に最適な治療を提供することを困難にする。

【0004】

したがって、サンフィリポ症候群および症候群の重篤度の指標としてより効果的なバイオマーカーを開発することが、この分野において必要である。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、サンフィリポ症候群の効率的で正確な患者に優しい特徴決定のためのバイオマーカーを提供する。下記の実施例において考査されているように、本発明は、部分的に、サンフィリポ症候群の関連する多様なバイオマーカーの発見に基づいている。特定の理論に束縛されるものではないが、これらのバイオマーカーは、サンフィリポ症候群の発生および進行の基礎をなす病理学的カスケードおよび／または機構を説明することができると考慮される。したがって、これらのバイオマーカーは、単独または組み合わせで使用され、サンフィリポ症候群のより正確で確実な特徴決定を可能にし、症候群の種類および／または重篤度のより正確な決定をもたらすことができる。加えて、本発明のバイオマーカーを使用して、サンフィリポ症候群患者の治療応答を効果的にモニターすること、および／またはサンフィリポ症候群の治療を最適化することができる。

20

【0006】

1つの態様において、本発明は、サンフィリポ症候群を特徴決定する方法を提供し、本方法は、表1に列記されているもの、およびそれらの組み合わせから選択される1つ以上のバイオマーカーのレベルを対象から得た試料において測定することと、対照レベルと比較した1つ以上のバイオマーカーの測定レベルに基づいて、対象におけるサンフィリポ症候群の重篤度を決定することと、を含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、表1から選択される少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19個のバイオマーカーを含む。

30

【0007】

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも2つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも3つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、および肝細胞増殖因子を含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、および肝細胞増殖因子を含む。

40

【0008】

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルが測定される。幾つかの実施形態において、タンパク質発現レベルは、1つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の抗体を使用するイムノアッセイの実施により測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルは、二次元ゲル電気泳動の実施により測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルが測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルは、ハイブリダイゼーションにより測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルは増幅により測定される。更

50

なる実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルを測定する増幅方法は、R T - P C R 増幅である。なお更なる実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルの測定に使用される方法は、核酸配列に基づいた増幅（N A S B A）、転写仲介増幅（T M A）、定量的P C R（q P C R）、リアルタイムP C R、ループ仲介等温増幅（L A M P）、T a q M a n、インベーダー、インベーダープラス、ローリングサークル、鎖置換増幅（S D A）、Q - ベータレプリカーゼ、ヘリカーゼ依存性増幅（H D A）、分歧D N A、加水分解F R E T プローブ、リガーゼ連鎖反応（L C R）、縮重オリゴヌクレオチド初回刺激P C R、または当業者に既知の他の方法からなる群から選択される。

【0009】

10

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの測定に使用される試料は、生物学的試料である。幾つかの実施形態において、試料は、脳脊髄液（C S F）、細胞、組織、全血、口腔洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、経頸部洗浄液、およびこれらの組み合わせから得られる。幾つかの実施形態において、試料は、脳脊髄液（C S F）、細胞、組織、全血、口腔洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、または経頸部洗浄液からなる群からのものである。幾つかの実施形態において、試料は脳脊髄液（C S F）試料である。幾つかの実施形態において、試料は抹消血試料である。

【0010】

20

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーが対象レベルと比較され、ここで対照レベルは、サンフィリポ症候群を有さない対照対象における1つ以上のバイオマーカーのレベルを示す。幾つかの実施形態において、対照レベルは、1つ以上の健康な対照対象から対照試料を得た条件下で測定された1つ以上のバイオマーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、対照試料は、複数の健康な対照対象からプールされた試料である。なお更なる実施形態において、対照レベルは、履歴データに基づいた参考数値である。

【0011】

30

幾つかの実施形態において、試料における1つ以上のバイオマーカーは、対照レベルと比較して上昇している。幾つかの実施形態において、試料において測定された1つ以上のバイオマーカーのレベルと対照レベルとの差は、対象におけるサンフィリポ症候群の重篤度と相関する。幾つかの実施形態において、対照レベルは、既知の重篤度のサンフィリポ症候群を罹患している対照対象における1つ以上のバイオマーカーのレベルを示す。幾つかの実施形態において、対照レベルは、予め決定されたサンフィリポ症候群の病期を示す履歴データに基づいて確立された閾値の数値である。幾つかの実施形態において、対照レベルは、予め決定された種類のサンフィリポ症候群を示す。

【0012】

40

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、1つ以上の追加のマーカーと一緒に使用される。幾つかの実施形態において、1つ以上の追加のマーカーは、グリコサミノグリカン（G A S）（例えば、-ヘパリン硫酸）、ベータ-ヘキソサミニダーゼ、リソソーム関連膜タンパク質1、リソソーム関連膜タンパク質2、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群の重篤度を決定するステップは、対象におけるサンフィリポ症候群がA、B、C、またはD型であるかを決定することを含む。幾つかの実施形態において、対象においてサンフィリポ症候群を診断する方法は、対象の治療レジメンを確認するステップを更に含む。

【0013】

50

別の態様において、本発明は、サンフィリポ症候群患者において治療応答をモニターする方法を提供し、本方法は、サンフィリポ症候群の治療を受けた後のサンフィリポ症候群患者から得た試料における、表1に列記されているもの、グリコサミノグリカン（G A G）、ヘパラン硫酸、およびそれらの組み合わせから選択される1つ以上のバイオマーカーのレベルを測定することと、対照レベルと比較した1つ以上のバイオマーカーの測定レベ

ルに基づいて、治療を維持または調整することと、を含む。幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および／または頻度を維持することを含む。幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および／または頻度を増加することを含む。幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および／または頻度を低減することを含む。

【0014】

幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療を受ける前のサンフィリポ症候群患者における1つ以上のバイオマーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療中の初期時点で測定されたサンフィリポ症候群患者における1つ以上のバイオマーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療を受けない対照患者における1つ以上のバイオマーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群患者における1つ以上のバイオマーカーのレベルは、対照患者と比較して減少している。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの減少レベルは、患者が前記治療に対して肯定的な応答を有することを示す。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群は、A、B、C、またはD型からなる群から選択される。特定の実施形態において、サンフィリポ症候群は、サンフィリポ症候群A型である。

10

【0015】

幾つかの実施形態において、治療は酵素補充療法である。幾つかの実施形態において、酵素補充療法は、組み換えヘパランN-スファターゼ(HNS)タンパク質を投与することを含む。他の実施形態において、酵素補充療法は、ヘパランG-スルファターゼ、N-アセチル-アルファ-D-グルコサミニダーゼ、アセチル-CoA:アルファ-グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼ、N-アセチルグルコサミン-G-スルフェートスルファターゼ、および／またはこれらの組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、組み換え酵素が髄腔内送達により投与される。なお他の実施形態において、組み換えHNSタンパク質が髄腔内送達により投与される。

20

【0016】

幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群患者から得た試料は、脳脊髄液(CSF)、細胞、組織、全血、血漿、血清、血液、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群患者から得た試料は、脳脊髄液(CSF)である。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群患者から得た試料は、末梢血試料である。

30

【0017】

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、グリコサミノグリカン(GAG)のヘパラン硫酸を含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、表1から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも1つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも2つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される少なくとも3つのバイオマーカーを含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、および肝細胞増殖因子を含む。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、および肝細胞増殖因子を含む。

40

【0018】

幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルが測定される。幾つかの実施形態において、タンパク質発現レベルは、1つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の抗体を使用するイムノアッセイの実施により測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルは、二次

50

元ゲル電気泳動の実施により測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルが測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルは、ハイブリダイゼーションにより測定される。幾つかの実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルは増幅により測定される。更なる実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルを測定する増幅方法は、R T - P C R 増幅である。なお更なる実施形態において、1つ以上のバイオマーカーの核酸発現レベルの測定に使用される方法は、核酸配列に基づいた増幅（N A S B A）、転写伸介増幅（T M A）、定量的P C R（q P C R）、リアルタイムP C R、ループ伸介等温増幅（L A M P）、T a q M a n、インベーダー、インベーダープラス、ローリングサークル、鎖置換増幅（S D A）、Q - ベータレプリカーゼ、ヘリカーゼ依存性増幅（H D A）、分岐D N A、加水分解F R E T プローブ、リガーゼ連鎖反応（L C R）、縮重オリゴヌクレオチド初回刺激P C R、または当業者に既知の他の方法からなる群から選択される。

10

【0019】

別の態様において、本発明は、表1に列記されたもの、およびこれらの組み合わせから選択される1つ以上のバイオマーカーのレベルを測定する1つ以上の試薬と、予め決定されたサンフィリポ症候群の種類または段階を示す、対照レベルまたは1つ以上のバイオマーカーの対照レベルを決定するための対照試料と、を含むキットを提供する。幾つかの実施形態において、キットは、サンフィリポ症候群の不在を示す、追加の対照レベルまたは追加の対照レベルを決定するための追加の対照試料を更に含む。幾つかの実施形態において、キットは、グリコサミノグリカン（G A G）を測定する試薬を更に含む。幾つかの実施形態において、1つ以上の試薬は、1つ以上のバイオマーカーのタンパク質発現レベルを測定する。幾つかの実施形態において、1つ以上の試薬は、1つ以上のバイオマーカーに特異的に結合する1つ以上の抗体を含む。幾つかの実施形態において、1つ以上の試薬は、1つ以上のバイオマーカーの核酸レベルを測定する。更なる実施形態において、1つ以上の試薬は、1つ以上のバイオマーカーのm R N Aに特異的にハイブリダイズする1つ以上のオリゴヌクレオチドプローブを含む。

20

【0020】

更に別の態様において、本発明は、サンフィリポ症候群患者において治療応答をモニターする方法を提供し、本方法は、サンフィリポ症候群の治療を受けた後のサンフィリポ症候群患者から得た1つ以上の神経発生的バイオマーカーのレベルを測定することと、対照対象と比較した1つ以上の神経発生的バイオマーカーにおける測定変化に基づいて、治療を維持または調整することと、を含む。

30

【0021】

幾つかの実施形態において、1つ以上の神経発生的バイオマーカーは、脳の解剖学的マーカーを含む。幾つかの実施形態において、脳の解剖学的マーカーは、脳の体積を示す。幾つかの実施形態において、脳の体積は、白質体積、灰白質体積、皮質体積、脳室 + C S F の合計体積、小脳体積、総脳体積、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される。

40

【0022】

幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療を受ける前のサンフィリポ症候群患者における1つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療中の初期時点で測定されたサンフィリポ症候群患者における1つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、対照レベルは、治療を受けない対照患者における1つ以上の脳の解剖学的マーカーのレベルである。

【0023】

幾つかの実施形態において、1つ以上の脳の解剖学的マーカーの減少変化は、患者が治療に対して肯定的な応答を有することを示す。

【0024】

幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群は、サンフィリポ症候群A型である。

50

【 0 0 2 5 】

幾つかの実施形態において、治療は酵素補充療法である。幾つかの実施形態において、酵素補充療法は、組み換えヘパランN-スルファターゼ(HNS)タンパク質を投与することを含む。幾つかの実施形態において、組み換えHNSタンパク質は、髄腔内送達により投与される。

【 0 0 2 6 】

幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および/または頻度を維持することを含む。幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および/または頻度を増加することを含む。幾つかの実施形態において、治療を維持または調整するステップは、治療の用量および/または頻度を低減することを含む。10

【 0 0 2 7 】

本出願に使用されるとき、用語「約」および「およそ」は、同義語として使用される。約/およそを用いて、または用いないで本出願に使用される任意の数値は、関連技術の当業者により理解されるあらゆる正常な変動を網羅することが意図される。

【 0 0 2 8 】

本発明の他の特徴、目的、および利点は、以下の詳細な記述により明らかである。しかしそれぞれは、本発明の実施形態を示しているが、例示のためのみに提示されており、限定するためではないことを理解するべきである。本発明の範囲内の多様な変更および修正は、詳細な記載により当業者に明らかとなる。20

【 図面の簡単な説明】**【 0 0 2 9 】**

図面は、例示の目的のためのみであり、限定のためではない。

【 0 0 3 0 】

【図1】図1は、暦年齢に対する等価精神年齢である。等価精神年齢を、サンフィリポ症候群を有する対象の実際の暦年齢に対してプロットした。

【 0 0 3 1 】

【図2】図2は、発達指数の齢関連低下である。サンフィリポ症候群を有する対象における齢関連低下を検査するために、齢(月齢)に対してプロットされたベースライン発達指数を示す実験データである。30

【 0 0 3 2 】

【図3】図3は、発達指数の齢関連低下である。サンフィリポ症候群を有する対象における齢関連低下を検査するために、齢(年齢)に対してプロットされたベースライン発達指数を示す追加的な実験データである。

【 0 0 3 3 】

【図4】図4は、非コントラスト脳MRIである。FreeSurferソフトウェアを使用した自動体積分析である。

【 0 0 3 4 】

【図5】図5は、大脳皮質体積の変化である。6歳前および後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児の齢(月齢)に対してプロットされた大脳皮質体積(灰白質体積)の変化を示す実験データである。40

【 0 0 3 5 】

【図6】図6は、大脳皮質体積の変化である。6歳前および後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児の齢(年齢)に対してプロットされた大脳皮質体積(灰白質体積)の変化を示す追加の実験データである。

【 0 0 3 6 】

【図7】図7は、脳室およびCSFの体積の変化である。脳室およびCSFの体積の変化を、6歳前および後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児において検査した。

【 0 0 3 7 】

【図8】図8は、白質の変化である。大脳皮質体積(白質体積)の変化を、6歳前および

10

20

30

40

50

後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児において検査した。

【0038】

【図9】図9は、小脳体積の変化である。小脳体積の変化を、6歳前および後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児において検査した。

【0039】

【図10】図10は、総脳体積の変化である。総脳体積の変化を、6歳前および後でサンフィリポ症候群を有すると診断された小児において検査した。

【0040】

【図11】図11は、発達指數に対する大脳皮質体積の変化である。大脳皮質体積(灰白質体積)を、各対象の発達指數と比較した。

10

【0041】

【図12】図12は、発達指數に対する脳室およびCSFの体積である。大脳皮質体積(灰白質体積)を、各対象の発達指數と比較した。

【0042】

【図13】図13は、発達指數に対する白質体積である。白質体積を各対象の発達指數と比較した。

【0043】

【図14】図14は、発達指數に対する総脳体積である。総脳体積を各対象の発達指數と比較した。

20

【0044】

【図15】図15は、Shire GAGアッセイを使用したヘパラン硫酸グリコサミノグリカンの試験である。脳脊髄液におけるヘパラン硫酸グリコサミノグリカンのレベルを、Shire GAGアッセイを使用した研究により各対象において決定した。

【0045】

【図16】図16は、肝細胞増殖因子タンパク質レベルの比較である。脳脊髄液(CSF)の試料を、MPS-III A(SAN A)の診断が確認された対象患者および若年成人健康対照(CTRL)から収集した。CSFを、腰椎髄腔内空間から抜き取り、ルミネックスに基づいたマルチプレックス化ビーズ系イムノアッセイを使用して分析した。それぞれの試料における肝細胞増殖因子タンパク質の濃度を決定した。

30

【0046】

【図17】図17は、カルビンジンDタンパク質レベルの比較である。脳脊髄液(CSF)の試料を、MPS-III A(SAN A)の診断が確認された対象患者および若年成人健康対照(CTRL)から収集した。CSFを、腰椎髄腔内空間から抜き取り、ルミネックスに基づいたマルチプレックス化ビーズ系イムノアッセイを使用して分析した。それぞれの試料におけるカルビンジンDタンパク質の濃度を決定した。

【0047】

【図18】図18は、総タウタンパク質レベルの比較である。脳脊髄液(CSF)の試料を、MPS-III A(SAN A)の診断が確認された対象患者および若年成人健康対照(CTRL)から収集した。CSFを、腰椎髄腔内空間から抜き取り、ルミネックスに基づいたマルチプレックス化ビーズ系イムノアッセイを使用して分析した。それぞれの試料における総タウタンパク質の濃度を決定した。

40

【0048】

【図19】図19は、リン酸化タウタンパク質レベルの比較である。脳脊髄液(CSF)の試料を、MPS-III A(SAN A)の診断が確認された対象患者および若年成人健康対照(CTRL)から収集した。CSFを、腰椎髄腔内空間から抜き取り、ルミネックスに基づいたマルチプレックス化ビーズ系イムノアッセイを使用して分析した。それぞれの試料におけるリン酸化タウタンパク質の濃度を決定した。

【発明を実施するための形態】

【0049】

定義

50

本発明がより容易に理解されるため、特定の用語を最初に定義する。以下の用語および他の用語の追加の定義は、明細書の全体にわたって記載される。

【0050】

抗体：本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子または免疫グロブリン遺伝子のフラグメントにより実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドから構成されるポリペプチドを意味する。認識された免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常部領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変部領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、典型的にはカッパまたはラムダのいずれかに分類される。重鎖は、典型的には、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンに分類され、次に免疫グロブリンの部類のIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEをそれぞれ定義する。典型的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は、四量体を含むことが知られている。それぞれの四量体は、2本のポリペプチド鎖の同一対から構成され、各対は、1本の「軽」（約25kD）および1本の「重」鎖（約50～70kD）を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識に関与する約100～110個、またはそれ以上のアミノ酸の可変部領域を確定する。用語「可変部軽鎖」（VL）および「可変部重鎖」（VH）は、それぞれこれらの軽および重鎖を意味する。抗体は、特定の抗原に対して特異的であり得る。抗体またはその抗原は、分析物または結合パートナーのいずれかであり得る。抗体は、無処置の免疫グロブリン、または多様なペプチダーゼによる消化によって産生された多数の十分に特徴決定されたフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合の下方の抗体を消化して、F(ab)2を产生し、これは、それ自体ジスルフィド結合によりVH-CH1に結合している軽鎖であるFabの二量体である。¹⁰ F(ab)2を、穏和条件下で還元して、ヒンジ領域のジスルフィド結合を切断し、それによってFab'2二量体をFab'单量体に変換することができる。Fab'单量体は、本質的にはヒンジ領域の一部を有するFabである（他の抗体フラグメントについての詳細な記載は、Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993)を参照すること）。多様な抗体フラグメントが無処置抗体の消化に関して定義されているが、当業者は、そのようなFab'フラグメントを化学的または組み換えDNA方法論の利用のいずれかにより、新規に合成できることを理解する。したがって、用語「抗体」には、本明細書で使用されるとき、全抗体の修飾により產生された²⁰、または組み換えDNA方法論を使用して新規に合成された抗体フラグメントも含まれる。幾つかの実施形態において、抗体は、可変部重および可変部軽鎖が（直接またはペプチドリンカーを介して）一緒に結合して連續ポリペプチドを形成する、单一鎖Fv(scfv)抗体のような单一鎖抗体である。单一鎖Fv（「scfv」）ポリペプチドは、共有結合VH：VLヘテロ二量体であり、これは、直接結合した、またはペプチドコードリンカーを介して結合したVH-およびVLコード配列を含む核酸から発現し得る。（例えば、その全体が参考として本明細書に組み込まれる、Huston, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 5879-5883を参考すること。）天然に凝集しているが、抗体のV領域から化学的に分離している軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造に実質的に類似している三次元構造に折り畳まれるscfv分子に変換するために、多数の構造が存在する。例えば、米国特許第5,091,513号および同第5,132,405号および同第4,956,778号を参考すること。³⁰

【0051】

アレイ：用語「アレイ」、「マイクロ-アレイ」、および「バイオチップ」は、本明細書において交換可能に使用される。これらは、基板表面の、ハイブリダイズされたアレイ要素、好ましくは既知配列の複数の核酸分子の配置を意味する。各核酸分子は、基板表面の個別のスポット（すなわち、画定された場所または指定された位置）に固定される。用語「マイクロ-アレイ」は、より詳細には、可視評価のため顕微鏡検査を必要とする小型化されたアレイを意味する。⁴⁰

10

20

30

40

50

【0052】

結合剤：本明細書で使用されるとき、用語「結合剤」には、抗原または標的タンパク質もしくはペプチドに結合するタンパク質のような、任意の天然に生じる、合成、または遺伝子操作された作用物質が含まれる。結合剤は、天然に生じる抗体から誘導されうる、または合成的に操作されうる。結合タンパク質または作用物質は、特定の抗原に結合して複合体を形成し、生物学的応答を誘発する（例えば、特定の生物学的活性を作動または拮抗する）ことにより、抗体と同様に機能することができる。結合剤またはタンパク質には、単離フラグメント、抗体の重および軽鎖の可変部領域から構成される「Fv」フラグメント、軽および重鎖可変部領域がペプチドリンカーにより連結している組み換え单一鎖ポリペプチド分子（「scFv」タンパク質）、ならびに超可変部領域を模倣するアミノ酸残基から構成される最小認識単位が含まれ得る。結合剤という用語には、本明細書で使用されるとき、全抗体の修飾により產生された、または組み換えDNA方法論を使用して新規に合成された抗体フラグメントも含まれ得る。幾つかの実施形態において、抗体は、可変部重および可変部軽鎖が（直接またはペプチドリンカーを介して）一緒に結合して連續ポリペプチドを形成する、单一鎖Fv（scFv）抗体のような单一鎖抗体である。单一鎖Fv（「scFv」）ポリペプチドは、共有結合VH：VLヘテロ二量体であり、これは、直接結合した、またはペプチドコードリンカーを介して結合したVH-およびVLコード配列を含む核酸から発現し得る。（例えば、その全体が参照として本明細書に組み込まれる、Huston, et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883を参照すること。）天然に凝集しているが、抗体のV領域から化学的に分離している軽および重ポリペプチド鎖を、抗原結合部位の構造に実質的に類似している三次元構造に折り畳まれるscFv分子に変換するために、多数の構造が存在する。例えば、米国特許第5,091,513号および同第5,132,405号および同第4,956,778号を参照すること。幾つかの実施形態において、結合剤という用語には、本明細書で使用されるとき抗体も含まれ得る。抗体の定義を参照すること。

10

20

30

40

【0053】

バイオマーカー：本明細書において定義されるとき、用語「バイオマーカー」は、疾患、疾患を発生する危険性、保菌者の状態、または治療介入に対する応答の指標として使用することができる基質（例えば、タンパク質または核酸）を意味する。典型的には、適切なバイオマーカーは、指標として客観的に測定および評価することができる特徴を有する。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、1つの表現型状態の（例えば、疾患を有する）対照から取った試料が別の表現型状態（例えば、疾患を有さない）と比較して異なって存在する有機生体分子である。バイオマーカーは、異なる群のバイオマーカーの平均または中央値発現レベルが統計的に有意であると計算される場合、異なる表現型状態の間で異なって存在する。統計的有意性についての一般的な試験には、とりわけ、t検定、ANOVA、クラスカル-ウォリス、ウィルコクソン、マン-ホイットニー、オッズ比、線形判別分析、二次判別分析、およびK最近傍が含まれる。バイオマーカーは、単独または組み合わせで、対象が1つまたは別の表現型状態に属する相対的危険度の測度を提供する。したがって、これらは疾患（診断）、薬剤の治療効果（セラノスティクス）、および薬剤毒性のマーカーとして有用である。

【0054】

脳解剖学的マーカー：用語「脳解剖学的マーカー」は、本明細書で使用されるとき、脳の任意の解剖学的特徴を意味する。幾つかの実施形態において、脳解剖学的マーカーは、頭蓋内に収納され、脊髄に接続し、灰白質および白質から構成される中枢神経系の任意の部分を含むが、これらに限定されない。

【0055】

化合物および作用物質：用語「化合物」および「作用物質」は、本明細書において交換可能に使用される。これらは、生物学的巨大分子（例えば、核酸、ポリペプチド、もしくはタンパク質）、有機または無機分子のような任意の天然に生じる、または非天然に生じる（すなわち、合成もしくは組み換え）分子、あるいは細菌、植物、真菌、または動物（特

50

に、ヒトを含む哺乳類)の細胞もしくは組織のような生物学的材料から作製される抽出物を意味する。化合物は、單一分子、または少なくとも2つの分子の混合物もしくは複合体であり得る。

【0056】

対照：本明細書で使用されるとき、用語「対照」は、結果が比較される基準であるという当該技術において理解される意味を有する。典型的には、対照は、変数を単離してそのような変数について結論を出すことによって、実験における完全性を増すために使用される。幾つかの実施形態において、対照は、比較物を提供するために試験反応またはアッセイと同時に実施される反応またはアッセイである。1つの実験において、「試験」(すなわち、試験される変数)が適用される。第2の実験において、試験される変数である「対照」は適用されない。幾つかの実施形態において、対照は、履歴対照(すなわち、予め実施された検査もしくはアッセイ、または予め知られている量もしくは結果のもの)である。幾つかの実施形態において、対照は、印刷された、そうでなければ保存された記録である、または記録を含む。対照は、陽性対照または陰性対照であり得る。

10

【0057】

診断：本明細書で使用されるとき、用語「診断」は、個体が疾患または病気を罹患しているかを決定することを目的とする過程を意味する。本発明の文脈において、「サンフィリポ症候群の診断」は、個体がサンフィリポ症候群を罹患しているかの決定、サンフィリポ症候群亜型(すなわち、A、B、C、またはD亜型)の確認、および病期(例えば、初期サンフィリポ症候群または後期サンフィリポ症候群)の決定の1つ以上を目的とする過程を意味する。

20

【0058】

異なって発現するバイオマーカー：本明細書で使用されるとき、用語「異なる発現するバイオマーカー」は、サンフィリポ症候群と関連して使用される場合、発現レベルが、健康もしくは正常な対象(または健康もしくは正常な対象の個体群)における発現レベルと比べてサンフィリポ症候群に罹患している対象(または対象の個体群)において異なるバイオマーカーを意味する。用語は、発現レベルが、異なる疾患亜型(すなわち、サンフィリポ症候群A、B、C、またはD)において異なるバイオマーカーも包含する。用語は、発現レベルが、疾患の異なる段階(例えば、軽度または初期サンフィリポ症候群、重度または後期サンフィリポ症候群)において異なるバイオマーカーを更に包含する。異なる発現は、バイオマーカーの時間的または細胞発現パターンにおける定量的、ならびに定常的な差を含む。下記においてより詳細に考察されるように、異なる発現するバイオマーカーは、単独または異なる発現する他のバイオマーカーとの組み合わせで、診断、病期分類、治療、薬剤開発、および関連領域における多様な異なる用途に有用である。本明細書に開示されている異なる発現するバイオマーカーの発現パターンは、サンフィリポ症候群のフィンガープリントまたはシグニチャー、サンフィリポ症候群の亜型、サンフィリポ症候群の段階、ならびにサンフィリポ症候群の重篤度および/または進行として記載され得る。これらを、基準点として使用して、不明の試料および更なる情報が求められる試料を比較および特徴決定することができる。用語「減少した発現レベル」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に記載されている1つ以上の方法により測定して、少なくとも10%以上、例えば、20%、30%、40%もしくは50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上の発現の減少、あるいは1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍、またはそれ以上を超える発現の減少を意味する。用語「増加した発現レベル」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に記載されている方法のような1つ以上の方法により測定して、少なくとも10%以上、例えば、20%、30%、40%もしくは50%、60%、70%、80%、90%、またはそれ以上の発現の増加、あるいは1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、50倍、100倍、またはそれ以上を超える発現の増加を意味する。

30

【0059】

酵素補充療法(ERT)：本明細書で使用されるとき、用語「酵素補充療法(ERT)」

40

50

は、欠損している酵素を提供して酵素欠如を修正する任意の治療戦略を意味する。幾つかの実施形態において、欠損している酵素は髄腔内投与により提供される。幾つかの実施形態において、欠損している酵素は血流への注入により提供される。いったん投与されると、酵素は細胞に取り込まれ、リソームに輸送され、そこで酵素は、酵素欠如に起因してリソームに蓄積された材料を排除するように作用する。典型的には、リソーム酵素補充療法が効果的であるために、治療酵素は、貯蔵欠陥が現れている標的組織における適切な細胞中のリソームに送達される。

【0060】

有効量：本明細書で使用されるとき、「有効量」は、意図された目的を満たすのに十分な化合物または作用物質の量を意味する。本発明の文脈において、目的は、例えば、少なくとも1つの本発明のバイオマーカーの発現を調節すること、および／またはサンフィリポ症候群の発症を遅延もしくは予防すること、および／またはサンフィリポ症候群の症状の進行、激化、もしくは悪化を遅延もしくは停止させること、および／またはサンフィリポ症候群に関連する1つ以上の症状を緩和すること、および／またはサンフィリポ症候群の症状に改善をもたらすこと、および／またはサンフィリポ症候群を治癒することである。

10

【0061】

改善する、増加する、または低減する：本明細書で使用されるとき、用語「改善する」、「増加する」、もしくは「低減する」、または文法的な同義語は、本明細書に記載されている治療の開始前の同じ個体における測定、または本明細書に記載されている治療の不在下での対照個体（もしくは複数の対照個体）における測定のような、ベースライン測定に関する値を示す。「対照個体」は、治療される個体と同じ形態のリソーム蓄積症（例えば、サンフィリポ症候群）に罹患している個体であり、（治療個体と対照個体の病期を比較できることを確実にするため）治療される個体とほぼ同じ年齢である。

20

【0062】

髄腔内投与：本明細書で使用されるとき、用語「髄腔内投与」または「髄腔内注射」は、脊柱管（脊髄を囲む髄腔内空間）への注射を意味する。多様な技術を使用することができ、穿頭孔、または大槽もしくは腰椎穿刺などを介した側脳室注射が、限定されることなく含まれる。幾つかの実施形態において、本発明の「髄腔内投与」または「髄腔内送達」は、腰椎部位または領域を介したIT（髄腔内）投与または送達、すなわち腰椎IT投与または送達を意味する。本明細書で使用されるとき、用語「腰椎領域」または「腰椎部位」は、第3および4腰椎の間（背下部）の部位、より包含的には脊椎のL2-S1領域を意味する。

30

【0063】

ハイブリダイズする：用語「ハイブリダイズする」は、相補塩基対を介して2つの一本鎖核酸を結合させることを意味する。用語「特異的なハイブリダイゼーション」は、核酸分子がストリングエントな条件下で（例えば、ハイブリダイズする鎖に対して低い程度の相補性を有する競合核酸の存在下で）特定の核酸に優先的に結合する、重複する、またはハイブリダイズするプロセスを意味する。本発明の特定の実施形態において、これらの用語は、より詳細には、試験試料の核酸フラグメント（またはセグメント）が、例えばプローブがアレイに固定されている場合、特定のプローブに優先的に結合し、他のプローブに対してより少ない程度で結合するか、または全く結合しないプロセスを意味する。

40

【0064】

キット：本明細書で使用されるとき、用語「キット」は、材料を送達する任意の送達系を意味する。反応アッセイの文脈において、そのような送達系は、反応試薬（例えば、適切な容器中のオリゴヌクレオチド、酵素など）、および／または支持材料（例えば、緩衝剤、アッセイを実施するための書面の使用説明書など）の1つの場所から別の場所への貯蔵、輸送、または送達を可能にする系を含む。例えば、キットは、関連する反応試薬および／または支持材料を含有する1つ以上の閉鎖容器（例えば、ボックス）を含む。本明細書で使用されるとき、用語「細分化キット」は、それぞれキットの全成分の一部分を含有す

50

る2つ以上の別々の容器を含む送達系を意味する。容器を、意図される受容者に一緒または別々に送達することができる。例えば、第1容器はアッセイに使用される酵素を含有することができ、一方、第2容器はオリゴヌクレオチドを含有する。用語「細分化キット」は、これに限定されないが、米連邦食品・医薬品・化粧品法の第520(e)条により規制されている分析物特異的試薬(ASR)を含有するキットを包含することが意図される。事実、それぞれキットの全成分の一部分を含有する2つ以上の別々の容器を含む任意の送達系は、用語「細分化キット」に含まれる。対照的に、「組み合わせキット」は、反応アッセイの全ての成分を单一容器(例えば、所望の各成分を収容する単一ボックス)に含有する送達系を意味する。用語「キット」には、細分化と組み合わせの両方のキットが含まれる。

10

【0065】

正常：本明細書で使用されるとき、用語「正常」は、「個体」または「対象」を修飾するために使用される場合、特定の疾患または状態を有さず、疾患または状態の保有者でもない個体または個体群を意味する。用語「正常」は、正常または野生型の個体または対象から単離した生物学的試験片または試料を限定するためにも使用され、例えば「正常な生物学的試料」である。

【0066】

核酸：本明細書で使用されるとき、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド、またはポリヌクレオチド、およびこれらのフラグメントまたは部分を意味し、一本または二本鎖であり得る、およびセンスまたはアンチセンス鎖を表し得る、ゲノムまたは合成由来のDNAまたはRNAを意味する

20

【0067】

核酸分子：用語「核酸分子」および「ポリヌクレオチド」は、本明細書において交換可能に使用される。これらは、一本または二本鎖のいずれかの形態でのデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーを意味し、特に記述のない限り、天然に生じるヌクレオチドと同様の方法で機能し得る天然のヌクレオチドの既知の類縁体を包含する。用語は、合成主鎖を有する核酸様構造、ならびに増幅産物を包含する。

【0068】

タンパク質：一般に、「タンパク質」は、ポリペプチド(すなわち、ペプチド結合により互いに結合している一続きの少なくとも2個のアミノ酸)である。タンパク質は、アミノ酸以外の部分を含むことができる(例えば、糖タンパク質であり得る)、および/または、そうでなければプロセスもしくは修飾され得る。当業者は、「タンパク質」が細胞(シグナル配列を有する、もしくは有さない)により產生される完全ポリペプチド鎖であり得ること、またはこれらの機能性部分であり得ることを理解する。当業者は、タンパク質が、時々、例えば1つ以上のジスルフィド結合により結合している、または他の手段で会合している1つを超えるポリペプチド鎖を含み得ることを更に理解する。

30

【0069】

プローブ：用語「プローブ」は、本明細書で使用されるとき、既知の配列の核酸分子を意味し、短DNA配列(すなわち、オリゴヌクレオチド)、PCR産物、またはmRNA単離体であり得る。プローブは、試験試料の核酸フラグメントがハイブリダイズする特定のDNA配列である。プローブは、1種類以上の化学結合を介して、通常は水素結合形成を介して、相補的または実質的に相補的な配列の核酸に特異的に結合する。

40

【0070】

発現レベルを特異的に検出する試薬：本明細書で使用されるとき、用語「発現レベルを特異的に検出する試薬」は、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを検出するのに使用される1つ以上の試薬を意味する。適切な試薬の例には、目的のマーカータンパク質に特異的に結合することができる抗体、目的のポリヌクレオチド配列に特異的にハイブリダイズすることができる核酸プローブ、または目的のポリヌクレオチド配列を特異的に増幅することができるPCRプライマーが含まれるが、これらに限定されない。用語「増幅する」は、増幅産物を作り出す/生成することを意味するために、本明細書において広い意味で

50

使用される。「増幅」は、本明細書で使用されるとき、一般に、所望の配列の複数のコピー、特に試料のものを產生するプロセスを一般に意味する。

【0071】

試料：本明細書で使用されるとき、用語「試料」は、生物学的供給源から得られる任意の試料を包含する。用語「生物学的試料」および「試料」は、交換可能に使用される。生物学的試料は、非限定例として、脳脊髄液（CSF）、血液、羊水、唾液、尿、糞便、表皮試料、皮膚試料、チークスワブ、精子、羊水、培養細胞、骨髄試料、および／または絨毛膜絨毛が含まれ得る。従来の生物学的試料は、例えば、頬側口腔の表面から細胞を擦過して得ることができる。任意の生物学的試料の細胞培養物を生物学的試料として使用することもでき、例えば、絨毛膜絨毛試料の培養物、および／または羊膜細胞培養物のような羊水培養物である。生物学的試料は、例えば、任意の臓器または組織（生検または剖検試験片を含む）から得られる試料でもあり得、これは、細胞（初代細胞もしくは培養細胞のいずれか）、任意の細胞、組織もしくは臓器により調整された培地、組織培養物を含むことができる。幾つかの実施態様において、本発明に適した生物学的試料は、本明細書に記載されている検出のために核酸を放出する、そうでなければ利用可能にするように処理された試料である。適切な生物学的試料は、胎児、若年成人、成人（例えば、妊婦）などのような人生の段階で得ることができる。固定または凍結組織を使用することもできる。

10

【0072】

対象：本明細書で使用されるとき、用語「対象」は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、または靈長類）を意味する。ヒトには、出生前後の形態が含まれる。多くの実施形態において、対象はヒトである。対象は患者であり得、このことは、疾患の診断または治療のために医療提供者の前に現れるヒトを意味する。用語「対象」は、本明細書において「個体」または「患者」と交換可能に使用される。対象は、疾患または障害に罹患し得る、またはかかりやすいが、疾患または障害の症状を示していても、いなくてもよい。

20

【0073】

系：用語「系」および「生物学的系」は、本明細書において交換可能に使用される。系は、少なくとも1つの本発明のバイオマーカーを発現する、または含むことができる任意の生物学的実体であり得る。本発明の文脈において、インビトロ、インビボ、およびエキソビボ系が考慮され、系は、細胞、生物学的流体、生物学的組織、または動物であり得る。例えば、系は、生存している対象由来（例えば、採血により、もしくは針生検の実施により得ることができる）、または死亡した対象由来（例えば、剖検により得ることができる）であり得る。

30

【0074】

罹患している：疾患、障害、および／または状態に「罹患している」個体は、疾患、障害、および／または状態の1つ以上の症状を診断されている、または示している。

【0075】

治療：本明細書で使用されるとき、用語「治療」（また、「治療する」または「治療すること」）は、特定の疾患、障害、および／または状態（例えば、サンフィリポ症候群）の1つ以上の症状または特徴を、部分的または完全に、緩和する、改善する、軽減する、抑制する、発症を遅延する、重篤度を低減する、および／または発症を低減する治療タンパク質（例えば、リソソーム酵素）の任意の投与を意味する。そのような治療は、関連する疾患、障害、および／または状態の徴候を示さない対象、ならびに／あるいは疾患、障害、および／または状態の初期徴候しか示さない対象の治療であり得る。代替的または追加的に、そのような治療は、関連する疾患、障害、および／または状態の確立された1つ以上の徴候を示す対象の治療であり得る。

40

（発明を実施するための形態）

【0076】

本発明は、とりわけ、サンフィリポ症候群患者において異なって発現しているバイオマーカー、ならびに診断、治療のモニター、および／または最適化のためのそのようなバイオ

50

マークの使用方法を提供する。幾つかの実施態様において、本明細書において提供される本発明のバイオマーカーを使用して、サンフィリポ症候群を診断すること（例えば、A型、B型、C型、およびD型）、症候群の重篤度、段階、および／または種類を決定することができる。幾つかの実施形態において、本明細書において提供される本発明のバイオマーカーを、治療効果の評価、サンフィリポ症候群患者の治療応答のモニター、および／または治療最適化のために使用することができる。本明細書において提供される本発明のバイオマーカーを、単独または組み合わせで、リソソーム蓄積病に関連することが知られている他のバイオマーカーを伴い、または伴うことなく、バイオマーカーのパネルの一部として使用することができる。

【0077】

10

本発明の多様な態様が以下のセクションにおいて詳細に記載される。このセクションの使用は、本発明を限定することを意図しない。各セクションを本発明の任意の態様に適用することができる。本出願において、「または」の使用は、特に記述のない限り「および／または」を意味する。

【0078】

サンフィリポ症候群のバイオマーカー

本発明の適切なバイオマーカーは、サンフィリポ症候群の疾患状態、症候群の重篤度、または治療介入に対する応答の指標として使用することができる任意の物質（例えば、タンパク質または核酸）を含むことができる。典型的には、適切なバイオマーカーは、指標として客観的に測定および評価することができる特徴を有する。典型的には、サンフィリポ症候群の適切なバイオマーカーは、サンフィリポ症候群患者と正常な健康個体との間で異なって発現する。したがって、幾つかの実施形態において、「異なる発現プロファイリング」を使用して、サンフィリポ症候群のバイオマーカーを確認することができる。本明細書で使用されるとき、用語「異なる発現プロファイリング」は、2つ以上の試料（例えば、健康な対照個体から得た対照試料に対するサンフィリポ症候群患者から得た試料）における遺伝子またはタンパク質の発現レベルまたはパターンを比較する方法を意味する。典型的には、遺伝子またはタンパク質は、2つの試料の発現レベルまたはパターンにおける差（例えば、増加または減少）が統計的に有意である（すなわち、差が不規則変動により引き起こされていない）場合、異なって発現している。幾つかの実施形態において、遺伝子またはタンパク質は、2つの試料の発現レベルの差が、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、または3倍を超える場合、異なって発現している。

20

【0079】

30

実施例セクションにおいて考察されるように、異なる発現プロファイリングは、サンフィリポ症候群のバイオマーカーを確認することに成功裏に使用された。特に、特定のタンパク質または遺伝の上昇または減少した発現は、サンフィリポ症候群の存在と関連していることが発見された。したがって、そのような異なって発現しているタンパク質または遺伝子の発現および／または活性レベルの分析を用いて、サンフィリポ症候群の危険性を評価すること、サンフィリポ症候群の存在を検出すること、サンフィリポ症候群の進行または寛解をモニターすること、および／または治療応答もしくは最適化をモニターすることができる。

40

【0080】

50

本発明のサンフィリポ症候群の例示的なバイオマーカーを表1に列記する。表1に列記されているバイオマーカーのタンパク質および核酸（例えば、遺伝子、mRNA、および／またはcDNA）配列は、当該技術において知られている。例えば、表1に列記されている各バイオマーカーのタンパク質および核酸配列は、GenBankから入手可能であり、表1に列記されている各バイオマーカーの名称を使用する検索により容易に見出すことができる。本出願の出願日に入手可能である、GenBankにおける表1に列記されている各バイオマーカーの名称と関連するタンパク質および核酸（例えば、遺伝子、mRN

A、および／またはcDNA)配列は、参照として本明細書に組み込まれる。

【0081】

本明細書において提供されるバイオマーカーを、サンフィリポ症候群の危険性を評価するため、サンフィリポ症候群の存在を検出するため、サンフィリポ症候群の進行または寛解をモニターするため、および／または治療応答もしくは最適化をモニターするための指標として、単独または組み合わせで使用することができる。幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている個別のバイオマーカーを使用することができる。幾つかの実施形態において、表1から選択される少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、または19個のバイオマーカーを、パネルとして組み合わせて使用することができる。

10

【0082】

特定の実施形態において、本発明の適切なバイオマーカーは、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、および／または肝細胞増殖因子から選択される。例えば、タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、または肝細胞増殖因子から選択される任意の1、2、3つのバイオマーカーを使用することができる。幾つかの実施形態において、タウ、ホスホ-タウ(p181)、および肝細胞増殖因子を使用することができる。幾つかの実施形態において、これら(タウ、ホスホ-タウ(p181)、カルビンジンD-28K、および肝細胞増殖因子)のうちの4つを組み合わせて使用することができる。

20

【0083】

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている本発明のバイオマーカーを、1つ以上の追加のマーカーと、特にリソソーム蓄積病と関連する、特にサンフィリポ症候群(例えば、サンフィリポ症候群A、B、C、またはD)と関連することが知られているマーカーと一緒に使用することができる。したがって、幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている1つ以上の本発明のバイオマーカー(例えば、表1に提供されているもの)を、例えば、幾つか挙げると、グリコサミノグリカン(GAS)ヘパラン硫酸、ベータ-ヘキソサミニダーゼ、LAMP1、LAMP2のような追加のマーカーと一緒に使用することができる。

【表1】

表1－確認された例示的なバイオマーカー

バイオマーカー	略語	線形分析	二次分析	最近傍
アルファ-1-アンチトリプシン	AAT	-	-	0.0750
アルファ-2-マクロプロブリン	アルファ-2-M	0.0667	0.0000	0.0500
アポリポタンパク質B	アポB	-	-	0.1000
カルビンジン		0.1000	0.0333	0.0500
補体C	C3	-	0.0583	0.0583
脂肪酸結合タンパク質、心臓	H-FABP	-	0.0583	0.0333
ヘパリン結合EGF様増殖因子	HB-EGF	0.1000	-	-
肝細胞増殖因子	HGF	-	0.0417	0.0167
カリクレイン-7	KLK-7	-	0.0500	0.1000
リソソーム関連膜タンパク質2	LAMP2	0.1000	0.1000	0.0750
マクロファージコロニー刺激因子1	M-CSF	-	0.1000	0.0667
単球走化性タンパク質1	MCP-1	-	0.0750	0.0500
性ホルモン結合グロブリン	SHBG	0.0667	0.0250	0.0000
タウ		-	0.0333	0.0667
チロキシン結合グロブリン	TBG	-	0.0917	0.0667
腫瘍壞死因子受容体様2	TNFR2	0.0500	0.0833	0.0333
血管内皮増殖因子受容体1	VEGFR-1	-	0.0750	0.0583
ビトロネクチン		-	-	0.0500
pタウ(181)		-	0.0917	0.0667

【0084】

生物学的試料におけるバイオマーカーレベルの測定

多様な方法を使用して、生物学的試料におけるバイオマーカーのレベルを測定することができる。典型的には、バイオマーカーの発現または活性レベルを示す任意の特徴を使用して、本発明を実施することができる。幾つかの実施形態において、試料におけるバイオマーカーのタンパク質発現レベルが測定される。幾つかの実施形態において、試料におけるバイオマーカーの核酸発現レベルが測定される。

【0085】

生物学的試料

本発明の方法を、1つ以上の本発明のバイオマーカーのアッセイを可能にする任意の種類の生物学的試料に適用することができる。適切な生物学的試料の例には、脳脊髄液(CSF)、細胞、組織、全血、口腔洗浄液、血漿、血清、尿、糞便、唾液、臍帯血、絨毛膜絨毛試料、絨毛膜絨毛試料培養物、羊水、羊水培養物、経頸部洗浄液が含まれるが、これらに限定されない。本発明に適した生物学的試料は、対象から収集された新鮮な、もしくは凍結した試料、または既知の診断、治療、および/もしくは結果の履歴を有する保存記録試料でありうる。生物学的試料は、例えば、対象からCSFもしくは血液を採取すること、または微細針吸引もしくは針生検、または外科生検のような任意の侵襲的または非侵襲的手段により収集され得る。

【0086】

特定の実施形態において、生物学的試料は、試料の限定処理を用いることなく、または用いて使用され得る。例えば、タンパク質抽出物を生物学的試料から調製することができる。幾つかの実施形態において、タンパク質抽出物は、総タンパク質含有量を含有する。幾つかの実施形態において、1つ以上の膜タンパク質、核タンパク質、および細胞質タンパク質を含有するタンパク質抽出物が調製され得る。タンパク質抽出の方法は、当該技術において良く知られている(例えば、“Protein Methods” D. M. Bol lag et al., 2nd Ed., 1996, Wiley-Liss, “Protein Purification Methods: A Practical Approach”

10

20

30

40

50

roach", E. L. Harris and S. Angal (Eds.), 1989、"Protein Purification Techniques: A Practical Approach", S. Roe, 2nd Ed., 2001, Oxford University Press、"Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification, and Characterization", H. Ahmed, 2005, CRC Press: Boca Raton, FLを参照すること)。多数の異なる、および多用途のキットを使用して、体液および組織からタンパク質を抽出することができ、例えば、Biolog Rad Laboratories (Hercules, CA)、BD Biosciences Clontech (Mountain View, CA)、Chemicon International, Inc. (Temecula, CA)、Calbiochem (San Diego, CA)、Pierce Biotechnology (Rockford, IL)、およびInvitrogen Corp. (Carlsbad, CA) から市販されている。従うべきプロトコールを非常に詳細に記載する利用者ガイドが、通常、これらのキットに含まれている。感受性、処理時間、および費用は、キット毎に異なり得る。当業者は、特定の情況に最も適したキットを容易に選択することができる。タンパク質抽出物が得られた後、抽出物のタンパク質濃度は、タンパク質マーカーのシグナルの定量化を可能にするため、好ましくは対照試料と同じ値に標準化される。そのような標準化は、光度もしくは分光法、またはゲル電気泳動を使用して行うことができる。

10

20

30

【0087】

幾つかの実施形態において、核酸を生物学的試料から抽出することができる。例えば、RNAを、分析前の試料から抽出することができる。RNA抽出の方法は、当該技術において良く知られている(例えば、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NYを参照すること)。体液または組織からのRNA単離のための大部分の方法は、RNアーゼを素早く効果的に不活性化するために、タンパク質変性剤の存在下での組織の破損に基づいている。次に、単離された総RNAを、タンパク質汚染物から更に精製し、選択的エタノール沈殿、フェノール／クロロホルム抽出、続くイソプロパノール沈殿、または塩化セシウム、塩化リチウム、もしくはトリフルオロ酢酸セシウム勾配遠心分離により濃縮することができる。キットは、体液または組織からRNA(すなわち、総RNAまたはmRNA)を抽出するためにも利用可能であり、例えば、Ambion, Inc. (Austin, TX)、Amersham Biosciences (Piscataway, NJ)、BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA)、Biolog Rad Laboratories (Hercules, CA)、GIBCO BRL (Gaithersburg, MD)、およびQiagen, Inc. (Valencia, CA) から市販されている。

40

【0088】

特定の実施形態において、抽出の後、mRNAは増幅され、cDNAに転写され、次にこれは、適切なRNAポリメラーゼによる複数回の転写のためのテンプレートとして機能することができる。増幅方法は、当該技術において良く知られている(例えば、A. R. Kimmel and S. L. Berger, Methods Enzymol. 1987, 152: 307-316、J. Sambrook et al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 1989, 2nd Ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York、"Short Protocols in Molecular Biology", F. M. Ausubel (Ed.), 2002, 5th Ed., John Wiley & Sons、米国特許第4,683,195号、同第4,683,202号、および同第4,800,159号を参照すること)。逆転写反応は、アン

50

カードオリゴ-dTプライマーもしくはランダム配列プライマーのような非特異的プライマーの使用により、または各プローブがモニターされるRNAに相補的な標的特異的プライマーの使用により、または熱安定性DNAポリメラーゼ（例えば、トリ骨髄芽球症ウイルスリバーストランスクリプターゼもしくはモロニーマウス白血病ウイルスリバーストランスクリプターゼ）の使用により、実施することができる。

【0089】

タンパク質発現レベルの測定

生物学的試料におけるタンパク質発現レベルの測定または決定は、任意の適切な方法により実施することができる（例えば、E. Harlow and A. Lane, “Antibodies: A Laboratories Manual”, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NYを参照すること）。 10

【0090】

一般に、タンパク質発現レベルは、対象から得られる生物学的試料を、1つ以上のタンパク質バイオマーカーのために結合剤と接触させ、試料において、結合剤と結合する1つ以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを検出し、試料における1つ以上のタンパク質バイオマーカーのレベルを、対照試料における対応するタンパク質バイオマーカーのレベルと比較することによって決定される。本明細書で使用されるとき、用語「結合剤」は、本発明のタンパク質バイオマーカーと特異的に結合するポリペプチドまたは抗体のような実体を意味する。実体は、ポリペプチドと検出可能なレベルで反応／相互作用するが、無関係の配列または異なるポリペプチドの配列を含有するペプチドと検出可能に反応／相互作用しない場合、ポリペプチドに「特異的に結合する」。 20

【0091】

特定の実施態様において、適切な結合剤は、ペプチド成分を有する、もしくは有さないリボソーム、RNA分子、またはポリペプチド（例えば、タンパク質マーカーのポリペプチド配列、そのペプチド変種、もしくはそのような配列の非ペプチド模倣体を含むポリペプチド）である。

【0092】

他の実施形態において、適切な結合剤は、本明細書に記載されているタンパク質バイオマーカーに特異的な抗体（例えば、表1に列記されている任意のバイオマーカーに特異的な抗体）である。幾つかの実施形態において、適切な抗体は、特定の形態のタンパク質バイオマーカー、例えば、リン酸タンパク質（例えば、ホスホ-タウ（p181））に特異的に結合することができる。本発明の方法に使用される適切な抗体には、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、免疫学的に活性なフラグメント（例えば、Fabまたは(Fab)₂フラグメント）、抗体重鎖、ヒト化抗体、抗体軽鎖、およびキメラ抗体が含まれる。モノクローナルおよびポリクローナル抗体、フラグメント、およびキメラを含む抗体は、当該技術に既知の方法を使用して調製される（例えば、R. G. Mage and E. Lamoyi, in “Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications”, 1987, Marcel Dekker, Inc.: New York, pp. 79-97、G. Kohler and C. Milstein, Nature, 1975, 256: 495-497、D. Kozbor et al., J. Immunol. Methods, 1985, 81: 31-42、およびR. J. Cote et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1983, 80: 2026-203、R. A. Lerner, Nature, 1982, 299: 593-596、A. C. Nairn et al., Nature, 1982, 299: 734-736、A. J. Czernik et al., Methods Enzymol. 1991, 201: 264-283、A. J. Czernik et al., Neuromethods: Regulatory Protein Modification: Techniques & Protocols, 1997, 30: 219-250、A. J. Czernik et al., Neurop 40

rotocols, 1995, 6: 56-61、H. Zhang et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 39379-39387、S. L. Morrisson et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1984, 81: 6851-6855、M. S. Neuberger et al., Nature, 1984, 312: 604-608、S. Takeda et al., Nature, 1985, 314: 452-454を参照すること)。本発明の方法に使用される抗体は、当業者に周知の方法により精製され得る(例えば、S. A. Minden, "Monoclonal Antibody Purification", 1996, IBC Biomedical Library Series: Southbridge, MAを参照すること)。例えば、抗体を、タンパク質マーカーまたはそのフラグメントが結合するカラムを通過させて親和的に精製することができる。次に、結合した抗体を、高塩濃度の緩衝剤の使用により、カラムから溶出させることができる。

10

【0093】

調製する代わりに、本発明の方法に使用される抗体を、科学的または商業的な供給者(例えば、Cayman Chemical)から得ることができる。

【0094】

標識結合剤。特定の実施形態において、結合剤は、検出部分により直接的または間接的に標識される。検出剤の役割は、結合剤とタンパク質マーカー(またはその類縁体もしくはフラグメント)の結合により形成される複合体の可視化を可能にすることによって、診断方法の検出ステップを促進することである。好ましくは、検出剤は、測定することができ、およびその強度が、分析される試料に存在するタンパク質マーカーの量に関連する(好ましくは、比例する)シグナルを生成するように選択される。ポリペプチドおよび抗体のような生物学的分子を標識する方法は、当該技術において良く知られている(例えば、“Affinity Techniques. Enzyme Purification: Part B”, Methods in Enzymol., 1974, Vol. 34, W. B. Jakoby and M. Wilnecke (Eds.), Academic Press: New York, NY、およびM. Wilchek and E. A. Bayer, Anal. Biochem., 1988, 171: 1-32を参照すること)。

20

【0095】

多種多様な検出剤のいずれかを本発明の実施に使用することができる。適切な検出剤には、多様な配位子、放射性核種、蛍光染料、化学発光剤、微粒子(例えば、量子ドット、ナノ結晶、リン光体など)、酵素(例えば、ELISAに使用されるもの、すなわち、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、ベータ-ガラクトシダーゼ、ルシフェラー、アルカリホスファターゼ)、比色標識、磁気標識、およびビオチン、ジオキシゲニン、または抗血清もしくはモノクローナル抗体が利用可能である他のハプテンおよびタンパク質が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0096】

特定の実施態様において、結合剤(例えば、抗体)を担体または支持体(例えば、ビーズ、磁気粒子、ラテックス粒子、マイクロタイタープレートウェル、キュベット、または他の反応容器)に固定することができる。適切な担体または支持体材料の例には、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、デキストラン、セファデックス、セファロース、リポソーム、カルボキシメチルセルロース、ポリアクリルアミド、ポリスチレン、斑レイ岩、濾紙、磁石、イオン交換樹脂、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ガラス、ポリアミン-メチルビニルエーテル-マレイン酸コポリマー、アミノ酸コポリマー、エチレン-マレイン酸コポリマー、ナイロン、絹などが含まれる。結合剤を、第1結合剤に特異的な第2結合剤の使用により直接固定することができる(例えば、タンパク質マーカーに特異的なマウス抗体を、担体または支持体に被覆されたヒツジ抗マウスIgG Fcフラグメント特異的抗体の使用により固定することができる)。

40

【0097】

50

生物学的試料におけるタンパク質発現レベルは、イムノアッセイの使用により決定することができる。そのようなアッセイの例は、時間分解蛍光イムノアッセイ(T R - F I A)、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ(例えば、E L I S A)、免疫蛍光免疫沈降、ラテックス凝集、赤血球凝集、ウエスタンプロット、および組織化学的検査であり、これらは当該技術に周知の従来の方法である。当業者に理解されるように、イムノアッセイは、競合的または非競合的であり得る。結合剤とタンパク質マーカーの結合により形成される複合体によって生成されるシグナルを検出および定量化する方法は、アッセイの性質および検出部分(例えば、蛍光部分)に応じて決まる。

【 0 0 9 8 】

あるいは、タンパク質発現レベルは、タンパク質の検出について当該技術において既知の質量分析に基づいた方法または画像(標識配位子の使用を含む)に基づいた方法の使用により決定され得る。他の適切な方法には、二次元電気泳動、プロテオミクスに基づいた方法が含まれる。試料におけるタンパク質発現の網羅的变化を研究するプロテオミクスは、(1) 電気泳動により試料において個別のタンパク質を分離するステップ(一次元 P A G E)、(2) ゲルから(例えば、質量分析またはN末端配列決定により)回収された個別のタンパク質を同定するステップ、および(3) バイオインフォマティクスの使用によりデータを分析するステップを含むことができる。

10

【 0 0 9 9 】

核酸発現レベルの測定

生物学的試料における核酸の発現レベルの測定または決定は、ハイブリダイゼーション(例えば、サザンまたはノーザン分析)、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)(例えば、米国特許第、4,683,195号、同第4,683,202号、および同第6,040,166号、“ P C R Protocols : A Guide to Methods and Applications ”, Innis et al . (Eds .), 1990 , Academic Press : New York を参照すること)、リバーストランスクリプターゼ P C R (R T - P C T)、アンカード P C R 、競合的 P C R (例えば、米国特許第5,747,251号を参照すること)、c D N A 端の急速増幅(R A C E)(例えば、“ Gene Cloning and Analysis : Current Innovations ”, 1997 , pp . 99 - 115 を参照すること)、リガーゼ連鎖反応(L C R)(例えば、欧州特許第01 320 308号を参照すること)、片側 P C R (O h a r a et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . , 1989 , 86 : 5673 - 5677)、インサイツハイブリダイゼーション、Taqmanに基づいたアッセイ(H o l l a n d et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . , 1991 , 88 : 7276 - 7280)、ディファレンシャルディスプレー(例えば、L i a n g et al . , Nucl . Acid . Res . , 1993 , 21 : 3269 - 3275 を参照すること)、ならびに他のRNAフィンガープリント技術、核酸配列に基づいた増幅(N A S B A)および他の転写に基づいた増幅系(例えば、米国特許第5,409,818号および同第5,554,527号を参照すること)、Q betaレプリカーゼ、鎖置換増幅(S D A)、修復連鎖反応(R C R)、ヌクレアーゼ保護アッセイ、減殺に基づいた方法、R a p i d - S c a n (商標)などが含まれるが、これらに限定されない任意の適切な方法により実施することができる。

20

30

40

【 0 1 0 0 】

生物学的試料におけるポリヌクレオチド配列の検出に使用される核酸プローブは、当該技術に既知の従来の方法の使用により構成され得る。適切なプローブは、バイオマーカーをコードする核酸の領域からの少なくとも5個の連続アミノ酸をコードする核酸に基づくことができ、好ましくは約15～約50個のヌクレオチドを含むことができる。核酸プローブは、結合剤の場合について上記に記述されたように、検出部分で標識され得る。核酸プローブと検出部分の会合は、共有または非共有であり得る。検出部分は、核酸プローブに直接的に、またはリンカーを介して間接的に結合し得る(E . S . M a n s f i e l d et al . , Mol . Cell . Probes , 1995 , 9 : 145 - 156)。核

50

酸分子を標識する方法は、当該技術において良く知られている（この分野の標識プロトコール、標識検出技術、および最近の動向についての概説には、例えば、L. J. Krieka, Ann. Clin. Biochem. 2002, 39: 114 - 129、R. P. van Gijlswijk et al., Expert Rev. Mol. Diagn. 2001, 1: 81 - 91、およびS. Joos et al., J. Biotechnol. 1994, 35: 135 - 153を参照すること）。

【0101】

核酸プローブをハイブリダイゼーション技術に使用して、バイオマーカーをコードするポリヌクレオチドを検出することができる。この技術は、一般に、対象から得た生物学的試料中の核酸分子を、特定のハイブリダイゼーションが核酸プローブと核酸分子の相補配列との間に生じるような条件下で、核酸プローブと接触させ、インキュベートさせることを伴う。典型的には、ストリンジエントハイブリダイゼーション条件が使用される。幾つかの実施態様において、「ストリンジエントハイブリダイゼーション条件」は、少なくとも以下と同じようにストリンジエントなハイブリダイゼーション条件を意味する：50%のホルムアミド、5×SSC、50mMのNaH₂PO₄、pH 6.8、0.5%のSDS、0.1mg/mLの超音波処理サケ精子DNA、および5×Denhardt溶液により42度一晩のハイブリダイゼーション；2×SSC、0.1%のSDSにより45度の洗浄；ならびに0.2×SSC、0.1%のSDSにより45度の洗浄。幾つかの実施形態において、ストリンジエントハイブリダイゼーション条件は、20個の隣接ヌクレオチドの長さにわたって2個を超える塩基が異なっている2個の核酸のハイブリダイゼーションを可能にするべきではない。インキュベーションの後、非ハイブリダイズ核酸が除去され、プローブとハイブリダイズした核酸の存在および量が検出され、定量化される。

10

20

30

40

50

【0102】

バイオマーカーをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子の検出は、PCRのような増幅法（例えば、RT-PCR）の使用による特定のポリヌクレオチド配列の増幅、続く当該技術に既知の技術の使用による増幅された分子の分析を含み得る。適切なプライマーは、当業者により日常的に設計され得る。アッセイ条件下ハイブリダイゼーションを最大化するため、本発明の方法に用いられるプライマーおよびプローブは、バイオマーカーをコードする核酸の部分に、一般に少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも90%の同一性を有する。

【0103】

本明細書に記載されているハイブリダイゼーションおよび増幅技術を使用して、本明細書に記載されている本発明のバイオマーカーをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子の発現の定性的および定量的側面をアッセイすることができる。

【0104】

あるいは、バイオマーカーをそれぞれコードする核酸から誘導されたオリゴヌクレオチドまたはより長いフラグメントを、マイクロアレイにおいて標的として使用することができる。多数の異なるアレイ構成および製造方法が、当業者に知られている（例えば、米国特許第5,445,934号、同第5,532,128号、同第5,556,752号、同第5,242,974号、同第5,384,261号、同第5,405,783号、同第5,412,087号、同第5,424,186号、同第5,429,807号、同第5,436,327号、同第5,472,672号、同第5,527,681号、同第5,529,756号、同第5,545,531号、同第5,554,501号、同第5,561,071号、同第5,571,639号、同第5,593,839号、同第5,599,695号、同第5,624,711号、同第5,658,734号、および同第5,700,637号を参照すること）。マイクロアレイ技術は、多数のポリヌクレオチド配列の安定状態のレベルを同時に測定することを可能にする。現在、広く使用されているマイクロアレイには、cDNAアレイおよびオリゴヌクレオチドアレイが含まれる。マイクロアレイを使用する分析は、一般に、マイクロアレイの既知の場所に固定された核酸プローブとハイブリダイズする試料のcDNA配列を検出することに使用される標識プローブ

から受け取るシグナルの強度の測定に基づいている（例えば、米国特許第6,004,755号、第同6,218,114号、同第6,218,122号、および同第6,271,002号を参照すること）。アレイに基づいた遺伝子発現法は、当該技術において知られており、多数の科学出版物、ならびに特許に記載されてきた（例えば、M. Schena et al., *Science*, 1995, 270:467-470、M. Schena et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93:10614-10619、J. J. Chen et al., *Genomics*, 1998, 51:313-324、米国特許第5,143,854号、同第5,445,934号、同第5,807,522号、同第5,837,832号、同第6,040,138号、同第6,045,996号、同第6,284,460号、および同第6,607,885号を参照すること）。

10

20

30

40

50

【0105】

対照との比較

バイオマーカーまたは目的のバイオマーカー（例えば、表1から選択されるバイオマーカー）の発現レベルが、分析される生物学的試料にために（上記に記載されたように）決定されると、これらを1つ以上の対照試料の発現レベルと比較することができる。本発明の方法による発現レベルの比較は、好ましくは、得られた発現レベルが、アッセイされた試料の量における差および使用された試料の品質における変動の両方（例えば、抽出されたタンパク質の量、または試験されたmRNAの量および品質）について修正された後で実施される。修正は、当該技術に周知の異なる方法を使用して実施することができる。例えば、試料のタンパク質濃度は、試料が分析される前に、光度もしくは分光法、またはゲル電気泳動（上記に既に記述されている）を使用して標準化することができる。核酸分子を含有する試料において、修正は、レベルを同じ試料中の基準遺伝子（例えば、ハウスキーピング遺伝子）に正規化することによって実施することができる。代替的に、または追加的に、標準化は、全てのアッセイされた遺伝子またはその大量のサブセットの平均または中央値シグナル（例えば、RT-PCRの場合ではC_t）に基づくことができる（網羅的正規化手法）。

【0106】

神経発生的バイオマーカー

本発明の適切な神経発生的バイオマーカーは、サンフィリポ症候群の疾患状態、症候群の重篤度、または治療介入に対する応答の指標として使用することができる任意の発生的バイオマーカー（例えば、認知、行動または運動能力）を含むことができる。典型的には、適切な発生的バイオマーカーは、指標として客観的に測定および評価することができる特徴を有する。典型的には、サンフィリポ症候群の適切な発生的バイオマーカーを使用して、サンフィリポ症候群患者と正常な健康個体を区別することができる。したがって、幾つかの実施形態において、「異なる発生的プロファイリング」を使用して、サンフィリポ症候群の発生的バイオマーカーを確認することができる。本明細書で使用されるとき、用語「異なる発生的プロファイリング」は、2人以上の対照（例えば、健康な対照個体から得た対照試料に対するサンフィリポ症候群患者から得た神経発生的データ）における発生的特色、能力、またはパターンを比較する方法を意味する。典型的には、2人以上の対象の間で観察された異なる発生的特色、能力、またはパターンは、統計的に有意である（すなわち、差は不規則変動により引き起こされていない）。

【0107】

幾つかの実施態様において、発生的バイオマーカーは、神経発生的バイオマーカーである。幾つかの実施形態において、神経発生的バイオマーカーは、上肢機能、下肢機能、手と目の協調、神経筋応答、疼痛応答、温度応答、表情、可動域、および／または全体的な体の動きがなどであるが、これらに限定されない神経運動機能に関連する。幾つかの実施形態において、経発生的バイオマーカーは、学習能力、認知能力、記憶機能、読解レベル、I.Q.、短期記憶、長期記憶、問題解決、および／または一般的な分析能力などであるが、これらに限定されない神経認知機能に関連する。幾つかの実施形態において、神経発

生的バイオマーカーは、語彙レベル、発音、発声、および／または口腔運動能力などであるが、これらに限定されない発語および言語に関連する。幾つかの実施形態において、神経発生的バイオマーカーは、認識レベル、注意力持続時間、および意識性、系統化、多重課題の能力、活動レベル、ならびに／または自己制御などであるが、これらに限定されない神経行動機能に関連する。当業者は、多数の標準化検査、調査、または質問表を使用して、上記に記載された神経発生的バイオマーカーのいずれかをアッセイすることができる。加えて、そのような標準化検査、調査、または質問表は、特定の病気を取り扱うために個別の場合に合わせて設計され得る、またはこの分野の範囲内で現在利用可能である1つ以上のものであり得る。例えば、幾つかの実施形態において、発生的評価は、Bayley Scales of Infant Development II (BSID) を使用して実施することができる。幾つかの実施形態において、Kaufman Assessment Battery for Children (KABC) を使用することができる。

10

【0108】

幾つかの実施形態において、神経発生的バイオマーカーは、神経解剖学的な構造および／またはこれらの機能に関連する。幾つかの実施形態において、神経解剖学的バイオマーカーには、総脳体積、総脳サイズ、脳組織組成、灰白質体積、白質体積、皮質体積、皮質厚、脳室およびCSFの体積、小脳体積、大脳基底核サイズ、大脳基底核体積、前頭葉体積、頭頂葉体積、後頭葉体積、および／または側頭葉体積が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、神経解剖学的バイオマーカーには、電気的衝撃、シナプス発火、神経動態、および／または脳血流が含まれるが、これらに限定されない。当業者は、多数の分析検査を使用して、上記に記載された構造的または機能的神経解剖学的バイオマーカーのいずれかをアッセイすることができる。例えば、幾つかの実施形態において、神経解剖学的バイオマーカーは、X線、陽電子放射型断層撮影法(PET)、PIB-PET、F18 PET、単一光子放射型コンピューター断層撮影法(SPECT)、磁気共鳴画像法(MRI)、機能的磁気共鳴画像法(fMRI)、拡散テンソルMRI(DTMR)、拡散強調MRI(DWMRI)、灌流強調MRI(PWMI)、拡散灌流強調MRI(DPWMI)、磁気共鳴分光法(MRS)、脳波記録法(EEG)、脳磁気図検査法(MEG)、経頭蓋磁気刺激法(TMS)、深部脳刺激法(DBS)、レーザードップラー超音波法、光学的断層撮影画像法、コンピューター支援断層撮影画像法(CT)、および／または構造的MRI(sMRI)を使用してアッセイされ得る。上記に記載されたアッセイ方法を、蛍光もしくは放射標識化合物、抗体、オリゴヌクレオチド、タンパク質、または代謝産物のような造影試薬を用いて、または用いることなく使用することができる。

20

【0109】

実施例セクションにおいて考察されるように、異なる発生的プロファイリングは、サンフィリポ症候群の発生的バイオマーカーを確認することに成功裏に使用された。特に、特定の発生的特色および／または表現型がサンフィリポ症候群の存在と関連し得ることが発見されている。したがって、発生的バイオマーカー単独またはタンパク質バイオマーカーと一緒に分析を、サンフィリポ症候群の危険性を評価するため、サンフィリポ症候群の存在を検出するため、サンフィリポ症候群の進行または寛解をモニターするため、および／または治療応答もしくは最適化をモニターするために用いることができる。

30

【0110】

サンフィリポ症候群の診断

発現プロフィールがサンフィリポ症候群と相關する1つ以上のバイオマーカーは、サンフィリポ症候群を診断することができる、異なる種類のサンフィリポ症候群(サンフィリポA、B、C、もしくはD)を区別することができる、異なる病期を識別することができる、疾患の重篤度を決定することができる、および／またはサンフィリポ症候群を発生する危険性を評価することができる、と考慮される。したがって、幾つかの実施形態において、本発明は、本明細書に記載されているバイオマーカーの発現レベルを測定し、対象が

40

50

サンフィリポ症候群を有するか、サンフィリポ症候群を発生する危険性があるかを決定する、または症候群の重篤度を決定するため、サンフィリポ症候群を有すると疑われる対象から得た生物学的試料を分析する方法を提供する。典型的には、そのような方法において、対象から得た生物学的試料において決定または測定されたバイオマーカーのレベルは、1つ以上の対照レベルと比較される。バイオマーカーの多様な対照レベルを使用することができる。例えば、適切な対照レベルは、サンフィリポ症候群を有さない対照対象の1つ以上のバイオマーカーのレベルを示すことができる。そのような対照レベルは、1人以上の健康な対照対象から得た対照試料と同じ条件下で1つ以上の対応するバイオマーカーを同時に測定することによって得ることができる。適切な対照試料は、1人の健康な対照個体から得ることができ、または複数の健康な対照個体からプールすることができる。幾つかの実施形態において、健康な個体のバイオマーカーのレベルを示す対照レベルは、有意な数の個体から得ることができ、平均が得られる。典型的には、健康な対照個体は、類似の年齢または他の発達状態の個体である。幾つかの実施形態において、バイオマーカーの適切な対照レベルは、履歴データに基づいた参照数値であり、履歴対照（すなわち、予め実施された検査もしくはアッセイ、または予め知られている量もしくは結果のもの）とも呼ばれる。幾つかの実施形態において、対照レベルは、印刷された、そうでなければ保存された記録である、または記録を含む。幾つかの実施形態において、適切な対照レベルと比較された1つ以上のバイオマーカーの統計的な有意性を有する上昇したレベルは、対象がサンフィリポ症候群を有すること、サンフィリポ症候群を発生する危険性があることを示す。幾つかの実施形態において、適切な対照レベルと比較された1つ以上のバイオマーカーの統計的な有意性を有する減少したレベルは、対象がサンフィリポ症候群を有すること、サンフィリポ症候群を発生する危険性があることを示す。多様な統計技術および分析方法を使用して、バイオマーカーが、統計的有意性のある（すなわち、差が不規則変動により引き起こされていない）上昇または減少レベルを有するかを決定することができる。例示的な統計技術および方法には、線形および二次判別分析、K最近傍が含まれるが、これらに限定されない。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、または3倍を超えて高い場合、上昇したレベルを有する。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を超えて低減した場合、減少したレベルを有する。

【0111】

幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群を罹患している対照対象の1つ以上の対応するバイオマーカーのレベルを示す対照レベルが使用され得る。そのような対照レベルは、1つ以上の対応するバイオマーカーを、対照個体から得た、または複数の対照個体からプールした対照試料と同じ条件下で同時に測定することにより得ることができる。幾つかの実施形態において、サンフィリポ症候群を罹患している対照対象において1つ以上の対応するバイオマーカーのレベルを示す対照レベルは、有意な数の個体から決定することができ、平均が得られる。典型的には、適切な対照個体は、同じ種類のサンフィリポ症候群を、実質的に同じ疾患および発達段階（例えば、同じ年齢で同様の疾患症状）で罹患している。幾つかの実施形態において、適切な対照レベルは、サンフィリポ症候群を有する、サンフィリポ症候群を発生する危険性がある、またはサンフィリポ症候群の保菌者である対象と相關する履歴データ（すなわち、予め実施された検査もしくはアッセイ、または予め知られている量もしくは結果のもの）に基づいた確立された閾値の数値であり得る。これらの実施形態において、適切な対照レベルと比較した生物学的試料において測定された1つ以上のバイオマーカーの統計誤差許容範囲内で実質的に類似しているレベル、または統計的有意性を有する上昇もしくは減少したレベルは、対象がサンフィリポ症候群を有すること、またはサンフィリポ症候群を発生する危険性があることを示す。本明細書に記

10

20

30

40

50

載されたような多様な統計方法および技術を使用して、統計誤差許容範囲および統計的有意性を決定することができる。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、または3倍を超えて高い場合、上昇したレベルを有する。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または 95% を超えて低減した場合、減少したレベルを有する。

【0112】

10

幾つかの実施形態において、生物学的試料における 1 つ以上のバイオマーカーの上昇または減少したレベルを使用して、症候群の重篤度を決定することができる。幾つかの実施形態において、1 つ以上のバイオマーカーの上昇または減少したレベルは、症候群の重篤度および / または段階を決定するために定量化される。

【0113】

治療の確認またはモニター

本発明は、対象において、治療の効果を評価する、治療の応答性、疾患経過の予後、および疾患進行の測定をモニターする方法を提供する。典型的には、そのような方法において、1 つ以上の時点で対象から得た生物学的試料のために決定された適切なバイオマーカー（例えば、表 1 から選択されたもの、および GAG のような他の既知のマーカーなど）のレベルは、1 つ以上の他の時点で対象から得たレベルと比較される。例えば、バイオマーカーのレベルは、治療期間の前または初めに測定され得る。バイオマーカーのレベルは、治療期間の全体にわたって 1 つ以上の時点で測定され、治療前または治療期間の初期時点のレベルと比較され得る。患者が治療に対して肯定的な応答を有するかを決定する適切な治療の確認もしくは選択、および / または治療の最適化は、これらの方法から得た情報を使用して導き出すことができる。

20

【0114】

30

例えば、本明細書に記載されている方法を使用して、熟練の医師は、本明細書に記載されている 1 つ以上のバイオマーカー（例えば、表 1 から選択されたもの、および GAG のようなサンフィリポ症候群のための他のバイオマーカー）の発現および / または活性レベルの決定を介して患者に提供された診断および病期分類に基づいて、それぞれの個体に適合した治療を選択および処方することができる。特に、本発明は、サンフィリポ症候群を早期に診断する非主観的手段を医師に提供し、そのことは、介入が最大の効果を有する可能性がある早期治療を可能にし、潜在的に疾患の進行を防止または遅延し、患者の生活の質を向上させる。所定の患者に適した治療レジメンの選択は、本明細書に記載されている本発明の方法により提供された診断 / 病期分類のみに基づいて行うことができる。代替的または追加的に、医師は、サンフィリポ症候群を診断し、その進展を評価する現存の方法に使用される他の臨床または病理パラメーターも考慮することができる。

【0115】

40

幾つかの実施形態において、本明細書に記載されている本発明の方法を、サンフィリポ症候群患者の治療応答をモニターするために使用することができる。典型的には、例えば、サンフィリポ症候群患者の 1 つ以上のバイオマーカーのレベルが、サンフィリポ症候群の治療を受けた後に測定される。次に、測定されたレベルは対照レベルと比較され、サンフィリポ症候群患者が治療に対して肯定的な応答を有するかが決定される。本明細書で使用されるとき、治療に対する「肯定的な応答」には、疾患症状の重篤度の低減、進行の遅延、疾患の寛解または治癒が含まれる。適切な対照レベルは、治療を受ける前の同じ患者から得た、または治療の初期時点で測定された 1 つ以上のバイオマーカーのレベルであり得る。幾つかの実施形態において、適切な対照レベルは、治療を受けない対照患者における 1 つ以上のバイオマーカーのレベルである。幾つかの実施形態において、そのような対照レベルは、有意な数の対照患者から決定することができ、平均が得られる。典型的には、

50

対照患者は、匹敵する疾患または発達段階の患者である。典型的には、適切な対照レベルと比較した1つ以上のバイオマーカーの統計的有意性を有する減少または上昇したレベルは、患者が治療に対して肯定的な応答を有することを示す。本明細書に記載されたような多様な統計方法および技術を使用して、統計的有意性を決定することができる。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、目的の関連する時点で得た生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、または95%を超えて低減した場合、減少したレベルを有する。幾つかの実施形態において、バイオマーカーは、生物学的試料において測定されたバイオマーカーのレベルが、対照レベルと比較して20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、1倍、1.2倍、1.5倍、1.75倍、2倍、2.25倍、2.5倍、2.75倍、または3倍を超えて高い場合、上昇したレベルを有する。

10

【0116】

本発明の独創的な方法を、全ての種類のサンフィリポ症候群（例えば、サンフィリポ症候群A、B、C、およびD型）、ならびにサンフィリポ症候群の多様な治療に適用することができる。特に、本明細書に記載されている独創的な方法は、酵素補充療法をサンフィリポ症候群の正しい治療として確認するために使用することができる。サンフィリポ症候群A型を非限定例として使用すると、医師は、治療として組み換えヘパランN-スルファターゼ（HNS）タンパク質を、本明細書に記載されている方法の使用により決定された1つ以上のバイオマーカーのレベルに基づいて患者に投与することができる。例えば、医師は、治療剤（例えば、HNSタンパク質のような補充酵素）の治療有効量、投与間隔、および／または経路を、本発明のバイオマーカーのレベルに少なくとも部分的にに基づいて決定することができる。

20

【0117】

本明細書で使用されるとき、用語「治療有効量」は、一般に、サンフィリポ症候群患者に意味のある利益を達成するのに十分な量、例えばそのようなリソーム蓄積病またはその症状を治療するためにリソーム酵素受容体またはこれらの活性を調節するのに十分な量（例えば、本発明の組成物を対象に投与した後の、「ゼブラ小体」または細胞空胞化の存在または発生の低減または排除）を意味する。本明細書に記載されているバイオマーカーのレベルを、適切な治療有効量を決定する因子として使用することができる。幾つかの実施形態において、バイオマーカーのレベルを、対象の他の特徴と組み合わせて使用することができる。そのような特徴には、対象の状態、疾患の重篤度、身体全体の健康状態、年齢、性別、および体重が含まれる。

30

【0118】

本明細書に記載されているバイオマーカーのレベルを、投与経路および／または間隔を決定する因子として使用することもできる。幾つかの実施形態において、バイオマーカーのレベルを、疾患の性質、重篤度、および対象の状態の程度のような他の因子と組み合わせて使用することができる。例えば、医師は、疾患の性質、重篤度、および対象の状態の程度のような他の因子を考慮して、または考慮することなく、本発明により測定されたバイオマーカーのレベルに応じて、治療剤（例えば、HNSタンパク質のような補充酵素）が、一定間隔で周期的に（例えば、1年に1回、半年に1回、5か月に1回、3か月に1回、隔月（2か月に1回）、毎月（1か月に1回）、隔週（2週間に1回）、毎週）髄腔内投与されることを推奨し得る。幾つかの実施形態において、医師は、疾患の性質、重篤度、および対象の状態の程度のような他の因子を考慮して、または考慮することなく、本発明により測定されたバイオマーカーのレベルに応じて、髄腔内投与が他の投与経路（例えば、静脈内、皮下、筋肉内、非経口、経皮、または経粘膜（例えば、経口もしくは経鼻））と一緒に使用されることも推奨し得る。

40

【0119】

多様な治療の期間にわたって、試料を1つ以上の時点で患者から得ることができ、適切なバイオマーカーのレベルを測定することができ、適切な対照レベルと比較することができる

50

。治療の用量および頻度を調整して、治療効力を最適化することができる。治療応答をモニターするのに適した試料には、脳脊髄液（CSF）、細胞、組織、全血（例えば、末梢血試料）、血漿、血清、血液、およびこれらの組み合わせが含まれ得るが、これらに限定されない。上記に記載された追加的な生物学的試料を使用することもできる。

【0120】

キット

本発明は、本発明の方法を実施するのに有用な多様な試薬および材料を含むキットを更に提供する。本明細書に記載されている診断／特徴決定／病期分類／モニター手順は、診断研究室、実験室、または開業医により実施され得る。本発明は、これらの異なる設定に使用することができるキットを提供する。

10

【0121】

例えば、本発明の方法によって、生物学的試料を特徴決定する、バイオマーカーのレベル（例えば、タンパク質もしくは核酸のレベル）を測定する、対象においてサンフィリポ症候群を診断する、サブタイプを確認する、重篤度を特徴決定する、疾患を病期分類する、および／または対象の治療応答をモニターするための材料および試薬を、キットに中に一緒に集めることができる。特定の実施態様において、本発明のキットは、1つ以上のバイオマーカー（例えば、表1から選択されたもの、GAG、ベータ-ヘキソサミニダーゼ、LAP1、LAP2のような他の既知のマーカー）のタンパク質または核酸発現レベルを特異的に検出する少なくとも1つ以上の試薬、および本発明の方法によりキットを使用するための使用説明書を含む。

20

【0122】

各キットは、好ましくは、手順を特異的にする試薬を含み得る。したがって、タンパク質マーカー（またはその類縁体もしくはフラグメント）を検出／定量化するため、タンパク質の発現レベルを特異的に検出する試薬は、タンパク質マーカー（またはその類縁体もしくはフラグメント）に特異的に結合する抗体であり得る。バイオマーカーをコードするポリヌクレオチド配列を含む核酸分子を検出／定量化するため、発現レベルを特異的に検出する試薬は、ポリヌクレオチド配列（例えば、cDNAまたはオリゴヌクレオチド）に相補的な核酸プローブであり得る。核酸プローブは、基質表面（例えば、ビーズ、マイクロアレイなど）に固定されていても、いなくてもよい。

30

【0123】

本発明のキットまたは他の製造品は、多様な試薬を保持する1つ以上の容器を含むことができる。適切な容器には、例えば、瓶、バイアル、シリンジ（例えば、充填済シリンジ）、アンプルが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックのような多様な材料から形成され得る。

【0124】

幾つかの実施態様において、本発明のキットは、適切な対照レベル、または本明細書に記載されている対照レベルを決定するための対照試料を含むことができる。幾つかの実施形態において、本発明のキットは、本発明の1つ以上のことによりキットを使用するための使用説明書を含むことができ、対象から得た生物学的試料を処理するため、および／または検査を実施するための使用説明書、結果を解釈するための使用説明書、ならびに医薬もしくは生物学的製剤の製造、使用、もしくは販売を規制する行政機関（例えば、FDA）により規定された形式の通知を含むことができる。

40

【0125】

本発明は、以下の実施例を参照することにより、より完全に理解される。しかし、これらは本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。全ての引用文献は参照として組み込まれる。

【実施例】

【0126】

実施例

実施例1：MPS IIIAの自然歴研究および発生的評価

50

上記において考察されたように、ムコ多糖症 I II (MPS - I II) は、サンフィリポ症候群としても知られており、グリコサミノグリカン (GAG) のヘパラン硫酸を分解するために必要な酵素の 1 つの欠如により引き起こされる、まれな常染色体劣性リソソーム蓄積症である。ヘパラン硫酸は、重要な細胞表面糖タンパク質であり、細胞外マトリックスを形成および維持する重要な成分である。4 つの異なる種類の MPS - I II (サンフィリポ症候群) が確認されており、MPS - I II A、B、C および D (すなわち、サンフィリポ症候群 A、B、C、および D) である。4 つの MPS - I II 型は、それぞれ実質的に類似した臨床症状を示すが、それぞれ異なる酵素欠如によって区別される。MPS - I II A (サンフィリポ症候群 A) は、ヘパラン N - スルファターゼ遺伝子において発見された、酵素機能を低減する 70 個の異なる可能な突然変異の結果として生じることが示されている。MSP - I II B (サンフィリポ症候群 B) は、酵素 N - アセチル - アルファ - D - グルコサミダーゼの破損に関連しており、MPS - I II C (サンフィリポ症候群群 C) は、アセチル - CoA : アルファ - グルコサミニドアセチルトランスフェラーゼに関連しており、MPS - I II D (サンフィリポ症候群 D) は、酵素 N - アセチルグルコサミン - G - スルフェートスルファターゼに関連しており、すべてヘパラン調節に関与している。その結果、それぞれの酵素欠陥は、サンフィリポ症候群患者においてヘパラン硫酸の蓄積を引き起こす。

10

20

30

40

【0127】

病理学的カスケードは不十分にしか理解されていないが、ヘパラン硫酸の一次蓄積は、毒性代謝産物の二次蓄積、神経性炎症、破損された増殖因子シグナル伝達、無調節な細胞死を誘発する。サンフィリポ症候群患者の臨床的特徴は、圧倒的に神経性のものである。典型的には、サンフィリポ症候群患者は、正常な初期乳児期を有する。発育の遅延が、多くの場合に疾患の最初の発症である。幾つかの行動障害が、中期小児期における顕著な特徴である。次に、進行性認知症が、離脱および発達退縮の「無症候段階」をもたらす。典型的には、サンフィリポ症候群患者は、十代後半または二十代前半まで生存する。

【0128】

サンフィリポ症候群の基礎となる病理をより良好に理解するため、本発明者たちは、MPS - I II A の自然歴研究を実施した。この研究は、MPS - I II A の臨床疾患スペクトルの病識を得て、理解を深めるための、治験治療を用いない、観察に基づいた研究であった。研究の第二の目標は、12か月の期間にわたって疾患の進行をモニターするために使用できる一連の臨床的に定義可能なパラメーターを確定することであった。この手法を使用して、本発明者たちは、将来の実験療法のための臨床試験に適用可能な候補臨床終点を確認することができた。

30

【0129】

この研究のため、MPS - I II A の診断が確定された合計で 25 人の地域的に異なる疾患対象（男性 16 人および女性 9 人）を動員した。各 MPS - I II A 対象は、暦年齢および発育年齢がそれぞれ 1 年を超えることが求められた。研究の対照群は、北アメリカ全土から広い地域分布を有する 20 人の若年健康成人対象から構成された。評価は、1 年の期間で 6 か月毎に実施した。各 MPS - I II A および対照患者は、包括的神経発生評価および脳画像化を受けた。

40

【0130】

発生評価は、Bayley Scales of Infant Development III (BSID) または Kaufman Assessment Battery for Children (KABC) の手法のいずれかを使用して実施した。BSID および KABC の方法では、両方とも、総精神年齢等価物 (MA) が全ての参加者から月齢で計算された。対象の発達指数 (DQ) は、対象の精神年齢等価物を月齢の暦年で割ることにより決定した： $DQ (\%) = (MA / CA) \times 100$ 。この研究では、発達分析を合計 23 人の対象で実施した。第一群は 17 人の対象からなり、それぞれ 6 歳前に MPS - I II A を診断されており、平均 DQ が 26 ± 18 であった。第二群は 6 人の対象からなり、それぞれ 6 歳後に MPS - I II A を診断されており、平均 DQ が 52 ± 2

50

7 であった。データは、各対象の暦年齢を実験的に決定された精神年齢 (M A) (図 1) および発達指数 (D Q) (図 2 ~ 3) と比較して分析した。

【0131】

脳画像化は、非コントラスト M R I を使用して各対象において実施した。この研究では、脳走査を合計 23 人の対象で実施した。第一群は 17 人の対象からなり、それぞれ 6 歳前に M P S - I I I A を診断されており、平均年齢が 4.3 ± 1.7 歳であった。第二群は 6 人の対象からなり、それぞれ 6 歳後に M P S - I I I A を診断されており、平均年齢が 10.7 ± 3.7 歳であった。収集された画像を使用して、自動体積分析を Free Surfer ソフトウェアの使用により実施した (図 4)。この研究の脳体積は、灰白質体積、白質体積、皮質体積、脳室 + C S F の体積、小脳体積、および総脳体積) のような幾つかの異なる解剖学的基準を評価することにより評価した。データは、M P S - I I I A 対象の暦年 (図 5 ~ 10) および発達段階 (図 11 ~ 14) と比較したときの、経時的な脳体積の変化における可能な相関を評価して分析した。

【0132】

観察

この研究の知見に基づいて、幾つかの主要な傾向が観察された。第 1 には、対象のベースライン発達段階と年齢の比較は、6 歳前または後で診断された M P S - I I I A 患者において異なった可能な年齢関連低下を明らかにした (図 1 ~ 3)。これらの知見は、後期発症が診断されたこれらの対象が遅延した疾患進行を有し得ることも示唆している。このデータは、6 歳前に診断されたこれらの患者がおよそ 30 月齢の精神年齢で見掛けの平坦を示すことも示唆している (図 2 および 3)。6 歳の前および後で診断された小児が疾患進行の異なるパターンを示すので、後期診断は、表現型および予後の差の代用物であり得ることを示唆する。このことは、6 歳前に M P S - I I I A が診断された対象において、潜在的な皮質体積の減少および脳室 + C S F の合計体積の増加があることを示唆する脳体積の分析により、潜在的に更に支持される。

【0133】

第 2 には、脳体積と発達状態の比較は、M P S - I I I A が診断された対象において、脳室 + C S F の合計体積の低減を伴う D Q 指数の減少があることを示唆している。この低減は、年齢が 6 歳の前および後で診断された両方の対象で観察され、関係が疾患の発症と無関係であることを示唆している。更に、データは拡大された脳室に関連して皮質の灰白質における可能な損失も示唆している。

【0134】

実施例 2 : C S F G A G レベルの特徴決定

この研究の目的は、脳におけるヘパラン硫酸グリコサミノグリカン (G A G) の病的蓄積が、M P S - I I I A 患者の脳脊髄液における上昇した G A G レベルを反映するかを決定することであった。この研究のため、M P S - I I I A の診断が確定された合計で 25 人の地域的に異なる疾患対象を動員した。各 M P S - I I I A 対象は、暦年齢および発育年齢がそれぞれ 1 年を超えることを求められた。研究の対照群は、北アメリカ全土から広い地域分布を有する 20 人の若年健康成人対象から構成された。評価は、1 年の期間で 6 か月毎に実施した。各対象は、腰椎髄腔内空間から脳脊髄液 (C S F) を得るために腰椎穿刺を受け、試料を直ぐに 1 m l のアリコートにより -80° で凍結した。実験のために選択された生物学的流体は脳脊髄液であり、それはこの媒質が中枢神経系を浸しており、その構成成分が中枢神経系の構成成分と動的平衡で存在するからである。

【0135】

脳脊髄グリコサミノグリカンレベルは、標準 G A G アッセイを使用して測定した。例えば、出願人により開発された G A G アッセイは、試料におけるグリコサミノグリカンの機能的属性を測定するために開発された手法である (図 15)。データは、脳脊髄液における G A G のレベルが有意に増加していることを示唆している。

【0136】

この実施例の結果は、C S F ヘパラン硫酸のレベルがサンフィリポ症候群患者において上

昇し、12か月まで比較的一定のレベルを維持すると思われることを示している。したがって、GAGレベルを、疾患の重篤度を特徴決定する、および治療応答をモニターする指標として使用することができる。

【0137】

実施例3：サンファリポ症候群のバイオマーカーの確認

実験的設計

本発明者たちは、患者におけるMPS-I II Aの神経病理学的な結果を反映するバイオマーカーを確認するため、詳細な分析を実施した。実験のために選択された生物学的流体は脳脊髄液であり、それはこの媒質が中枢神経系を浸しており、その構成成分が中枢神経系の構成成分と動的平衡で存在するからである。しかし、当業者は、幾つかの他の生物学的流体を異なるバイオマーカーの確認に使用できることを理解する。

10

【0138】

この研究のため、MPS-I II Aの診断が確定された合計で25人の地域的に異なる疾患対象を動員した。各MPS-I II A対象は、暦年齢および発育年齢がそれぞれ1年を超えることが求められた。研究の対照群は、北アメリカ全土から広い地域分布を有する20人の若年健康成人対象から構成された。評価は、1年の期間で6か月毎に実施した。各対象は、腰椎髄腔内空間から脳脊髄液(CSF)を得るために腰椎穿刺を受け、試料を直ぐに1mlのアリコートにより-80で凍結した。CSFの試料は、分析物特異的ビオチン化検出抗体を含有する蛍光マイクロビーズを使用するルミネックスに基づいたマルチプレックス化ビーズ系イムノアッセイ(参照として本明細書に組み込まれる、E1
shah et al., Methods, 2006, 38: 4, 317-323)の使用により分析した。プロテオミクス評価は、サービス提供者のRules-Based Medicine(RBM)が実施した。各試料を分析して、RBM Discovery Map 1.0、RBM OncoMap、およびcustom Neuro/LSD Multiplexからの245個の異なるタンパク質バイオマーカーのそれぞれのタンパク質濃度レベルを決定した。Neuro/LSD Multiplexは、以下の13個の分析物マーカーを含んだ：14-3-3タンパク質、ベータアミロイドの3形態、アルファ-シヌクレイン、ベータ-ヘキササミニダーゼ、グリア線維性酸性タンパク質、リポソーム関連膜タンパク質1、リポソーム関連膜タンパク質2、ミエリン塩基性タンパク質、タウ、ホスホ-タウ(p181)、およびユビキチンC末端ヒドロラーゼ1。

20

【0139】

異なるタンパク質バイオマーカーの確認

ビーズに基づいたイムノアッセイから生成されたデータを使用して、統計分析を実施し、サンファリポ症候群の異なるタンパク質バイオマーカーを確認した。分析では、245個のバイオマーカーのそれぞれが、判別分析と呼ばれる統計技術を使用して他のものと無関係であると考慮した。この方法において、各データポイントを目的の群に分類するため、分類規則がデータから生成される。このように、望ましい分類規則は、低い分類誤差率を有し、望ましいバイオマーカーを示す。理想的な条件下では、分類規則は1つのデータベースを使用して生成され、基準は、独立したデータベースにより検査される。しかし、これが可能ではなかったため、クロス確認誤差率は、1回に1つの観察を除外することにより分類規則を生成および検査して決定した。これは、分類誤差率のほぼ不偏の推定値を生じる。加えて、データは、また、高い次元を有する小型の試料データベースに適したK最近傍と呼ばれる無分布(またはノンパラメトリック)法を利用する、線形および二次判別分析を使用して分析した。用いたそれぞれの方法には、10%以下の分類誤差率のバイオマーカーを並行して提示した。この手法により、19個のバイオマーカー(表1)を確認し、これらの方法の少なくとも1つにより10%以下の分類誤差率を有した。19個の確認されたバイオマーカーのうち、肝細胞増殖因子、カルビンジンD、総タウ、およびリン酸化タウ(p181)は、全て、MPS-I II Aと対照対象の間で強く異なる発現を示した(図16~19)。現行の統計方法をこの実験に使用したが、当業者は、幾つかの他の統計方法を使用して、異なるバイオマーカーを確認できることを理解する(例えば、

30

40

50

参照として本明細書に組み込まれる、Wu et al., 2003, Bioinformatics, 19:1636-1643、Biswas et al., Statistical Advances in Biomedical Sciences; Clinical Trials, Epidemiology, Survival Analysis, and Bioinformatics, 2007、Azuaje, Francisco, Bioinformatics and Biomarker Discovery: "omic" data analysis for personalized medicine, 2010, John Wiley and Sonsを参照すること)。

【0140】

10

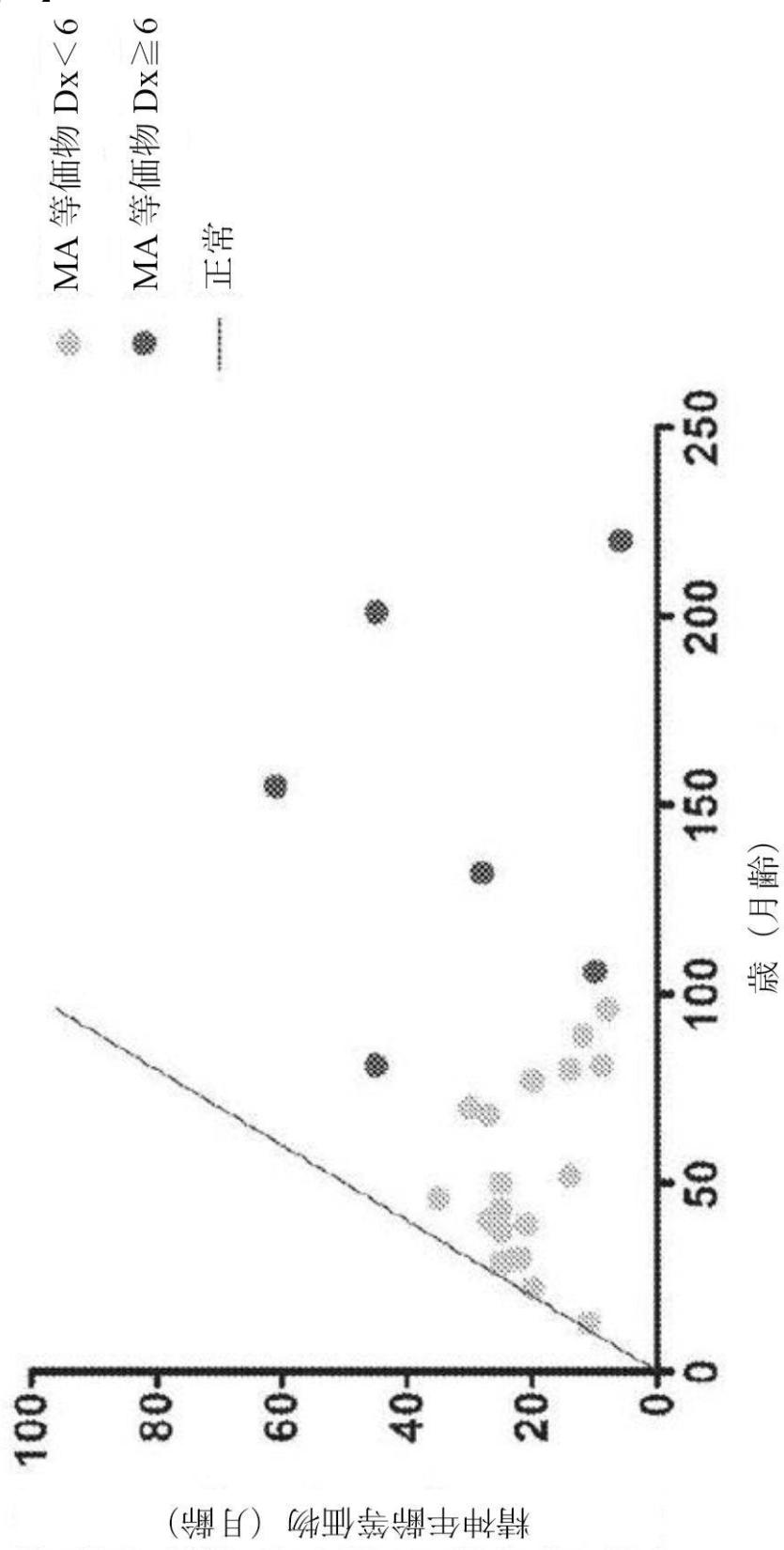
これらのバイオマーカーを、サンフィリポ症候群を特徴決定するため、特に疾患の重篤度、種類、および段階を決定するため、治療応答をモニターするため、ならびに／または治療若しくは療法の効力を評価するために使用することができる。

【0141】

均等物

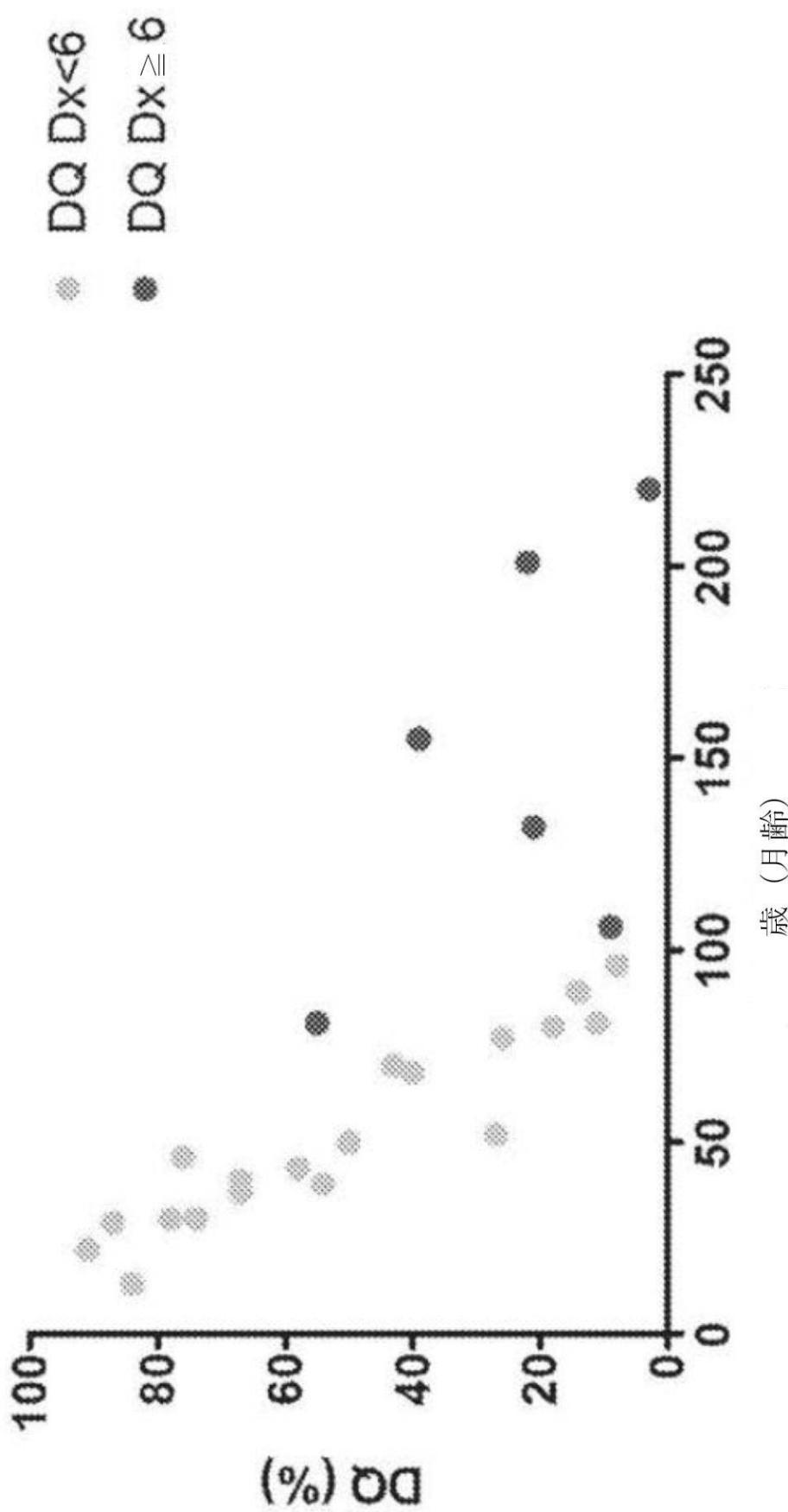
当業者は、日常的なものを越えない実験を使用して、本明細書に記載されている発明の実施形態に対する多くの均等物を認める、または確かめることができる。本発明の範囲は、上記の記載に限定されることを意図せず、むしろ以下の特許請求の範囲に記載されていとおりである。

【図1】

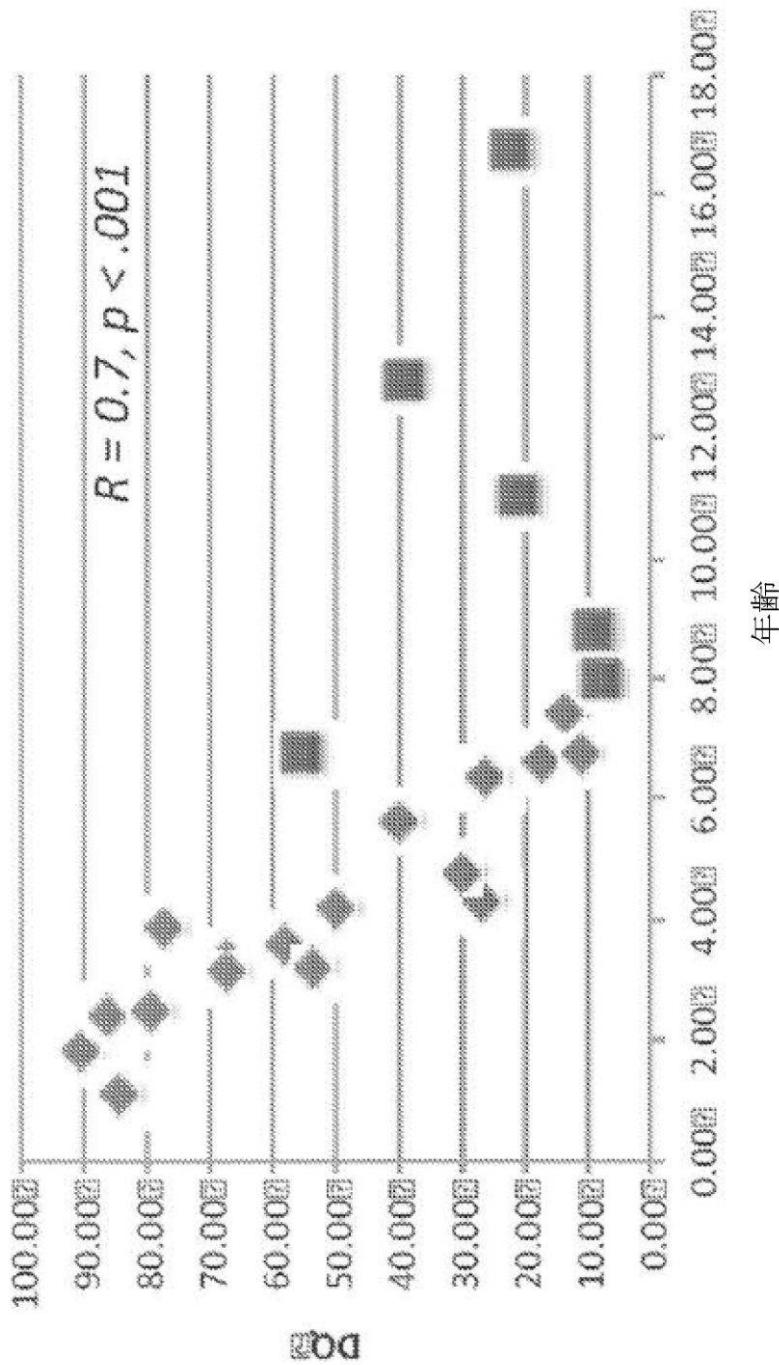


【図1】

【図2】

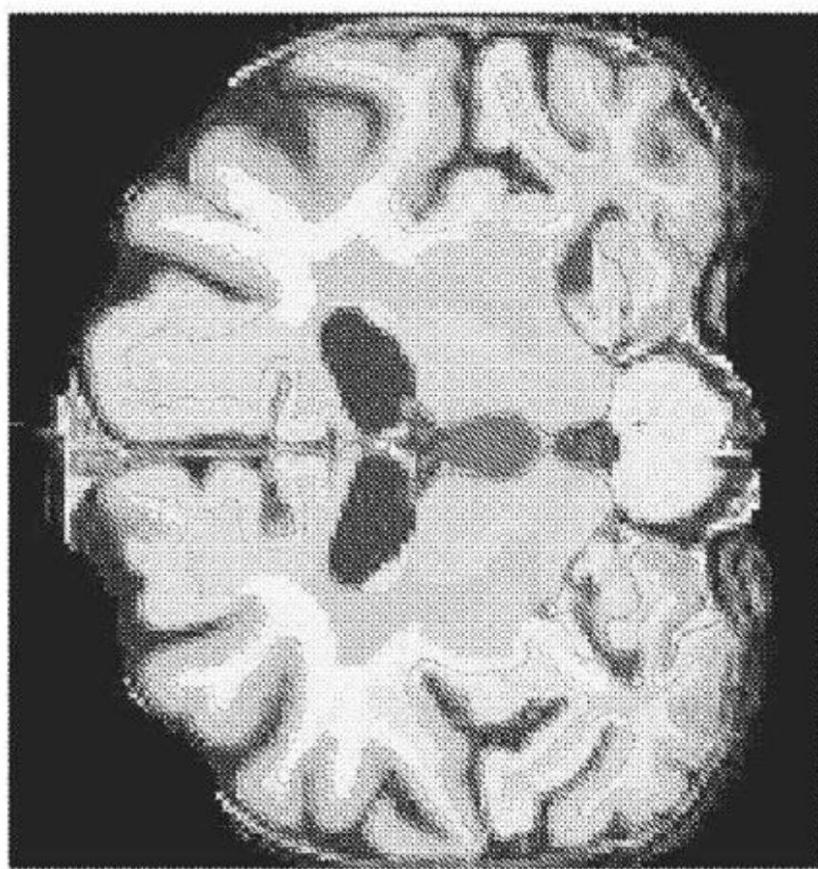


【図3】

DQ/ $\frac{歲}{歲}$ 

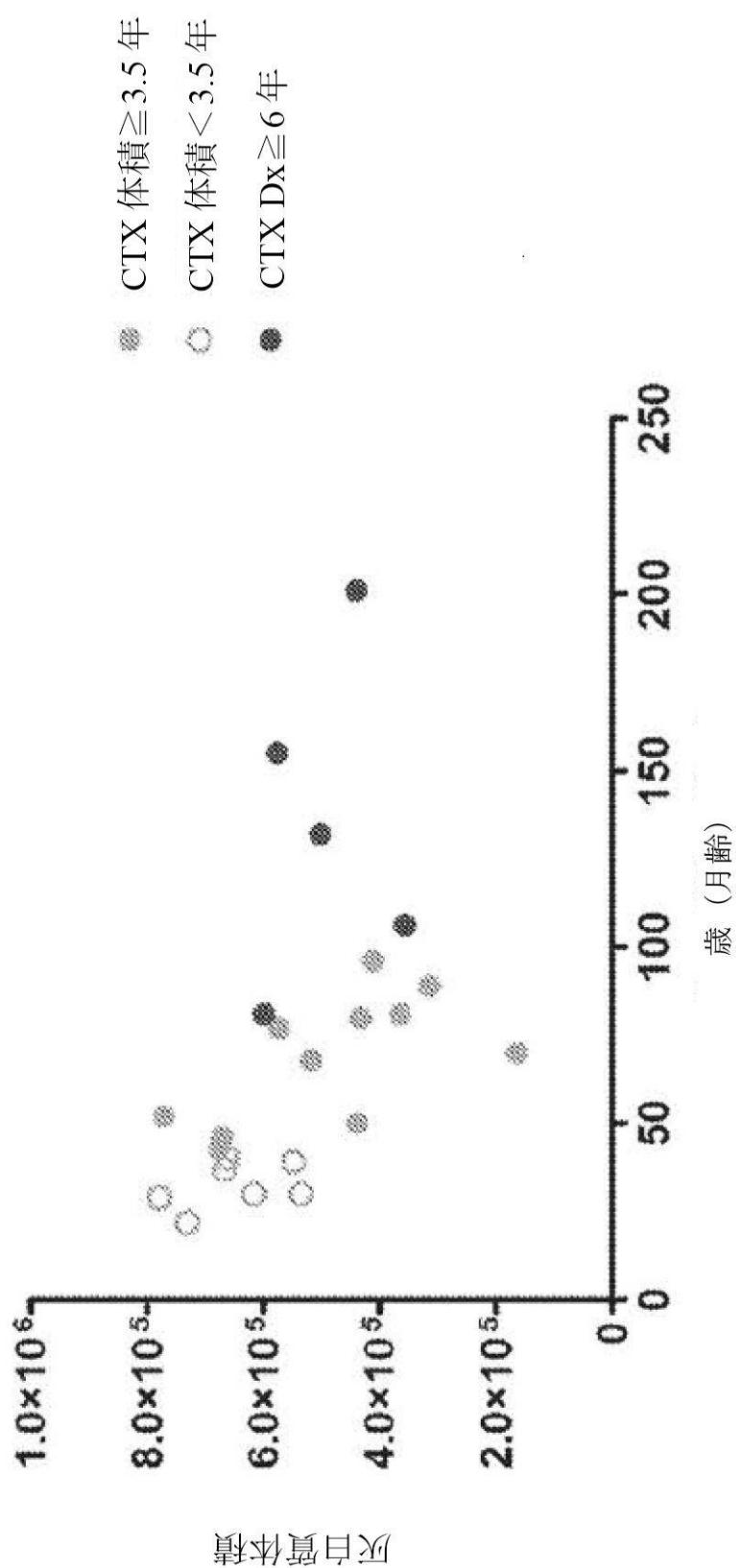
【図3】

【図4】

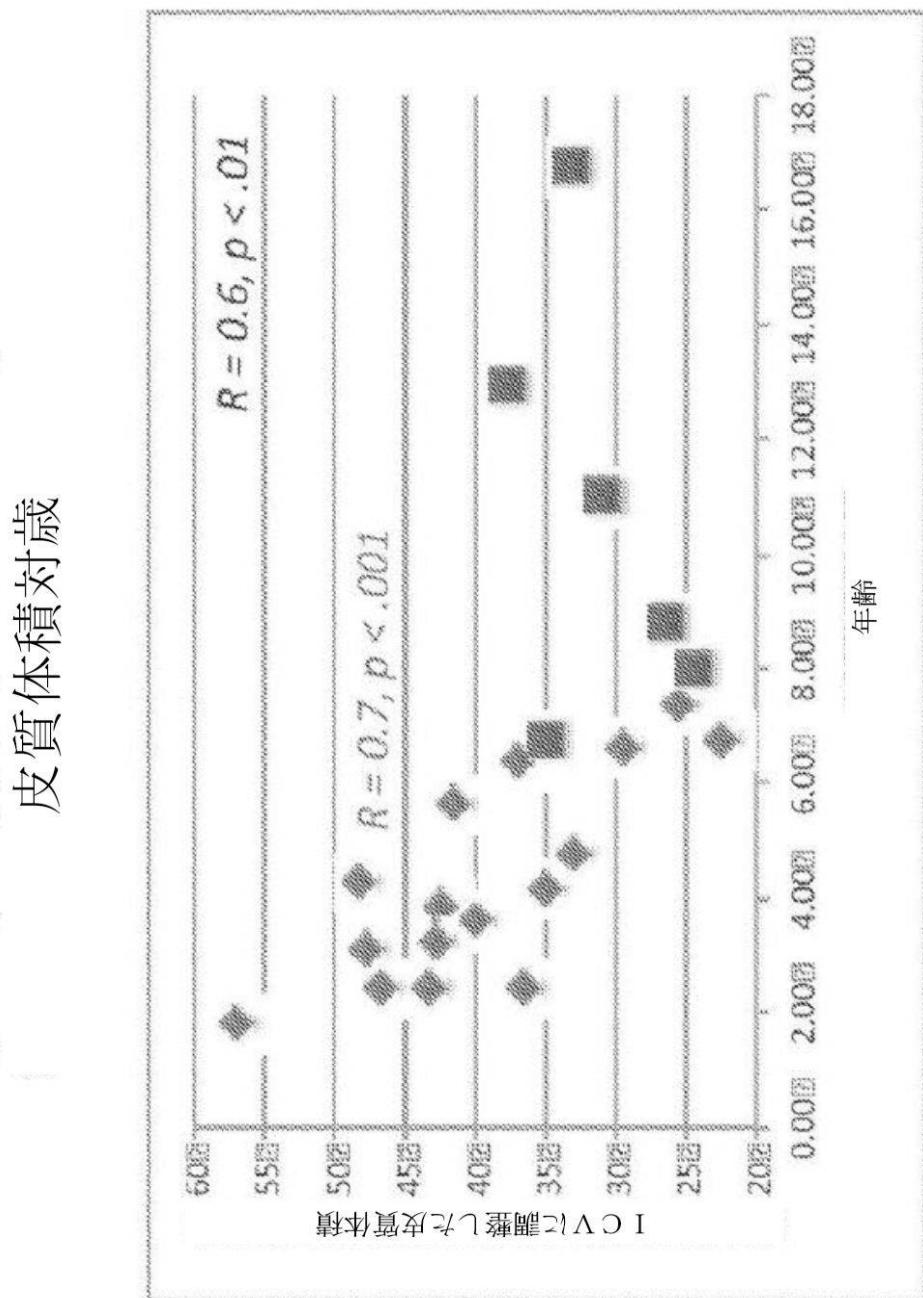


【図4】

【図5】



【図 6】



[図6]

【 四 7 】

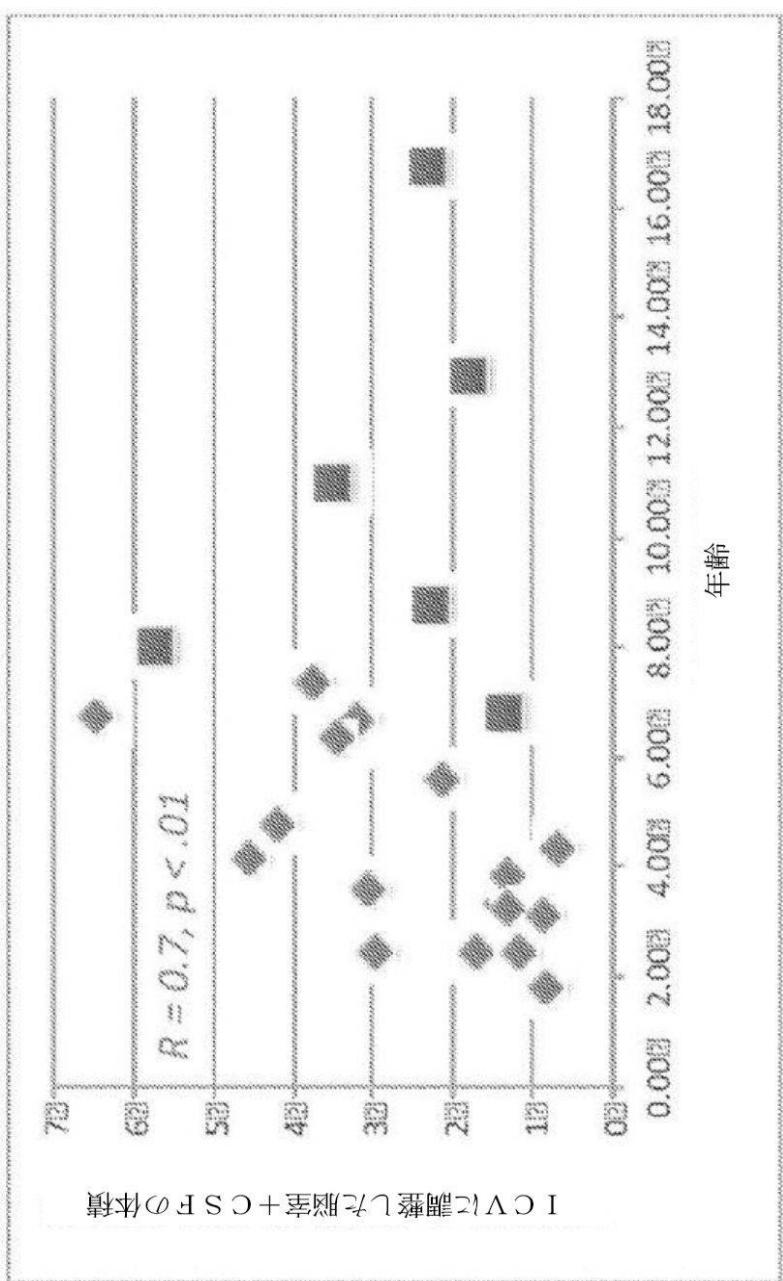
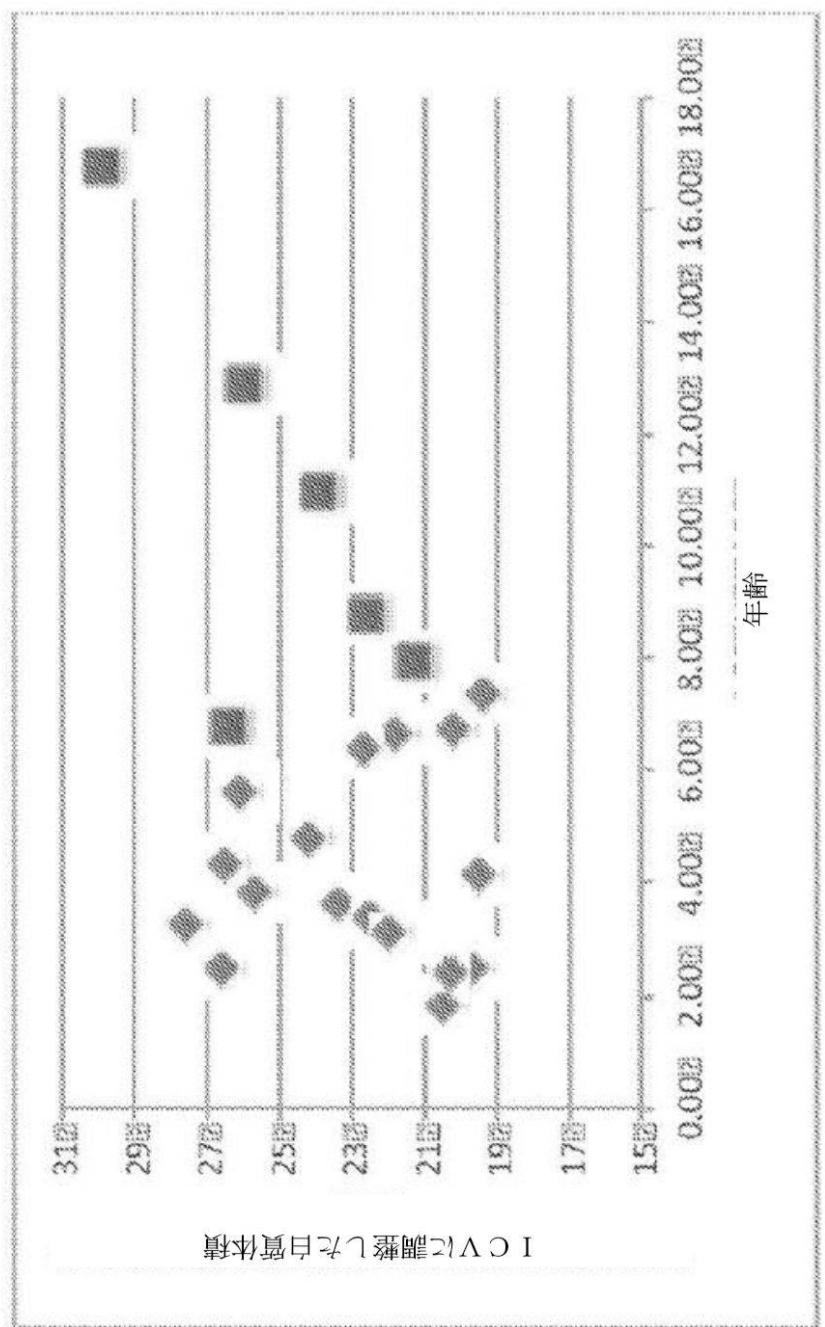


图7】

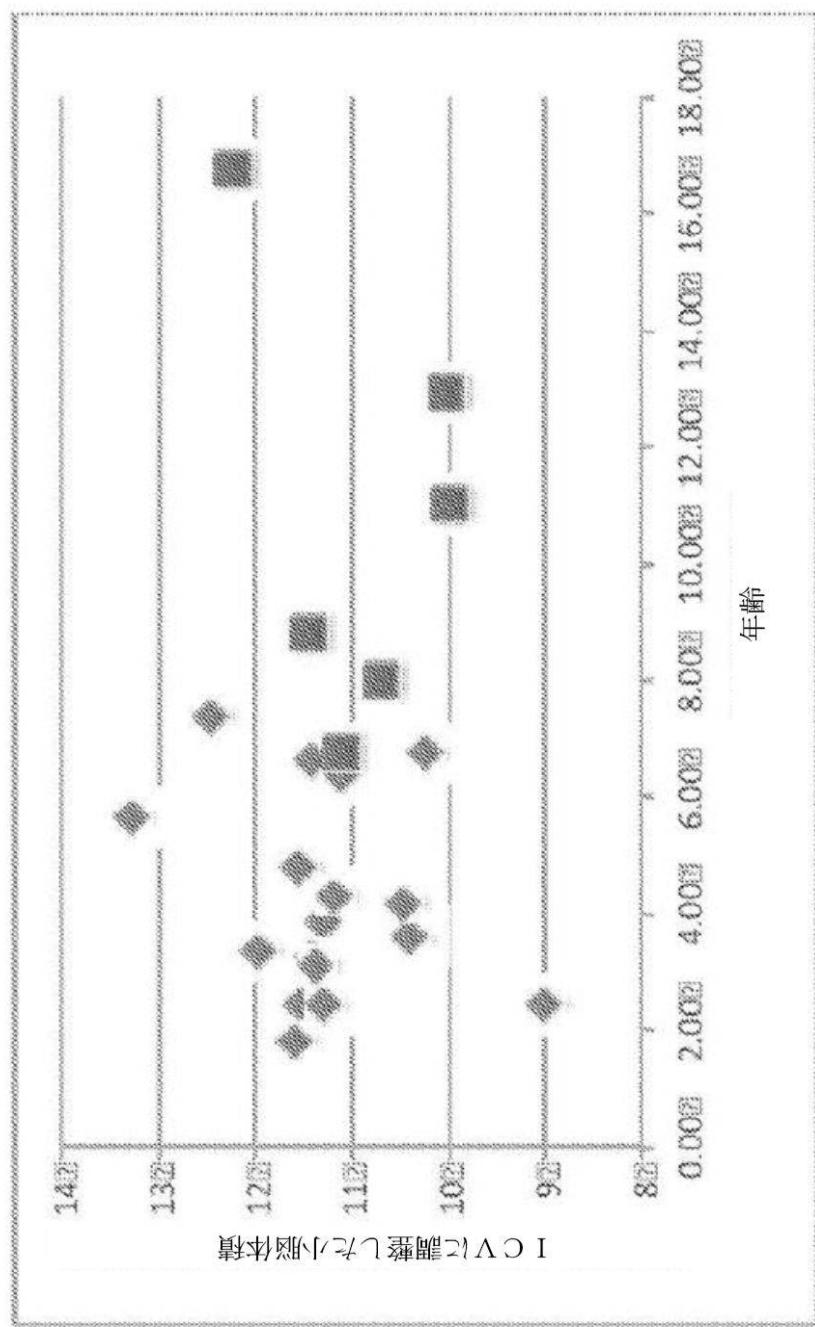
【図8】



[8]

【図9】

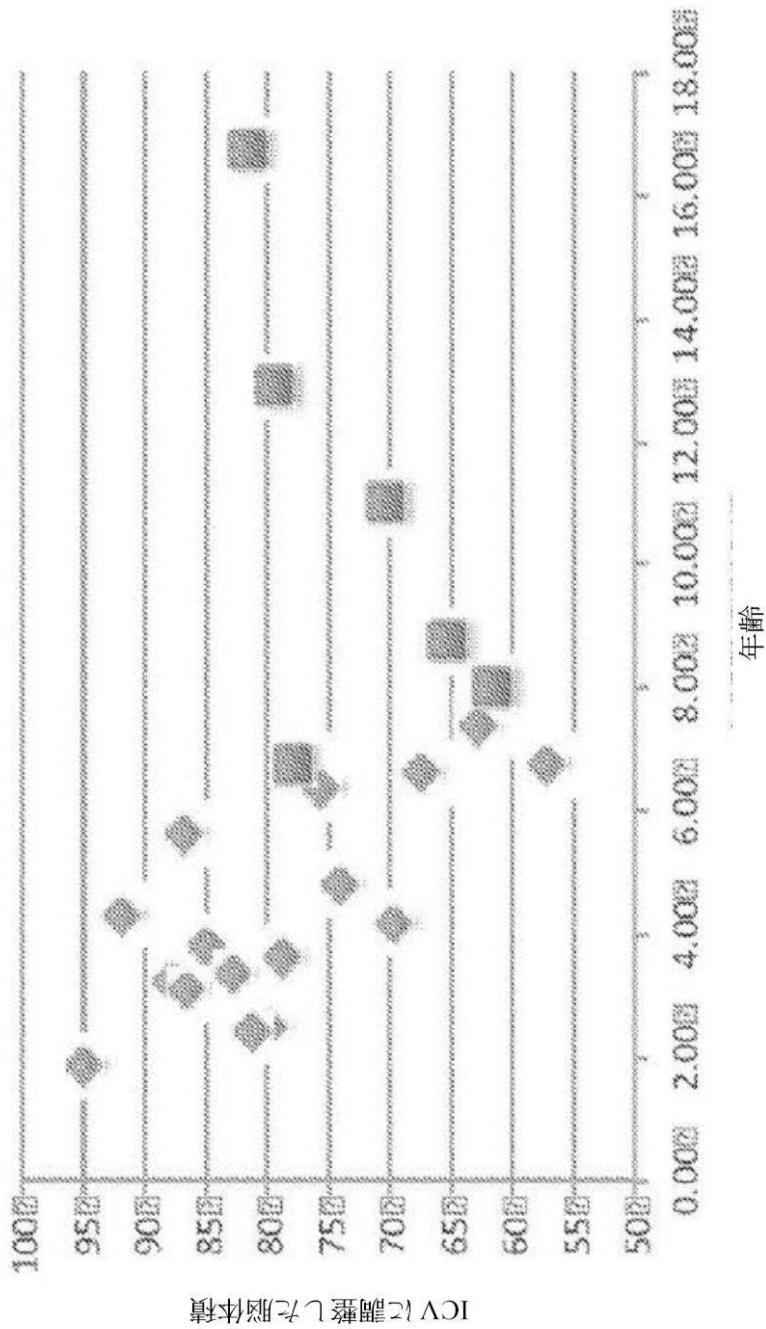
小脳体積対歳



【図9】

【図 10】

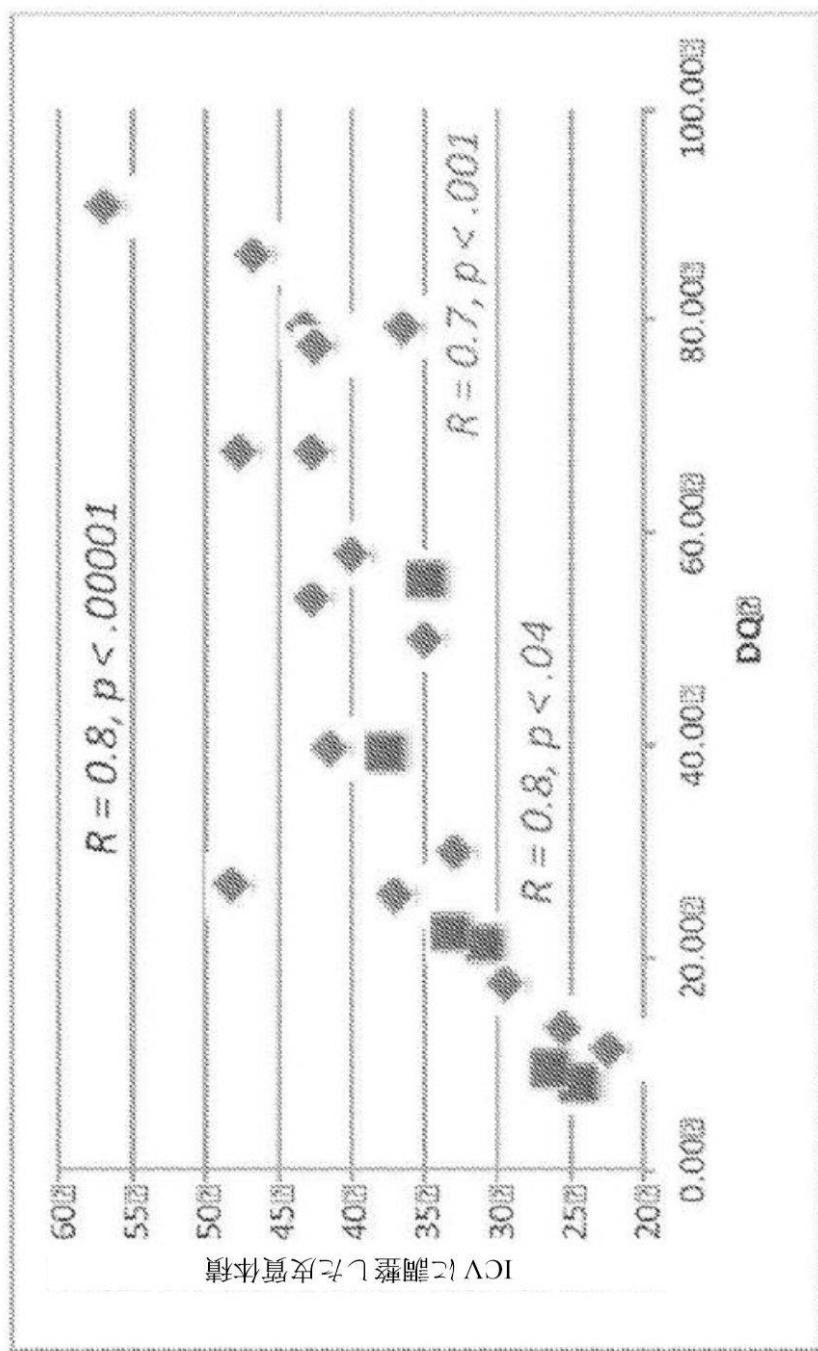
脳体積対歳



【図 10】

【図11】

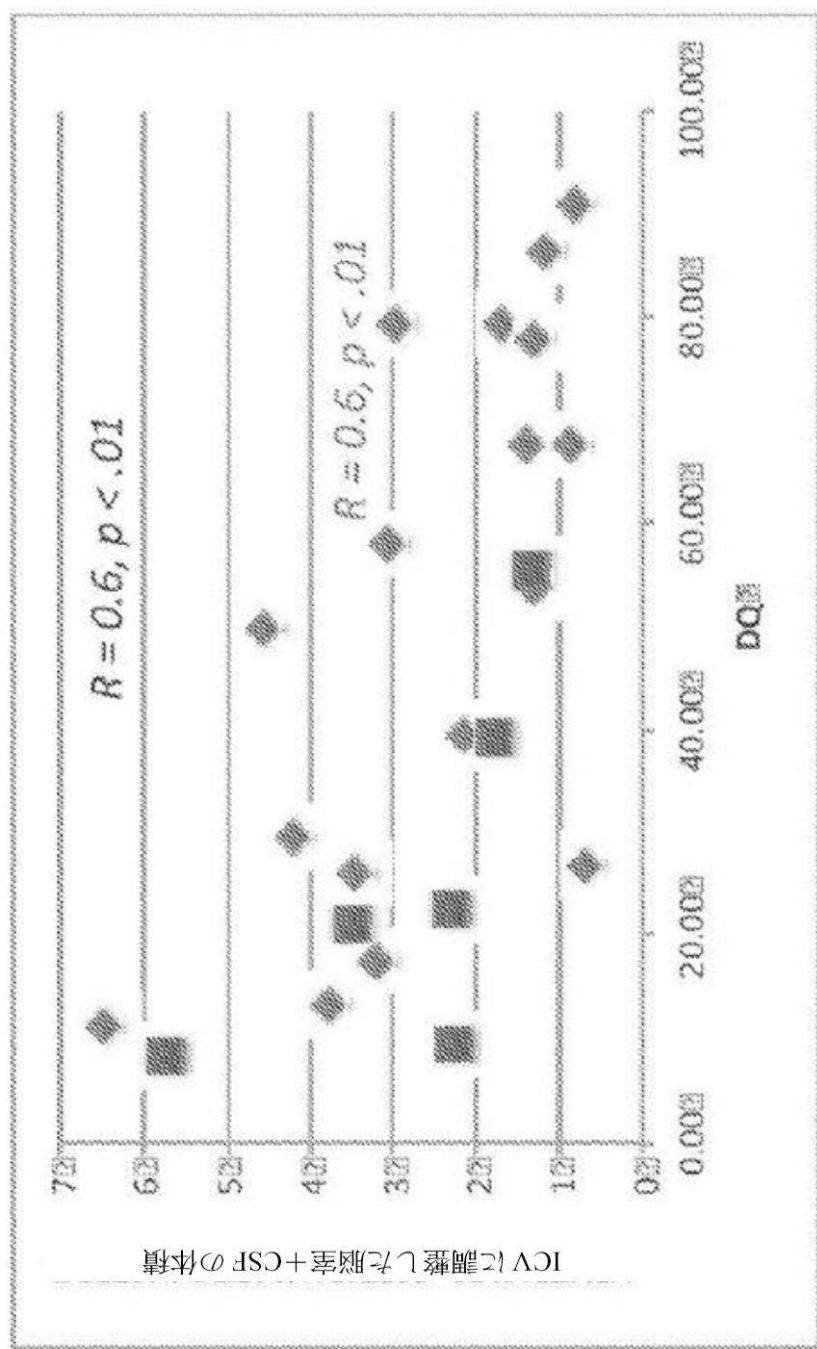
皮質体積対DQ



【図11】

【図 12】

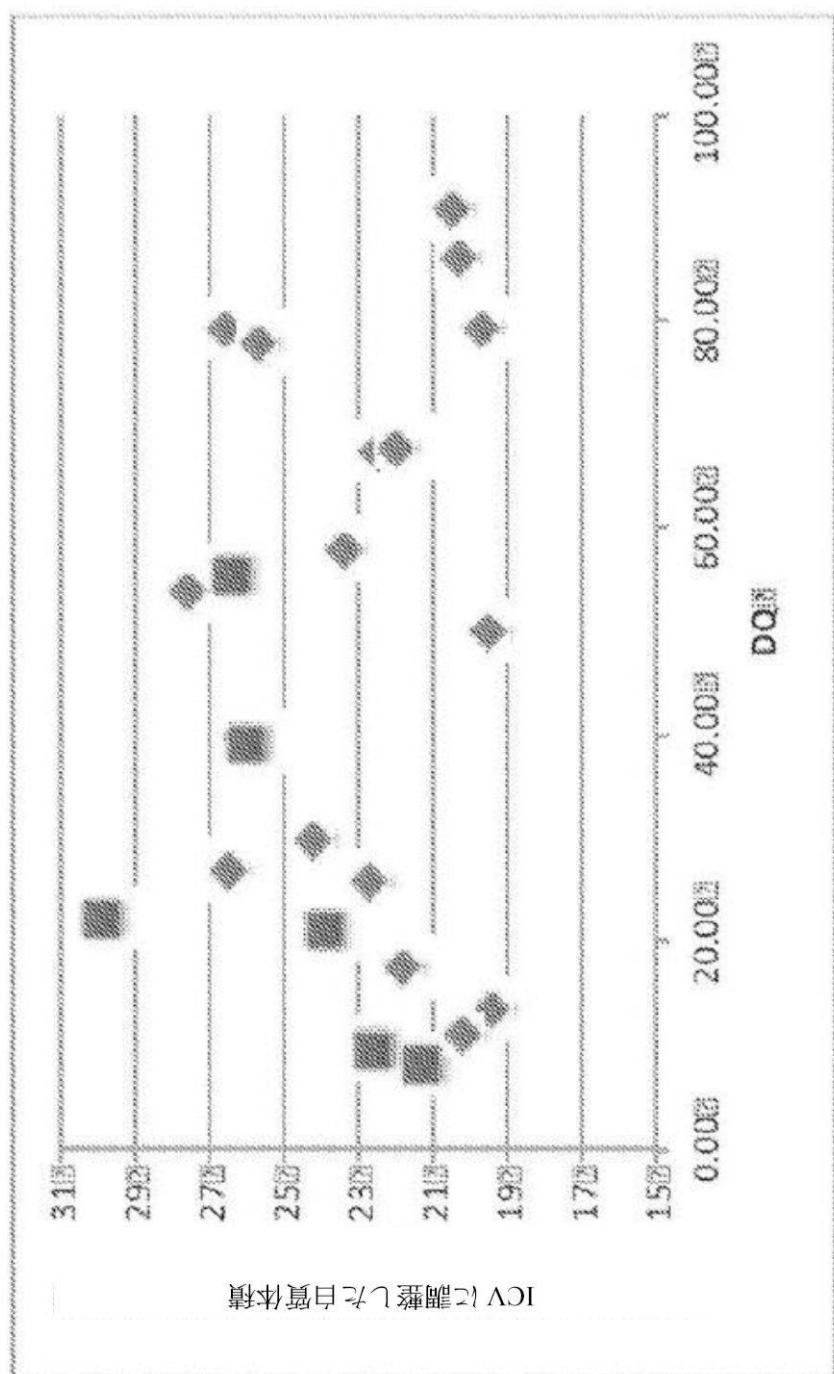
脳室+CSF の体積対 DQ



【図 12】

【図13】

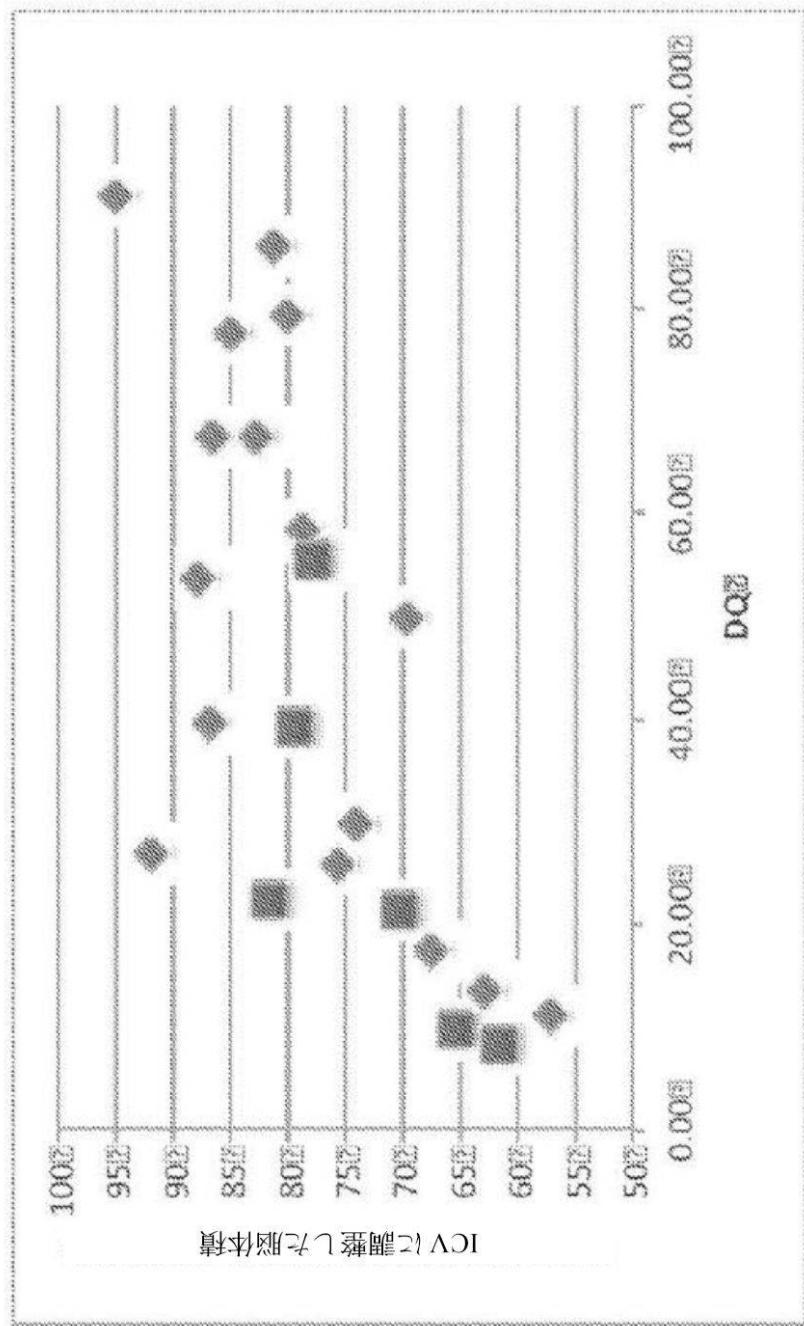
白質体積対DQ



【図13】

【図14】

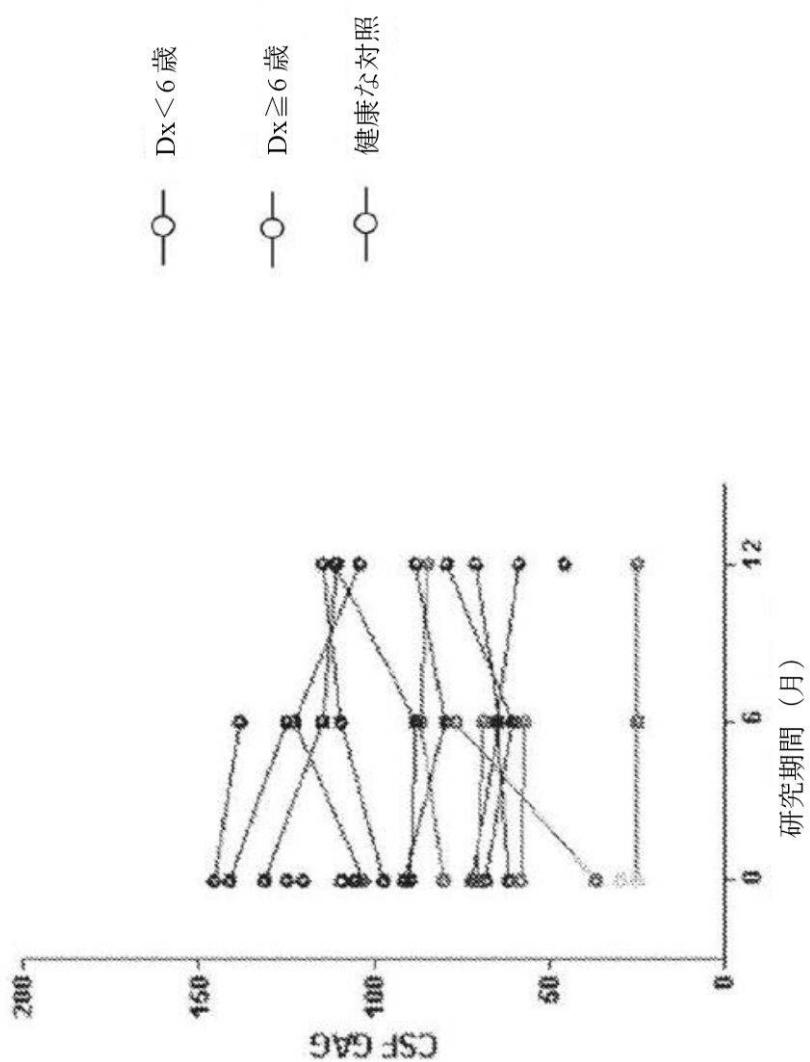
脳体積対DQ



【図14】

【図15】

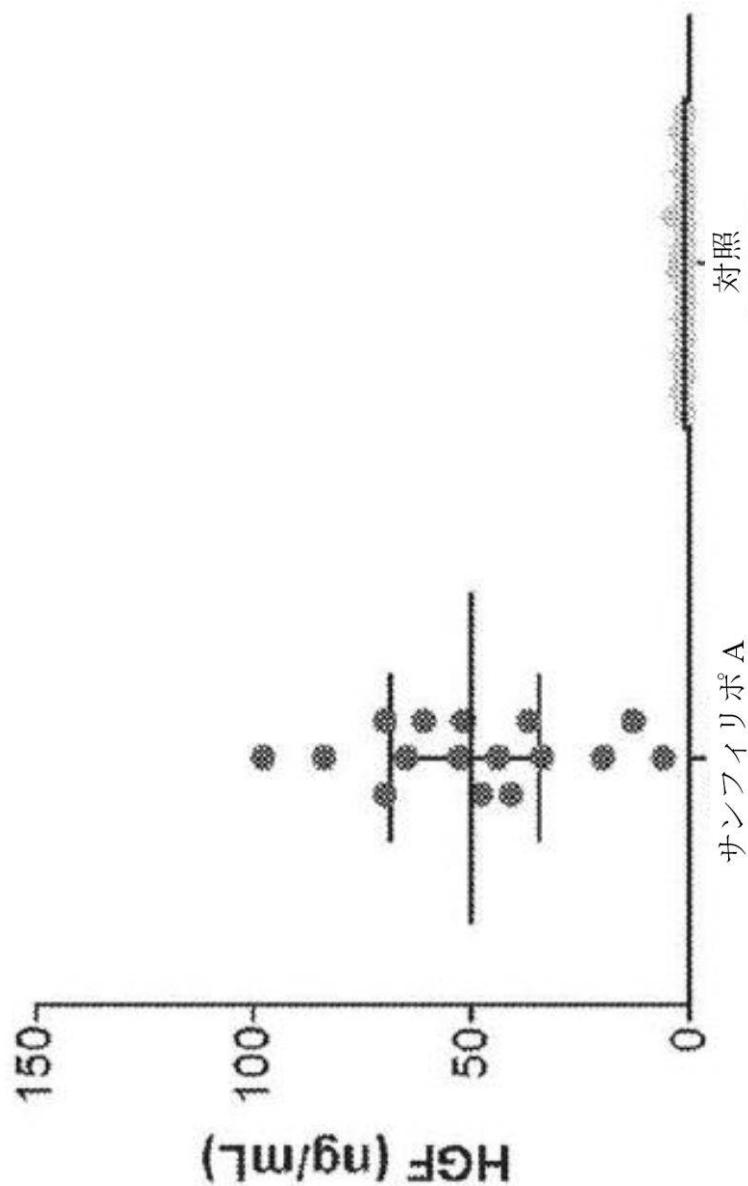
Shire アッセイ



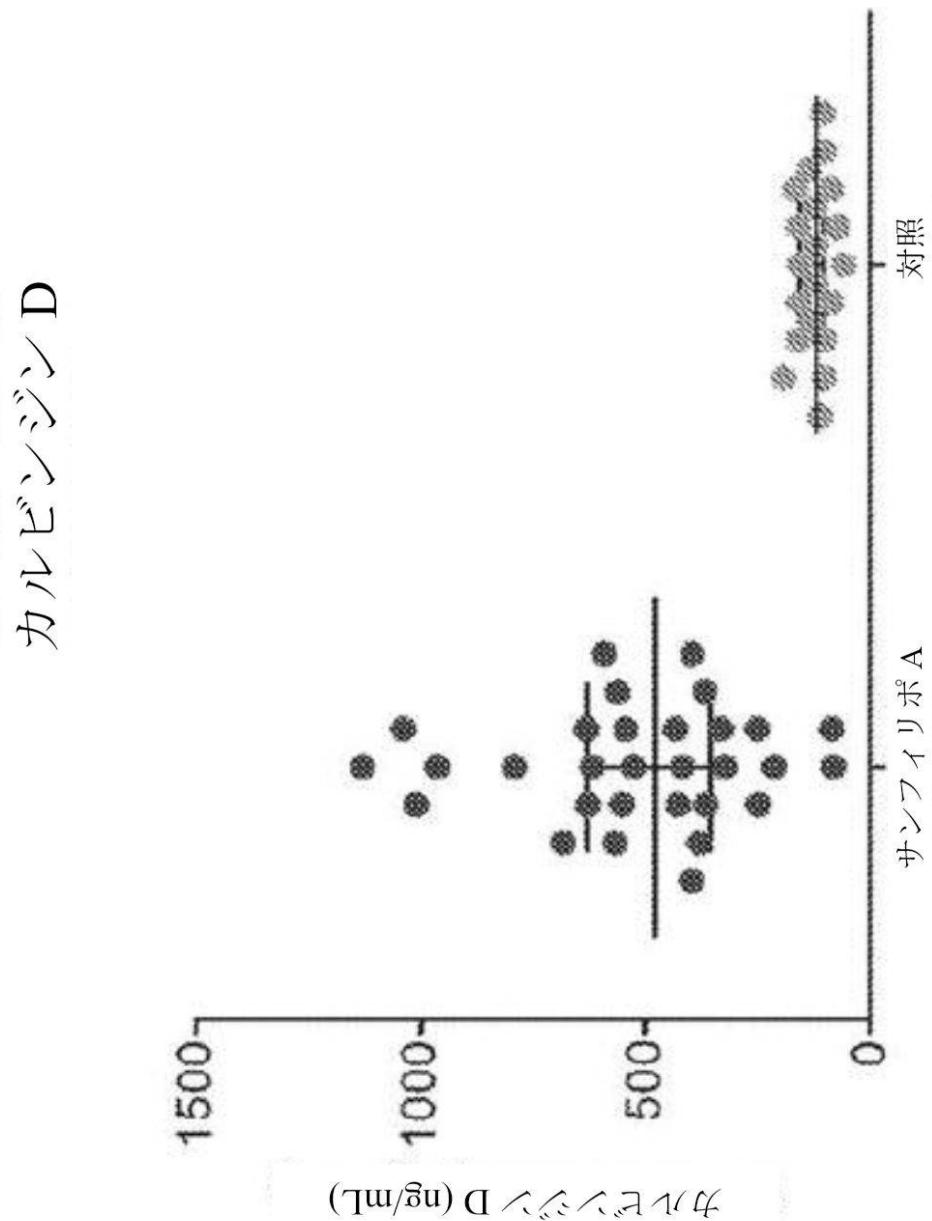
【図15】

【図16】

肝細胞増殖因子

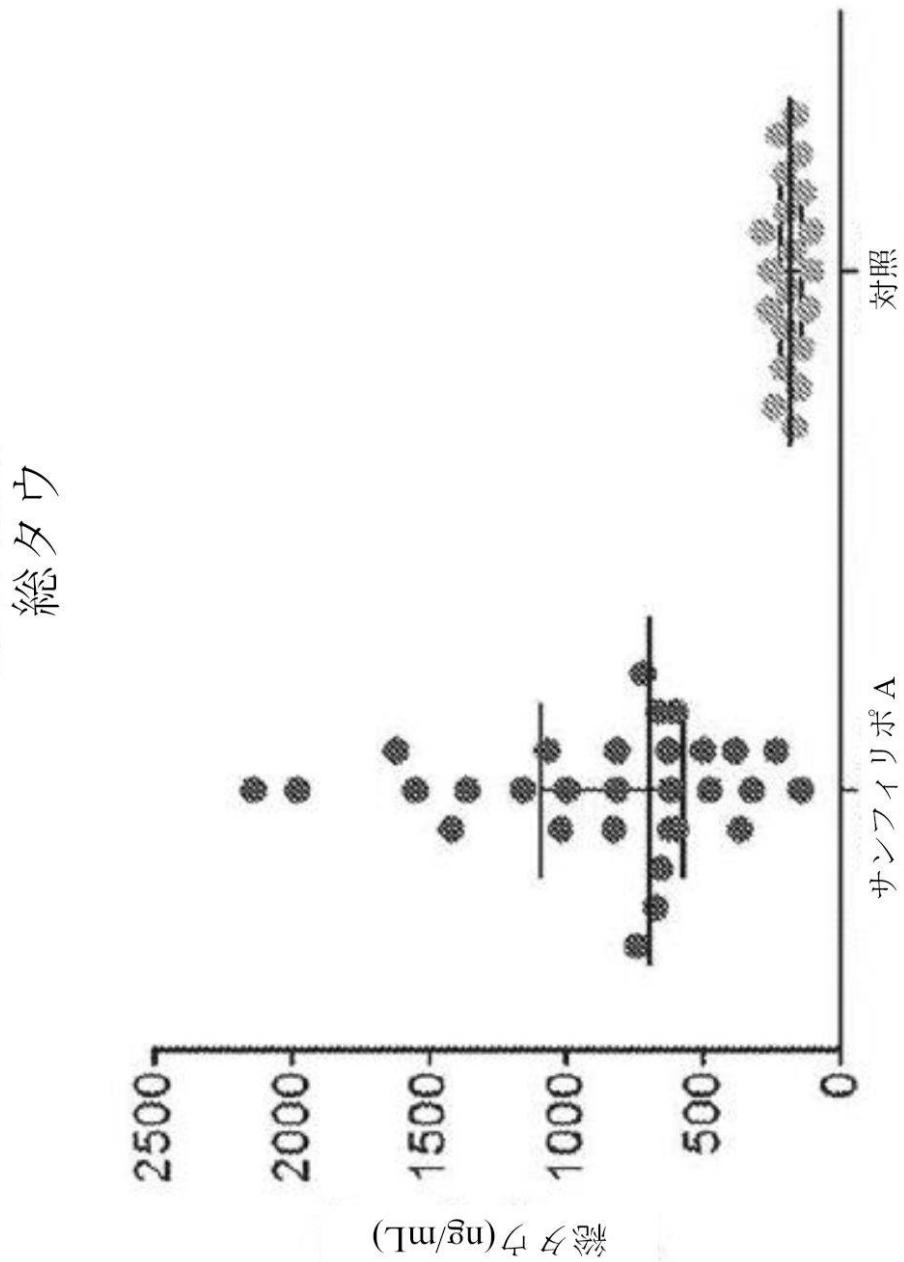


【図17】



[四一七]

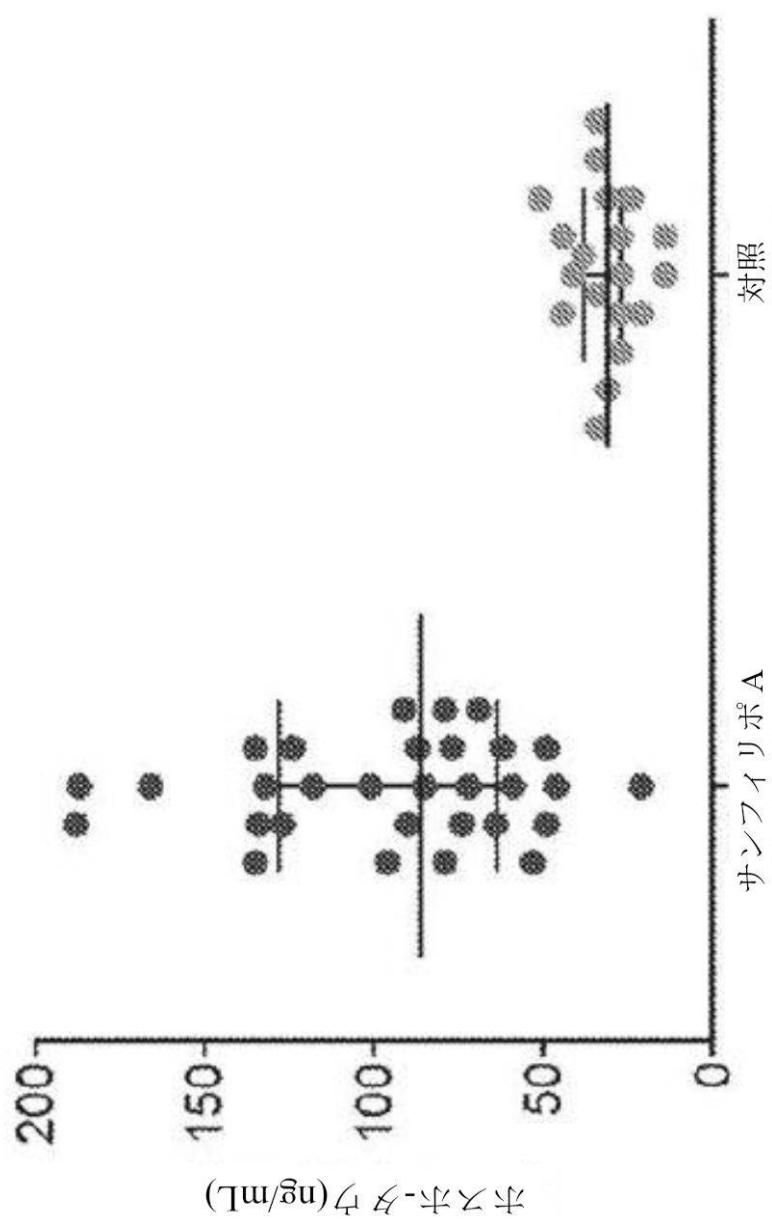
【図18】



【図18】

【図19】

ホスホ-タウ(p181)



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/63935
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12M 1/34 (2012.01) USPC - 435/287.1 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) USPC 435/287.1; IPC C12M 1/34 (2012.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC 435/287.1,4,287.2 (Text search - see search terms below)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Scholar Search Terms: Biomarker, Sanfilipo syndrome, (list of biomarkers), glycosaminoglycan, GAG, neurodevelopment, development		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0092996 A1 (CLARKE et al.) 09 April 2009 (09.04.2009) claim 11; paras [0017]; [0088]; [0029]; [0027] - [0028]; [0053]; [0023]; [0032]; [0031]; [0033]; [0075]; [0061]; [0050]	1-2, 32-38, 57-59 ----- 3-5
X — Y	US 2010/0028370 A1 (ZANKEL et al.) 04 February 2010 (04.02.2010) paras [0036]; [0040]; [0229]; [0281]; [0255]; [0036]; [0134]	64-72 ----- 3-5
Y	US 2005/0055733 A1 (SUN et al.) 10 March 2005 (10.03.2005) para [0161]	4-5
Y	US 2009/0233354 A1 (FURCHT et al.) 17 September 2009 (17.09.2009) para [0261]; [0253]	5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent 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 19 December 2012 (19.12.2012)	Date of mailing of the international search report 17 JAN 2013	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/63935
Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)		
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
<p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6-31, 39-56, 60-63, 73-78 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>		
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:		
<p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</p>		
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.	

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 21/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/14
A 6 1 P 19/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 17/14	(2006.01)	A 6 1 P 21/00
A 6 1 K 38/43	(2006.01)	A 6 1 P 19/00
A 6 1 K 38/46	(2006.01)	A 6 1 P 17/14
C 1 2 Q 1/68	(2006.01)	A 6 1 K 37/48 A 6 1 K 37/54 C 1 2 Q 1/68 A

(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,RU,TJ,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,RO,R,S,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,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,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,PA,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

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハスレット, パトリック

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02143, サマビル, ベントン ロード 2, アパートメント 1

(72)発明者 リチャード, チャーリー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01741, カーライル, モンロー ヒル ロード 2
64

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 CB01 CB03 CB04 CB07 DA14 DA36 DA44
FB02 FB03
4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR36 QR42
QR55 QR62 QS25 QS34
4C084 AA02 DC01 DC22 MA56 NA05 ZA012 ZA152 ZA222 ZA922 ZA942
ZA962