

(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2020-513546  
(P2020-513546A)

(43) 公表日 令和2年5月14日(2020.5.14)

| (51) Int.Cl.           | F I          | テーマコード (参考) |
|------------------------|--------------|-------------|
| GO 1 N 33/92 (2006.01) | GO 1 N 33/92 | Z 2 G O 4 1 |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | N 2 G O 4 5 |
| GO 1 N 33/86 (2006.01) | GO 1 N 33/86 | 4 B O 6 3   |
| GO 1 N 27/62 (2006.01) | GO 1 N 27/62 | V           |
| C 1 2 Q 1/34 (2006.01) | C 1 2 Q 1/34 |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁)

(21) 出願番号 特願2019-527341 (P2019-527341)  
 (86) (22) 出願日 平成29年11月22日 (2017.11.22)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年7月5日 (2019.7.5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/062966  
 (87) 国際公開番号 WO2018/098244  
 (87) 国際公開日 平成30年5月31日 (2018.5.31)  
 (31) 優先権主張番号 62/425,367  
 (32) 優先日 平成28年11月22日 (2016.11.22)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 503146324  
 ザ ブリガム アンド ウィメンズ ホス  
 ピタル インコーポレイテッド  
 The Brigham and Wom  
 en's Hospital, Inc.  
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O  
 2 1 1 5 ポストン フランシス ストリ  
 ート 7 5  
 (74) 代理人 100134832  
 弁理士 瀧野 文雄  
 (74) 代理人 100165308  
 弁理士 津田 俊明  
 (74) 代理人 100115048  
 弁理士 福田 康弘

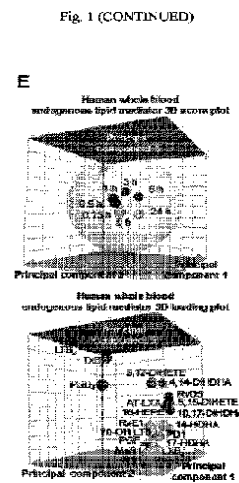
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特異的炎症収束性メディエータの個別メタボロミックプロファイリング

(57) 【要約】

血栓形成に続く自然生体防御応答の進行におけるメタボロリポドミクスプロファイル及びS P Mシグネチャーを提供するための方法が開示される。前記方法は、患者の血液サンプル中における、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに特異性炎症促進性メディエータS P Mの1つ以上の測定値を取得する工程を有し、前記サンプルは血栓形成若しくは凝固の時間経過中又は血栓形成若しくは凝固に続いて得られたものである。これらの測定値から、個別メタボロリポドミクスプロファイルを得ることができる。前記測定値を正常又はリファレンス血液から得られた測定値と比較することにより比較プロファイルを展開することができる。その後前記プロファイル比較プロファイルを医学的又は治療上の判断を行うために用いることができる。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

血栓形成に続く自然生体防御応答の進行におけるメタボロリピドミクスプロファイル及び S P M シグネチャーを提供するための方法であって、

( a ) 患者の血液サンプル中における、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに特異性炎症促進性メディエータ ( S P M ) の 1 つ以上の測定値を取得する工程を有し、

前記サンプルは血栓形成若しくは凝固の時間経過中又は血栓形成若しくは凝固に続いて得られたものであり、

個別メタボロリピドミクスプロファイルを得ることを特徴とする方法。

10

## 【請求項 2】

( b ) 前記測定値を正常又はリファレンス血液から得られた測定値と比較し、これにより比較プロファイルを展開する工程をさらに有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

( c ) 請求項 1 又は 2 に記載の前記プロファイルを医学的又は治療上の判断を行うために用いる工程をさらに有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記血液サンプルは全血であることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 5】

前記血栓形成又は凝固は、前記サンプルを負に帯電した表面に接触させて配置することで開始されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記サンプルを、前記血栓促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに前記 S P M を放出するために凍結融解することにより透過処理し、

前記透過処理をする工程を、前記測定値の取得前に行う

ことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに前記 S P M を、前記測定値の取得前に精製することを特徴とする請求項 6 に記載の方法。

30

## 【請求項 8】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに前記 S P M を、タンパク質を除去するための薬剤を追加することで精製することを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに前記 S P M を、固相抽出により精製することを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記測定値を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で取得することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

40

## 【請求項 11】

前記メタボロリピドミクスプロファイルは、血栓形成に続く初期のエイコサノイド T x B<sub>2</sub>、L T B<sub>4</sub> 及び P G D<sub>2</sub> の出現と、後期の特異的 S P M 含有クラスターの出現とを有することを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記特異的 S P M クラスターは、R v E 1、R v D 5、R v D 1、M a R 1 及び L X B<sub>4</sub> を含むことを特徴とする請求項 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

生体外でアデノシンを除去する工程をさらに有し、前記アデノシンの除去を前記 1 つ以

50

上の測定値を取得する前に行うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記特異的 SPM クラスタは、前記メタボロリピドミクスプロファイルに特有のクラスタ中において促進され、第 2 の SPM クラスタは前記プロファイルの中でアンマスクされるとともに前記プロファイルの中で表現されることを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

アデノシンを、アデノシデアミナーゼを用いた前記サンプルのインキュベーションによって除去することを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

アデノシデアミナーゼを、4 ml の全血毎に 200 mU の濃度で用いることを特徴とする請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

アデノシンの除去によりアンマスクされた前記第 2 の SPM クラスタは、RvD3、RvD4 及び RvD6 を含むことを特徴とする請求項 13 に記載の方法。

【請求項 18】

前記医学的又は治療上の判断は、疾病、病気、障害又は健康上の欠乏のうちの少なくとも 1 つの診断であることを特徴とする請求項 3 に記載の方法。

【請求項 19】

請求項 1~18 のいずれか 1 項に記載の前記プロファイルを測定するためのキットであって、

a. ヒト組換え型アデノシデアミナーゼを含む負に帯電したチューブと、  
b. d8-5-HE TE、d5-RvD2、d5-LXA<sub>4</sub>、d4-LTB<sub>4</sub> 及び d4-PGE<sub>2</sub> を含む内部基準の混合物と、

c. 個々の脂質メディエータクラスター（クラスター A-F）に特異的な抗体検出分析試薬と、

d. レゾルビン D1、レゾルビン D2、レゾルビン D3、レゾルビン D4、レゾルビン D5 及びレゾルビン D6 に特異的な抗体検出分析試薬と、

e. リポキシン A<sub>4</sub>、リポキシン B<sub>4</sub>、15-epi-リポキシン A<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシン A<sub>4</sub>）及び 15-epi-リポキシン B<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシン B<sub>4</sub>）に特異的な抗体検出分析試薬と、

f. プロテクチン D1 及び 17-epi-プロテクチン D1（アスピリン誘発プロテクチン D1）に特異的な抗体検出分析試薬と、

g. マレシン 1 及び マレシン 2 に特異的な抗体検出分析試薬と、

h. レゾルビン E1、レゾルビン E2 及びレゾルビン E3 に特異的な抗体検出分析試薬と、

i. 炎症、感染及び炎症収束の診断のため並びに脂肪酸栄養及び補給をモニターするための液体クロマトグラフィー分離及び質量分析法による定量化のために脂質メディエータを捕捉及び分離するためのカートリッジ内に入れられた上記（c-h）脂質メディエータに特異的な抗体と、

j. 患者の血液由来 SPM の分離及びヒト全血内の貪食及び細菌殺菌の測定によるそれらの機能的生理活性の試験のための（上記 i で記載されたような）抗体カートリッジと、  
からなるグループから選択される少なくとも 1 つの構成要素を備えることを特徴とするキット。

【請求項 20】

自然生体防御の進行におけるメタボロリピドミクスプロファイル及び SPM シグネチャーを提供するための方法であって、

（a）患者のサンプル中における 1 つ以上の測定値を取得する工程を有し、

前記サンプルは、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ（エイコサノイド）並びに特異性炎症促進性メディエータ（SPM）の組織又は体液又は排泄物であり、

10

20

30

40

50

個別メタボロリピドミクスプロファイルを得ることを特徴とする方法。

【請求項 2 1】

(b) 前記測定値を正常又はリファレンス組織又は体液又は排泄物血液から得られた測定値と比較し、これにより比較プロファイルを展開する工程をさらに有することを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

(c) 請求項 2 0 又は 2 1 に記載の前記プロファイルを医学的又は治療上の判断を行うために用いる工程をさらに有することを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記サンプルは組織サンプルであることを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記サンプルは、細胞外液、母乳、尿、唾液及び糞便のうちの少なくとも 1 つであることを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記サンプルを、前記血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記 S P M を放出するために凍結融解することにより透過処理し、

前記透過処理する工程を、前記測定値の取得前に行うことを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記 S P M を、前記測定値の取得前に精製することを特徴とする請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記 S P M を、タンパク質を除去するための薬剤を追加することで精製することを特徴とする請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記 S P M を、固相抽出により精製することを特徴とする請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記測定値を液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法で取得することを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記メタボロリピドミクスプロファイルは、血栓形成に続く初期のエイコサノイド T x B<sub>2</sub>、L T B<sub>4</sub>及び P G D<sub>2</sub>の出現と、後期の特異的 S P M 含有クラスターの出現とを有することを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記特異的 S P M クラスターは、R v E 1、R v D 5、R v D 1、M a R 1 及び L X B<sub>4</sub>を含むことを特徴とする請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

生体外でアデノシンを除去する工程をさらに備え、前記アデノシンの除去が前記 1 つ以上の測定値を取得する前に行われることを特徴とする請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記特異的 S P M クラスターは、前記メタボロリピドミクスプロファイルに特有のクラスター中において促進され、第 2 の S P M クラスターは前記プロファイルの中でアンマスクされるとともに前記プロファイルの中で表現されることを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 4】

アデノシンを、アデノシンデアミナーゼを用いた前記サンプルのインキュベーションによって除去することを特徴とする請求項 3 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 35】

アデノシンデアミナーゼを、4 ml の全血毎に 200 mU の濃度で用いることを特徴とする請求項 34 に記載の方法。

## 【請求項 36】

アデノシンの除去によりアンマスクされた前記第 2 の SPM クラスタは、RvD3、RvD4 及び RvD6 を含むことを特徴とする請求項 32 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記医学的又は治療上の判断は、疾病、病気、障害又は健康上の欠乏のうちの少なくとも 1 つの診断であることを特徴とする請求項 22 に記載の方法。

## 【請求項 38】

請求項 20 ~ 37 に記載の前記プロフィールを測定するための装置であって、前記キットは、

k . ヒト組換え型アデノシンデアミナーゼを含む負に帯電したチューブと、  
l . d8 - 5 - H E T E、d5 - R v D 2、d5 - L X A<sub>4</sub>、d4 - L T B<sub>4</sub> 及び d4 - P G E<sub>2</sub> を含む内部基準の混合物と、  
m . 個々の脂質メディエータクラスター（クラスター A - F）に特異的な抗体検出分析試薬と、

n . レゾルピン D 1、レゾルピン D 2、レゾルピン D 3、レゾルピン D 4、レゾルピン D 5 及びレゾルピン D 6 に特異的な抗体検出分析試薬と、

o . リポキシン A<sub>4</sub>、リポキシン B<sub>4</sub>、15 - e p i - リポキシン A<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシン A<sub>4</sub>）及び 15 - e p i - リポキシン B<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシン B<sub>4</sub>）に特異的な抗体検出分析試薬と、

p . プロテクチン D 1 及び 17 - e p i - プロテクチン D 1（アスピリン誘発プロテクチン D 1）に特異的な抗体検出分析試薬と、

q . マレシン 1 及びマレシン 2 に特異的な抗体検出分析試薬と、

r . レゾルピン E 1、レゾルピン E 2 及びレゾルピン E 3 に特異的な抗体検出分析試薬と、

s . 炎症、感染及び炎症収束の診断のため並びに脂肪酸栄養及び補給をモニターするための液体クロマトグラフィー分離及び質量分析法による定量化のために脂質メディエータを捕捉及び分離するためのカートリッジ内に入れられた上記（c - h）脂質メディエータに特異的な抗体と、

t . 患者の血液由来 SPM の分離及びヒト全血内の貪食及び細菌殺菌の測定によるそれらの機能的生理活性の試験のための（上記 i で記載されたような）抗体カートリッジと、  
からなるグループから選択される少なくとも 1 つの構成要素を備える

ことを特徴とする装置。

## 【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、2016 年 11 月 22 日に提出された米国仮特許出願番号第 62 / 425 , 367 号の利益を主張し、当該仮特許出願の内容は全て参照により本明細書に組み込まれているものとする。

## 【0002】

< 連邦政府の支援による研究に関する言明 >

本発明は、アメリカ国立衛生研究所によって与えられた R01GM38765、R01GM38765 - 29S1 及び P01GM095467 による政府の支援によりなされた。政府は本発明において一定の権利を有する。

## 【0003】

本開示は、概して医学的又は治療上の判断をするためのシステム及び方法に関する。より具体的には、本開示は、医学的又は治療上の判断をするために患者の血液サンプルの血

10

20

30

40

50

栓形成又は凝固の時間経過において行われる測定の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

バリアの損傷は、出血、感染並びに止血のプロセス、急性炎症反応及び組織再生によって自然に対処される組織破壊といった形で人間の健康に複数の驚異をもたらす(1-3)。止血(「出血を止めること」)は、外因系又は内因系の開始を介して急速に進行し凝固及び血栓形成に収束する。これらの事象は、止血栓内の血小板、好中球及び単球の活性化の間に炎症を伴う(4,5)。特定のアラキドン酸由来エイコサノイドは止血及び炎症において必要不可欠な役割を果たし、例えば、トロンボキサンA<sub>2</sub>(TxA<sub>2</sub>;その他の脂質メディエータの略語については表1参照)は有力な血栓形成促進性のメディエータであり、一方でプロスタグランジン及びロイコトリエン(6,7)は共同で血管透過性を高め、損傷部位に好中球を動員し、そしてロイコトリエン生合成から特異的炎症収束性メディエータSPM生成への脂質メディエータ(LM)クラススイッチングのために好中球を位置付ける(8)。これにより、炎症から炎症収束への遷移の中核となるプロセスである特異的炎症収束性メディエータ(SPM;図4参照)の生成が可能となる(8-11)。次に、SPMは、前炎症性メディエータ(例えば、サイトカイン及びLM)を逆調整し、エフェロサイトーシス(死にゆく及び死滅細胞の貪食作用)及び創傷治癒を加速するとともに、免疫抑制を伴わずに貪食作用を促進することによって抗生物質の必要性を部分的に低減する(8,12)。したがって、SPMは、炎症及び感染の治癒のアゴニストであることから免疫抗原であると考えられる(13)。

10

20

【0005】

したがって、血栓形成中に生成されたSPMと免疫応答との間のこれまで未発見の相互作用を活用する方法を提供することが望ましい。

【発明の概要】

【0006】

一側面において、本開示は、血栓形成に続く自然生体防御応答の進行におけるメタボロリピドミクスプロファイル及びSPMシグネチャーを提供するための方法であって、(a)患者の血液サンプル中における、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに特異性炎症促進性メディエータ(SPM)の1つ以上の測定値を取得する工程を有し、前記サンプルは血栓形成若しくは凝固の時間経過中又は血栓形成若しくは凝固に続いて得られたものであり、個別メタボロリピドミクスプロファイルを得る方法を提供する。

30

【0007】

他の実施形態では、前記方法は(b)前記測定値を正常又はリファレンス血液から得られた測定値と比較し、これにより比較プロファイルを展開し、前記プロファイルを医学的又は治療上の判断を行うために用いる工程をさらに有する。

【0008】

一部の側面では、前記血栓形成又は凝固は前記サンプルを負に帯電した表面に接触させて配置することで開始され、前記サンプルを、前記血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記SPMを放出するために凍結融解(freeze-thaw)することにより透過処理し、この透過処理する工程を前記測定値の取得前に行う。

40

【0009】

一部の側面では、請求項6に記載の方法において、前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記SPMを、前記測定値の取得前に精製する。

【0010】

一部の側面では、前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記SPMをタンパク質を除去するための薬剤を追加することで精製し、前記放出された血栓促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)並びに前記SPMを固相抽出により精製する。

50

## 【 0 0 1 1 】

通常、前記メタボロリピドミクスプロファイルは、血栓形成に続く初期のエイコサノイド  $T \times B_2$ 、 $L T B_4$  及び  $P G D_2$  の出現と、後期の特異的 S P M 含有クラスターの出現とを有する。通常、前記特異的 S P M クラスターは、 $R v E 1$ 、 $R v D 5$ 、 $R v D 1$ 、 $M a R 1$  及び  $L X B_4$  を含む。

## 【 0 0 1 2 】

一側面では、請求項 1 に記載の方法は、生体外でアデノシンを除去する工程をさらに有し、前記アデノシンの除去は前記 1 つ以上の測定値を取得する前に行われる。この側面において、前記特異的 S P M クラスターは、前記メタボロリピドミクスプロファイルに特有のクラスター中において促進され、第 2 の S P M クラスターは前記プロファイルの中でアンマスクされる (unmasked) とともに前記プロファイルの中で表現される。通常、アデノシンの除去によりアンマスクされた前記第 2 の S P M クラスターは、 $R v D 3$ 、 $R v D 4$  及び  $R v D 6$  を含む。

10

## 【 0 0 1 3 】

別の側面において、方法は、自然生体防御の進行におけるメタボロリピドミクスプロファイル及び S P M シグネチャーを提供し、( a ) 患者のサンプル中における 1 つ以上の測定値を取得する工程を有し、前記サンプルは、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ ( エイコサノイド ) 並びに特異性炎症促進性メディエータ ( S P M ) の組織又は体液又は排泄物であり、個別メタボロリピドミクスプロファイルを得る。

## 【 図面の簡単な説明 】

20

## 【 0 0 1 4 】

【 図 1 A 】 図 1 A ~ 図 1 E はヒト血栓形成が S P M 及びエイコサノイドの内因的一時的生成を開始することを説明する図である。図 1 A ~ 図 1 E について、新たに採血したヒト末梢血をシリコン被覆チューブ内で 37 °C で示された時間インキュベートし、LC - MS / MS 分析 ( 例 1 の [ 材料及び方法 ] を参照 ) のためにサンプルを急速凍結することで凝固を停止させた。図 1 A は、血栓形成中の血液サンプルにおける 750 nm での光透過率の相対的変化の時間的経過を示す。

【 図 1 B 】 サンプル中に確認された S P M ( 上 ) 及びエイコサノイド ( 下 ) の LC - MS / MS クロマトグラムである。a = 6 - trans -  $L T B_4$ 、b = 6 - trans , 12 - epi -  $L T B_4$  及び c = 5 S , 12 S - di H E T E である。

30

【 図 1 C 】 MS / MS スペクトルと、示された確認されたメディエータについての診断用イオンである。図 1 A ~ 図 1 C 中のデータは 12 人のドナーを代表する。

【 図 1 D 】 血液サンプル中の S P M クラスター及びエイコサノイドの示されたメンバーの濃度の時間変化である。データは、12 回の実験の平均  $\pm$  SEM である。ボンフェローニの多重比較検定を用いた 1 元配置分散分析 ( one - way ANOVA ) による、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$  及び \*\*\*\*  $P < 0.0001$  対ゼロ時間時点。

【 図 1 E 】 12 人の個々のドナーからのメディエータの一時的なクラスタリングを示す代表 PCA スコアプロット ( 上 ) とローディングプロット ( 下 ) である。灰色は、静脈穿刺及び抗凝固剤を含まないシリコン被覆チューブ内への血液の配置から 0 時間後を示し、青色は 0.25 時間後、赤色は 3 時間後、緑色は 24 時間後を示す。

40

【 図 2 A 】 図 2 A ~ 図 2 F はヒト血液中の S P M 形成の制御因子を説明する図である。図 2 A ~ 図 2 E において、ヘパリン ( 10 U / ml ) を含む新たに採血したヒト末梢血 ( 4 ml ) をポリプロピレンチューブ ( 図 2 A ) 内に配置し、一方で抗凝固剤を含まないヒト末梢血をシリコン被覆チューブ ( 図 2 B ~ 図 2 E ) 内に配置し、37 °C で 0 から 24 時間の時間的経過でインキュベートした ( 例 1 の [ 材料及び方法 ] を参照 ) 。その後サンプルを抽出及び LC - MS / MS 分析のために急速凍結した。図 2 A は、インキュベーション中にヘパリン ( 10 U / ml ) を用いずに ( 「凝固」 ) 又は用いて処理したサンプル内の S P M クラスター ( 図 1 A ~ 1 E に示す ) のメンバーの濃度である。データは、3 人の個々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。

50

【図 2 B】左は、11b 3 阻害剤エプチフィバチド (エプチフィバチド ; 20  $\mu$ M) の存在下又は非存在下における 24 時間の凝固後の全 SPM クラスター、プロスタグランジン及びトロンボキサンの総濃度である。真ん中は、示されたサンプルの 24 時間の凝固後の血栓体積である。右は、代表血栓画像である。データは、3 人の個々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。

【図 2 C】200 mU の ADA の存在下又は非存在下における 24 時間の凝固後の全 SPM の濃度及び示された個々の SPM の濃度である。データは、3 人の個々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。比率 t 検定による、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 。

【図 2 D】上は、ADA の存在下又は非存在下における凝固中の示された時点における全血中のアデノシン濃度の LC - MS / MS 測定である。ゼロ時間時点と比較した場合 \*\*  $P < 0.01$ 。下は、ADA の非存在下 (凝固) 又は存在下で示された時間凝固を許された全血中の CD16 及び CD42b についてダブルポジティブであるとして定義される好中球 - 血小板凝集体の割合のフローサイトメトリー分析である。データは、5 人の個々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。スチューデントの t 検定による、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$ 。ドットプロット及びゲーティングについては図 7 B を参照。

【図 2 E】MS / MS フラグメンテーションプロファイルと図 2 C で確認された示された SPM についての診断用イオンを示す。

【図 2 F】左は PCA スコアプロットである。赤色は 1 時間の + ADA、黄色は 1 時間の凝固、緑色は 24 時間の凝固、青色は 24 時間の + ADA を示す。右は、3 人の個々のドナーからの示されたメディエータの一時的なクラスタリングを示す PCA ローディングプロットである。赤色は 1 時間で LM、青色は 24 時間 ADA であったものを示す。

【図 3 A】図 3 A ~ 図 3 D は全血の凝固中に生成された SPM が貪食作用及び殺菌を促進することを説明する図である。図 3 A は、(SPM パネルからの) RvE1、RvD1、RvD5、LXB4 及び MaR1 を示された濃度で又は対照 (vehicle control) を行って用いて 37  $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートし、その後大腸菌を追加してさらに 37  $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベートしたヒト末梢血における細菌生存の分析である。データは、3 人の別々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。両側 t 検定による、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$  対対照。

【図 3 B】(図 3 A で示すような) SPM パネルのメンバーの非存在下又は存在下で 37  $^{\circ}$ C で 45 分間インキュベートした後のヒト末梢血好中球 (CD66b+) 及び単球 (CD14+) による BacLight (登録商標) Green 標識された大腸菌の貪食を示す。上: 示された細胞の MFI をフローサイトメトリー分析により割り出した。代表的なヒストグラムを示す。下: データは 4 人の個々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。ボンフェローニの多重比較検定を用いた 1 元配置分散分析による、\*\*  $P < 0.01$ 、\*\*\*  $P < 0.001$ 、\*\*\*\*  $P < 0.0001$  対対照。

【図 3 C】対照又は示された SPM (各々 1 nM) と別々に又は組み合わせて (大腸菌 + SPM) 37  $^{\circ}$ C で 15 分間インキュベートした後の、ヒトマクロファージ (細胞毎に 50 個の細菌の割合でインキュベート) による BacLight (登録商標) Green 標識された大腸菌の貪食のリアルタイム分析である。MFI として表される貪食は、条件毎 (ウェル毎) に 4 フィールド (20  $\times$ ) の平均値として示される。挿入図: 3 人の別々ドナーからの代表イメージ。スケールバーは 50  $\mu$ m。

【図 3 D】180 分での大腸菌の貪食の分析である。データは 3 人の別々のドナーの平均  $\pm$  SEM である。ボンフェローニの多重比較検定を用いた 1 元配置分散分析による、\*  $P < 0.05$ 、\*\*  $P < 0.01$  対 SPM パネル、##  $P < 0.01$ 、###  $P < 0.001$  対対照。

【図 4】SPM 及びその生合成経路を説明する図である。

【図 5】凝固ヒト末梢血における LM の確認を示す。示された LMs の MS / MS フラグメンテーションプロファイル。結果は図 1 に示すものと同じ実験からのものであり、各 LM についてこれらの追加の MS - MS を有するパネル C を確認した。

【図 6】凝固によって SPM、プロスタグランジン及びロイコトリエンの生成が大幅に増

10

20

30

40

50

大することを説明する図である。37℃で24時間インキュベートする前に、ヘパリン添加ヒト血液を15mlポリプロピレンチューブ(ヘパリン10U/ml)に移し、ヘパリンを含まない血液をシリコンコーティングしたチューブ(-帯電表面)に移した。サンプルを急速凍結し、遠心分離した。上澄み及び沈殿物(血栓に関連)に対し、固相抽出及び図1に記載のLC-MS/MS-LMメタボロリポドミクス分析(metabololipidomics analysis)を行った。結果は3人の個々のドナーの平均±SEMである。比率t検定による、\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001、\*\*\*\*P<0.0001。

【図7A】図7A及び図7Bは、凝固中のアデノシン促進SPM生成及び血小板-好中球相互作用の除去を説明する図である。図7A及び図7Bは、ヒト末梢血を凝固中に200mUのADAを含んで又は含まずに24時間インキュベートした。その後サンプルについて、示されたLMのLC-MS/MS分析を行った(図7A)又は血小板-好中球凝集体のフローサイトメリー分析を行った(図7B)。図7Aにおいて、ADA存在下で生理活性脂質メディエータ及び経路マーカーが増大したと、これに対し単独で凝固されたサンプルについて、3人の個別のドナーからの平均比(fold-change)として表現されている。

【図7B】血小板-好中球凝集体(CD42a<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>)の定量化についてのゲーティング模式図を示す。データは5人の個別のドナーを代表し、図2Dに示すものと同じ実験から得られたものである。

【図8A】図8A及び図8Bはリポキシゲナーゼ活性により調整されたヒト血栓内のSPM形成を説明する図である。図8A及び図8Bにおいて、新たに採血されたヒト末梢血(4ml)がシリコン被覆チューブ内に37℃で24時間配置され、LC-MS/MS分析の実施前に急速凍結することにより凝固が停止された。図8Aはインドメタシン100µM(インドメタシン)の存在下又は非存在下における24時間の凝固後(凝固)の全SPM、プロスタグランジン及びトロンボキサンの濃度である(n=6人の個々のドナー)。データは平均±SEMである。比率t検定を用いた、+BAI対凝固について\*P<0.05; +インドメタシン対凝固について\*\*\*\*P<0.0001。

【図8B】セレコキシブ(CLX)500nM又はBAI20µMの存在下又は非存在下における24時間の凝固後(凝固)の全SPM、プロスタグランジン及びトロンボキサンの濃度である(n=3人の個々のドナー)。データは平均±SEMである。比率t検定を用いた、+BAI対凝固について\*P<0.05; +インドメタシン対凝固について\*\*\*\*P<0.0001。

【図9A】図9A~図9Dは、出血性滲出液におけるSPM生成が凝固により増大したことを説明する図である。図9A~図9Dにおいて、マウスにザイモサン(1mg/0.5ml; 無菌滲出液)、トロンピン(5U/0.5ml; トロンピン滲出液)又はこれらの組み合わせ(出血性滲出液)を4時間投与し、その後腹膜滲出液及びナイーブ洗浄液(native lavage)を回収した。図9Aにおいて、RBC対白血球の比(青色のバー; 左軸)及び好中球数(白色のバー; 右軸)をフローサイトメリーを用いて割り出した。データは条件毎に3匹又は4匹のマウスの平均±SEMである。出血性滲出液対無菌滲出液について#P<0.05、##P<0.01、###P<0.001である。両側t検定による、出血性滲出液対トロンピン滲出液について\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001である。

【図9B】洗浄液からの白血球及びRBCを、ライトギムザ染色を改良したものであるディフ・クイック染色(登録商標)を用いて染色して光学顕微鏡検査により分析し、矢印で示されている。スケールバーは20µmである。データは条件毎に3匹又は4匹のマウスの平均±SEMである。

【図9C】ヒト血栓形成クラスターからのSPMの量を割り出した。データは条件毎に3匹又は4匹のマウスの平均±SEMである。出血性滲出液対無菌滲出液について#P<0.05、##P<0.01、###P<0.001である。両側t検定による、出血性滲出液対トロンピン滲出液について\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001である

10

20

30

40

50

。

【図9D】エイコサノイドの量を割り出した。データは条件毎に3匹又は4匹のマウスの平均±SEMである。出血性滲出液対無菌滲出液について#P<0.05、##P<0.01、###P<0.001である。両側t検定による、出血性滲出液対トロンピン滲出液について\*P<0.05、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001である。

【図10A】図10A及び図10Bは、SPM形成阻害BAIが細菌死滅を減少させることを説明する図である。新たに採血したヒト末梢血(4mL)をシリコン被覆チューブ内に37℃で24時間配置し、これをLC-MS/MSのために急速凍結により停止した、又は上澄みをLB寒天板上に配置して細菌コロニーの数え上げ前に37℃で一晩インキュベートした。図10AはLOX阻害剤(BAI)200µMの存在下又は非存在下において大腸菌(7×10<sup>8</sup>CFU)を含んで37℃で24時間インキュベートしたヒト末梢血(2.0mL)内の細菌生存を示す(n=4人の個々のドナー)。データは平均±SEMである。比率t検定を用いた、+BAI対凝固について\*P<0.05、\*\*\*\*P<0.0001である。

10

【図10B】LOX阻害剤(BAI)200µMの存在下又は非存在下において大腸菌(7×10<sup>8</sup>CFU)を含んで37℃で24時間インキュベートしたヒト末梢血(2.0mL)内のSPMを示す(n=4人の個々のドナー)。データは平均±SEMである。比率t検定を用いた、+BAI対凝固について\*P<0.05、\*\*\*\*P<0.0001である。

【図11A】図11A~図11Cは、LMプロファイルが正常ヒト組織及び疾病ヒト組織間ではっきりと異なることを説明する図である。図11A~図11Cにおいて、ヒト精巣組織をLC-MS/MSによってプロファイリングした。患者基本情報は以下のとおりである。正常精巣：75歳；白人；故人；転移性黒色腫(肺及び骨)の病歴。悪性精巣：セミノーマ；52歳；白人；生存。図11Aは、3つの別個の測定から得たLMのクラスタリングを示すPCAスコアプロット(左)及びローディングプロット(右)である。

20

【図11B】示されたサンプル内の全SPM、LTB<sub>4</sub>並びに全PG及びTxB<sub>2</sub>の濃度である。データは3つの別個の測定値の平均±SEMである。独立t検定による、\*\*P<0.01、\*\*\*P<0.001である。

【図11C】示されたSPMのMS/MSフラグメンテーションプロファイルである。

【発明を実施するための形態】

30

【0015】

[一般論]

本明細書に開示するのは、自然生体防御応答の進行におけるメタボロリポドミクスプロファイル(metabololipidomic profile)及びSPMシグネチャーを提供する方法である。

【0016】

「メタボロリポドミクスプロファイル及びSPMシグネチャー」とは、以下に例のなかで記載するような血栓形成促進性及び炎症性メディエータ並びに特異的炎症収束性メディエータ(SPM)の表示群の検査及び作表を意味する。

【0017】

本発明の一実施形態では、メディエータのリストは表4に挙げられた通りであり、これは脂質メディエータ機能性クラスター及び性合成経路の確認及びプロファイリングのための脂質メディエータ及び経路マーカーの全リストである。他の実施形態では、パネル/シグネチャーにおいてより少ないメディエータの使用が望まれ得る。例えば、表4に挙げられる少なくとも10、15又は20個のメディエータを試験することが望まれ得る。本発明の別の実施形態では、以下に記載の各クラスターの少なくとも1又は2つのメンバーを含むことが望まれ得る。

40

【0018】

メディエータの検査は、通常、時間経過における又は互いに対するメディエータの濃度の検査を含む。プロファイル/シグネチャーの重要な要素は、クラスターの互いに対する

50

出現又は出現の欠如である。

【0019】

脂質メディエータのクラスターのパネルを以下に示す。

【0020】

クラスターA：トロンボキサン $B_2$ 、プロスタグランジン $D_2$ 及びロイコトリエン $B_4$

【0021】

凝固時間経過の初期段階で増大する脂質メディエータの炎症性凝固クラスター（例えば、負に帯電したチューブに血液を追加した後、これらのメディエータは0.5及び1時間時点で増大する。図1D及び図1E参照）。

【0022】

クラスターB：レゾルピンE1、レゾルピンD1、レゾルピンD5、マレシン1、リポキシン $B_4$

【0023】

凝固時間経過の後期段階で増大する脂質メディエータのSPM凝固クラスター（例えば、負に帯電したチューブに血液を追加した後、これらのメディエータは3、6及び24時間時点で増大する。図1D及び図1E参照）。

【0024】

クラスターC：レゾルピンD3、レゾルピンD4、レゾルピンD6、AT-LXA $_4$ 、LXA $_5$ 、レゾルピンD1、レゾルピンE1、LXB $_4$

【0025】

このSPMクラスターは、ヒト血液4ミリリットル毎にヒト組換え型アデノシンデアミンナーゼを200ミリ単位追加すると凝固時間経過の後期段階において増大する（図2C～図2F及び図7参照）。

【0026】

クラスターD：トロンボキサン $B_2$ 、プロスタグランジン $E_2$ 、プロスタグランジン $D_2$ 、プロスタグランジン $F_2$ 及びロイコトリエン $B_4$

【0027】

これは炎症性エイコサノイド脂質メディエータクラスターである。このクラスターは共同して血管透過性及び炎症部位への好中球動員を促進する。このクラスターは炎症の開始中に増大し、患者の炎症状態の程度の評価に用いることができる。

【0028】

クラスターE：RV $D_4$ 、RV $D_5$ 及びLT $B_4$

【0029】

健康組織脂質メディエータクラスター。これらのメディエータは疾病組織に比べて健康組織内で増大する。

【0030】

クラスターF：トロンボキサン $B_2$ 、プロスタグランジン $D_2$

【0031】

疾病組織脂質メディエータクラスター。これらのメディエータは健康組織に比べて疾病組織内で増大する。

【0032】

一実施形態において、方法は患者の血液サンプル中の測定値を得ることを含み、サンプルは、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ（エイコサノイド）並びに特異的炎症収束性メディエータSPMの血栓形成若しくは凝固の時間経過中又は血栓形成若しくは凝固に続いて得られる。あるいは、方法は、患者の組織、体分泌物又は患者の他の体液若しくは一部における測定値を得ることを含むことができる。これらの測定値から、個別メタボロミックプロファイリングを得ることができる。

【0033】

方法は、測定値を、正常又はリファレンスサンプル、例えば初期プロファイルが血液サンプルから得られたものであるならリファレンス血液サンプル、から得られたものと比較

10

20

30

40

50

する工程をさらに有し、これにより比較プロファイルを発展させてもよい。方法は、医学的又は治療上の判断をするために上記プロファイルを用いる工程をさらに有してもよい。

【0034】

方法は、生体外でアデノシンを除去する及び第2のSPMクラスターを観察する工程をさらに有してもよい。アデノシンは、例えばサンプルをアデノシンデアミナーゼとともにインキュベートすることで除去してもよい。アデノシンデアミナーゼは通常全血4mL毎に200mUの濃度で用いられる。アデノシンの除去によりアンマスクされた第2のSPMクラスターはRvD3、RvD4及びRvD6を有してもよい。

【0035】

別の側面では、本開示は、疾病、病気、障害又は健康上の欠乏を診断する方法を提供する。方法は、正常又は標準サンプルから得られた標準メタボリピドミクスプロファイルと患者のサンプルから得られたメタボリピドミクスプロファイルと比較することを含む。患者のサンプル組織内の脂質メディエータ及び経路マーカー代謝物を正常又は標準サンプル内の脂質メディエータ及び経路マーカー代謝物と比較したときの定量的又は時間的表現における差異により疾病又は病的サンプルを識別することができる。医学的又は治療上の判断は、代替的な健康の評価となり得る。例えば、プロファイルを、癌の診断を行うため又は患者のオメガ3系脂肪酸レベルが許容範囲内か否かを決定するために用いてもよい。

10

【0036】

疾病又は病的サンプルを、外科的事象、感染、血管炎症、全身性炎症、発作及び癌のグループから選択される事象と関連付けてもよい。本明細書で用いる場合、疾病サンプル又は病的サンプルは、健康状態が良好又は正常でない血液、組織、排泄物又は患者の他の体の一部を含んでもよい。

20

【0037】

また、薬物療法による代謝性の影響を判定するために本発明のプロファイル/シグネチャーを用いることが望まれ得る。例えば、薬物が有効か否かを判定するために薬物療法の前後で患者サンプルを検査することが望まれ得る。

【0038】

[患者サンプル]

患者から採取されるサンプルは、血液、組織、排泄物又は患者の他の体の一部又は体液であってもよい。

30

【0039】

患者の血液サンプルの測定を行うために用いる場合、血液は全血であってもよい。本明細書で用いる場合、全血とは、血漿又は血小板などの成分が何も除去されていない患者の体から直接採血された血液として定義される。あるいは、測定は、包装された赤血球、血小板濃縮物、クリオプレシピテート、血漿又は他のそのような血液製剤などの血液製剤について行ってもよい。

【0040】

患者の血液サンプルは測定を行う前に処理してもよい。例えば、血液サンプルは、希釈若しくは濃縮されてもよく又はサンプルに追加された薬剤を有してもよい。血液の所定の成分は、測定を行う前に選択的に除去されてもよい。

40

【0041】

血液サンプルを検査する場合、患者のサンプルを凝固プロセス中の異なる時点で検査し、プロファイル/シグネチャーを含む因子の出現を作表することが望まれ得る。血液サンプルの場合、例に記載のヘパリンで覆われたチューブなどの負に帯電した表面にサンプルを接触させて配置することにより、血栓形成又は凝固が開始され得る。測定は血栓形成の時間経過中に行ってもよい。例えば、測定を、血栓形成の開始前及び0.1、0.25、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、24、48時間経過後又は他の同等の時間フレームで行ってもよい。

【0042】

測定を行う前に、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ(エイコサノイド)及びSP

50

Mを解放するために凍結融解によってサンプルを透過処理してもよい。例において、凍結融解の典型的な方法を開示する。凍結融解が行われた後、炎症性メディエータ（エイコサノイド）及びSPMはさらに精製される。精製において、望ましくないタンパク質を除去するために血栓形成促進性及び炎症性メディエータ（エイコサノイド）及びSPMに薬剤を追加してもよい。薬剤はエタノールでもよい。精製は、固相抽出法を用いて達成してもよい。

#### 【0043】

患者からの組織を測定を行うために用いる場合、患者のいかなる組織を採用してもよい。本明細書で用いる場合、組織は、固有細胞及びその産物からなる動物を形成する別個の種類物質として定義される。また、尿又は汗などの体液を検査することが望まれ得る。糞便などの老廃物又は排泄物を検査することが望まれ得る。母乳を検査することが望まれ得る。

10

#### 【0044】

##### [測定]

患者のサンプルを血栓形成促進性及び炎症性メディエータ（エイコサノイド）及びSPMの濃度について検査する必要がある。測定は、特定のエイコサノイド又はSPMの濃度の決定を伴い得る。これらの測定は、液体クロマトグラフィー、質量分析、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法又は他の分析技術を用いて行われてもよい。測定は、特に、固相抽出法及び脂質メディエータ-SPM液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法を用いて行われてもよい。

20

#### 【0045】

##### [プロファイルの分析及び臨床的有用性]

凝固中のヒト全血(WB)のメタボロリピドミクスに基づくプロファイリングを介する凝固と脂質メディエータ(LM)による炎症及び感染の収束との間の関係を用いて、内因的に生成された血栓形成促進性及び炎症性LM(エイコサノイド)及び特異的炎症収束性メディエータSPMの一時的なクラスターを確認することができる。エイコサノイドに加えて、具体的なSPMクラスターを確認することができる。クラスターは、レゾルビンE1(RvE1)、RvD1、RvD5、リポキシンB4及びマレシン1を含んでもよい。

#### 【0046】

メタボロリピドミクスプロファイル/シグネチャーは、血液サンプル又は組織の凝固時間経過中の様々な時点で得られた代謝物の濃度を含んでもよい。メタボロリピドミクスプロファイル/シグネチャーは、具体的に、血液凝固及び特異的SPM含有クラスターの後期出現の後の、エイコサノイドTxB2、LTB4及びPGD2の初期出現を含んでもよい。特異的SPMクラスターは、RvE1、RvD5、RvD1、MaR1及びLXB4を含んでもよい。

30

#### 【0047】

プロファイルを、他の患者からの前の結果から作成された正常又はリファレンス値と比較してもよい。これらの正常又はリファレンス値は、一般的なものでもよく、あるいは年齢、性別、病歴若しくはその他の具体的な医学的決定要因に特異的なものでもよい。リファレンス値及びこれらから作成されたプロファイルを具体的な疾病、病気、障害又は健康上の欠乏に結びつけてもよい。あるいは、リファレンス値は、特定の対象患者の以前に得られた測定値であってもよい。もし測定値が組織サンプルから得られたものであるならば、その患者の体の別の位置から集められたリファレンス組織を用いてもよい。

40

#### 【0048】

本発明のプロファイル/シグネチャーを、医学的又は臨床的診断を助けるために用いることが望まれ得る。臨床医がLMシグネチャープロファイルを取得し、そして、典型的に液体クロマトグラフィー分離及び質量分析測定により測定されるSPM及び他の脂質メディエータの量のPCAクラスター分析を併せて用いた場合、我々の予言的な記載に基づく以下のシナリオにおいて予想クラスター変化を予期できるであろう。

#### 【0049】

50

a. 例えばインドメタシンなどのNSAIDを服用した患者：NSAIDを服用していない対象に比べてクラスターA及びDは減少し、クラスターB及びCは減少しない（図8A参照）。したがってより高いSPM対炎症性エイコサノイド比が得られる。これらの変化は、炎症の収束と生体防御（例えば、細菌及び微生物の殺菌及び除去）とを明確に相互に関連付ける炎症収束性メディエータ（SPM）対炎症性エイコサノイドについてのクラスター比をもたらし、これは以下の追加のシナリオに適用することもできる。

b. 例えばセレコキシブなどのCOX-2阻害剤を服用した患者：COX-2阻害剤を服用していない対象に比べてクラスターA及びDは減少し、クラスターB及びCは減少しない（図8B参照）。

c. 例えばジロートン又はコルチコステロイドなどのリボキシゲナーゼ阻害剤を服用した患者：これらの阻害剤を服用していない対象と比べてクラスターA、B、C及びDは減少する（図8B参照）。

d. 脂肪酸欠乏がみられる患者：健康な対象と比べてクラスターB及びCは減少する。健康な対象と比べて炎症収束性クラスターは減少する。

e. サプリメント又は栄養摂取によりオメガ-3を摂取した患者：健康な対象及び/又は脂肪酸欠乏がみられる対象と比べてクラスターB及びCは増大する。

f. 癌に罹患した患者：クラスターEは減少し、クラスターFは増大する（図11参照）

g. 例えば血小板凝集阻害薬エプチフィバチドなどの血液希釈剤を服用した患者：クラスターB及びCは減少する（図2b参照）。

h. 例えばヘパリンなどの抗凝固剤を服用した患者：クラスターA、B及びCは減少する（図2a）。

i. 免疫不全患者：クラスターB及びCは減少することが見込まれる。

【0050】

[サンプル調製及びメタボロリピドミクスのための装置、キット及び構成要素]

本明細書に記載の方法は、装置又はキットの一部として用いることができる。そのような装置又はキットは、種々の溶液、組成、分離手段又は患者の血液サンプルの測定の補助に使用できる他のアイテムを含んでもよい。例えば、本発明の通常のキットは、少なくとも1つ、2つ、3つ又は4つの以下の構成要素を有する。

【0051】

a. 追加のアデノシンデアミナーゼを含む負に帯電した表面、例えばヒト組換え型アデノシンデアミナーゼを含むシリコン被覆10mLチューブ（通常200ミリ単位/チューブ）。SPM-脂質メディエータ生成をアンマスクするため及びSPMクラスターの確認のために用いられる。

b. (d8-5-HETE、d5-RvD2、d5-LXA<sub>4</sub>、d4-LTB<sub>4</sub>及びd4-PGE<sub>2</sub>；500pg/uLメタノール)を含む内部基準の混合物。脂質メディエータの定量化に用いられる。

c. 個々の脂質メディエータクラスター（クラスターA-F）に特異的な抗体検出分析試薬。

d. レゾルビンD1、レゾルビンD2、レゾルビンD3、レゾルビンD4、レゾルビンD5及びレゾルビンD6に特異的な抗体検出分析試薬。

e. リポキシンA<sub>4</sub>、リポキシンB<sub>4</sub>、15-epi-リポキシンA<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシンA<sub>4</sub>）及び15-epi-リポキシンB<sub>4</sub>（アスピリン誘発リポキシンB<sub>4</sub>）に特異的な抗体検出分析試薬。

f. プロテクチンD1及び17-epi-プロテクチンD1（アスピリン誘発プロテクチンD1）に特異的な抗体検出分析試薬。

g. マレシン1及びマレシン2に特異的な抗体検出分析試薬。

h. レゾルビンE1、レゾルビンE2及びレゾルビンE3に特異的な抗体検出分析試薬。

i. 炎症、感染及び炎症収束の診断のため並びに脂肪酸栄養及び補給をモニターするた

10

20

30

40

50

めの液体クロマトグラフィー分離及び質量分析法による定量化のために脂質メディエータを捕捉及び分離するためのカートリッジ内に入れられた上記(c-h)脂質メディエータに特異的な抗体。

j. 患者の血液由来SPMの分離及びヒト全血内の貪食及び細菌殺菌の測定によるそれらの機能的生理活性の試験のための((i)で記載された)抗体カートリッジを含む分析キット。例えば、健康な対象と比べてSPMレベルがより低い患者(クラスターB及びC)は、健康な対象に比べて全血中の白血球細胞による細菌の貪食がより低くなるとともに生存細菌数がより高くなる(即ち殺菌が減少する)。健康な対象から採取された血液において、リポキシゲナーゼ阻害剤を追加することでクラスターbのレベルが減少し、生存細菌数が増大する(図10参照)。SPMを全血に追加することで全血において貪食及び殺菌が増大する(図3参照)。これらの結果は、患者の生体防御応答に欠陥があること、生体防御及び炎症の収束を加速する治療をテストする方法を臨床医に知らせるために用いることができる。

【0052】

[例]

以下の例は、本発明のいくつかの実施形態及び側面を示すとともにさらに説明するために提供されるものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

【0053】

[例1]

結果

ヒト血液凝固のLM-SPMプロファイリング

血液凝固、自然免疫貪食機能及びLM間の関係性を評価するために、Dシリーズレゾルビン、Eシリーズレゾルビン、プロテクチン、マレシン、リポキシン、プロスタグランジン及びロイコトリエンを重視した7つのLMメタボローム並びにヒト血液の凝固時間経過中のこれらの生合成経路マーカーをモニタリングすることで完全なLMプロファイルを取得することが必須である。このために、新鮮なヒト全血を内因性経路を介して凝固させ(3)、血栓形成及びその収縮を確認するために経時的に(0から24時間)モニターした。SPE-LC-MS/MSメタボロリピドミクスのために細胞を溶解して上澄みから全エイコサノイド及びSPMを抽出するために、各サンプルを素速く急速凍結及び凍結融解した([材料及び方法]参照)。凝固の発生後8~15分の間で血栓が形成され、この後に血栓収縮及び血清形成が起こり、これは収縮した血栓の上に形成された液相を透過した750nm光透過が増大したに基づくと4~8時間の間に急激に増大した(図1A)。各種白血球ポピュレーション(好中球、リンパ球及び単球)の割合及びこれらの生存率を、時間経過を通して割り出した(表2及び表3)。

【0054】

選択的及び高感度標的メタボロリピドミクスによって、異なる時間プロファイルにおいて、血栓形成促進性及び炎症性メディエータ(トロンボキサン(Tx)、プロスタグランジン(PG)及びロイコトリエン(LT))とSPMとの両方について内因性の量が増大したことが確認された(図1B~図1D、表4)。LC-MS/MSにより取得された結果から、各メディエータについて少なくとも6つの診断用イオンが確認され、真のメディエータとLC保持時間も一致した(図1C及び図5)。最初に現れるクラスターは、エイコサノイドTx B2(TxA2のマーカー)、ロイコトリエンB4(LTB4)及びPGD2を含む(図1D及び表4)。RvE1、RvD1、RvD5、MaR1及びLXB4からなる選択SPMクラスターは、PGE2及びPGF2とともにこの時間経過中に増大した。血中にRvD2が存在するものの(図5)、その存在度は凝固中にはっきりと増大はしなかったことに留意されたい。RvD2はヒト脂肪細胞(14)及び他のヒト組織(15-17)によって生成され、真皮熱傷における二次的な血栓症及びネクロシスを防止し(18)、腹部大動脈瘤において保護的な役割をする(19)。主成分分析(PCA)により、Tx B2、PGD2及びLTB4の生成が初期段階の時点に関連し、一方で特異的SPMクラスターは凝固の後期の時間に関連することが確認された(図1E)。し

たがって、前に文書で解説したように(20)初期血小板活性化によりトロンボキサンが生成され、そして進行中の血小板-白血球相互作用及び細胞間生合成が凝固中におけるSPMの一時的な生成に寄与した。

#### 【0055】

##### ヒトSPM生成の制御

健康なドナーでは、血中の凝固の24時間以内に発生したSPMの最高濃度は、RvD1(549 pM)、LXB4(303 pM)、MaR1(209 pM)、RvD5(115 pM)及びRvE1(58 pM)である(平均値は表4に(pg/mlで)示されている)。これらのSPMは個々に濃度が顕著に減少し、抗凝固剤ヘパリンを含む血液において合計98%減少した(図2A及び図6)。血小板-血小板相互作用の遮断剤である血小板インテグリン IIb/3の阻害剤の追加によって、細胞生存率を低下させることなく、SPMクラスターの全量がおおよそ50%(~50%)( $P < 0.01$ )減少し、同時に血栓体積がおおよそ20%(~20%)( $P < 0.01$ )(図2B)増大した(表5)。これらの結果は、血栓形成及び血栓の血小板インテグリン媒介収縮の両方がSPM形成に必要であることを示唆するとともに、多くのSPMが全血中の内因性細胞基質から生成されたことを示唆する。

10

#### 【0056】

##### さらなるSPM生成及び具体的なSPM経路の解明(unmasking)

赤血球は過剰なアデノシンを除去するためにアデノシンデアミナーゼ(ADA)を放出することから、我々はこの機能が凝固中においてSPM生成に影響を及ぼすか否か、もし及ぼすのであれば蓄積されたアデノシンの除去がSPM生成を変えたのか否か疑問を抱いた。アデノシンは、LTB4の生成を含む好中球機能を阻害する(21)。我々は、ADAが血中のSPM生成を統計学的に大幅に増大させたことを見出し(図2C)、これは24時間の時点で凝固単独で達成されるものよりも合計で8倍より多かった(図2C、生理活性LMプロファイル及び経路マーカーの変化については図7A参照)。ADAによるアデノシンの排除により、凝固クラスターからの特異的SPMの生成が増大した。これらはRvD1及びRvD5並びにリポキシンを含み、即ち、EPAからLXA5が生成され、AAから15-epi-LXA4が生成された(図2C、図2D、図7A)。ADA処理されたサンプルにおいてRvD3、RvD4及びRvD6も確認され、存在度が増大した(図2C及び図2E)。これらのDシリーズレゾルピンの最高濃度は、RvD3(150 pM)、RvD4(447 pM)及びRvD6(304 pM)であった。LC-MS/MSに基づくプロトン化アデニンフラグメントのモニタリングによれば、ADAは凝固中1時間でアデノシンを排除し( $P < 0.01$ )、MRMトランジションは268 > 136であった(図2D、[材料及び方法]参照)。加えて、ADAは、凝固の時間経過において血小板-好中球凝集体の数を統計学的に大幅に増大させ(図2D及び図7B)、このことは、アデノシンの除去が、血小板12-LOX及び好中球5-LOXを伴う細胞間生合成(22)を介してSPM生成を促進したことを示唆する(23-25)。これに関連して、血小板-好中球凝集体及び細胞間生合成がLTA4を介してリポキシン生成をもたらす(23, 26)とともに、14-HpDHAを介してマレシン生成をもたらす(24, 25)。AT-LXA4及びLXA5もまた凝固中に存在度が増大した(図2C及び図7A)。PCAによって、LTB4(強力な化学誘引物質)の量が凝固の1時間の時点で最大であった(ADA有り及び無し)ことが示され、アデノシン排除のためにADAを追加した場合に凝固の24時間の時点でSPMは最大量で存在した(図2F)。細胞生存率はADAによって低下しなかった(表5)。これらの結果は、凝固によってヒト血液中の多くのSPM経路が炎症収束性メディエータを生成することが可能となり、SPM経路は局所的なアデノシン濃度及びADAにより実質的に制御されることを示唆する。

20

30

40

#### 【0057】

次に、NSAIDはトロンボキサン及びプロスタグランジンの生合成を遮断するとともに、血中の殺菌を増大させる(27)ことから、我々は治療シクロオキシゲナーゼ1(COX-1)及びCOX-2阻害剤による凝固中におけるSPM生成への影響を評価した。

50

我々は、24時間の時点において、全プロスタグランジン及びトロンボキサン生成が、凝固単独のみにおける場合と比べて、インドメタシンによって遮断された(>99%阻害)ことを見出した(図8A)。インドメタシンの存在下では、全SPM量は、阻害剤の非存在下と比べて大きくは変わらなかった(全時間経過については表6参照)。COX-2阻害剤セレコキシブの追加は、全血中のSPM、プロスタグランジン又はトロンボキサンの量を統計学的に大幅に変えず(図8B)、一方で、リポキシゲナーゼ阻害剤バイカレイン(BAI)、これはシクロオキシゲナーゼについてよりもリポキシゲナーゼについてより選択性が高い(28)、の追加は、SPMの全量を減少させた(図8B)。したがって、これらの結果は、凝固中に生成されたSPMは、リポキシゲナーゼ誘発経路を介して生成されNSAIDの影響は受けなかったことを示唆する。

10

#### 【0058】

過剰な炎症及び血管透過性は、増大した数の赤血球及び微小血栓を含む出血性滲出液の形成を促進し(5)、一方で無菌(29)及び膿性滲出液(30)は主に白血球を含む。凝固中の生体内のSPM生成を評価するために、我々は、確立された無菌ザイモサン誘発マウス腹膜炎モデル(29)をトロンビンの腹腔内(i.p.)投与と組み合わせ用い、これにより出血性滲出液中の赤血球及び白血球の数が増大した(図9A及び図9B)。ヒト血液凝固クラスターからのSPM、即ちRvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1もまた出血性滲出液中に存在し、対照生理食塩水単独と比べて統計学的に大幅に存在度が増大した(図9C及び図9D)。これらの結果は、生体外で確認されたものと同じヒトSPM凝固クラスターが、マウスの出血性滲出液中において生体内でも生成されたことを示す。

20

#### 【0059】

ヒト全血中のSPM生体防御作用及び貪食細胞

RvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1が各々、全血中の貪食細胞(単球及び好中球)内において細胞内シグナル伝達を活性化したことから、我々はこれらのSPMの具体的な及び混合性の生体防御作用を調べた。ヒト全血中において、このSPMパネル(各々1~50nMでともに用いた)によって、その濃度が1nMと低いときに得られた大腸菌の生存が統計学的に大幅に減少し(図3A参照)、その濃度が100pMと低いときに好中球(CD66b+細胞)による大腸菌の貪食が促進した(図3B)。また、SPMパネルによって、フローサイトメトリーにより測定されたとおり、1nM( $P < 0.01$ )にいて全血中の単球(CD14+細胞)による大腸菌の貪食が促進した。

30

#### 【0060】

次に我々は、凝固中に生成された内因性SPMの殺菌への影響を評価した。ヒト血液をリポキシゲナーゼ阻害剤の存在下又は非存在下で大腸菌とともにインキュベートした。細菌のカウント数は、リポキシゲナーゼ阻害剤の存在下において統計学的に大幅により多く(>10倍;  $P < 0.0001$ )(図10A)、これは凝固から得られたこのSPMクラスターのメンバーの存在度が>80%減少したと一致する(図10B)。したがって、内因性SPM生成の阻害によって末梢血貪食による殺菌が弱まった。

#### 【0061】

血栓形成によって、細菌の組織への侵入を最小化するために全身性細菌が微小血管内において区画化され、これにより細菌とマクロファージとの間の血管内の関連性が一部促進される(34)。故に我々は、血栓由来SPMが、血中好中球及び単球による排除に加えてマクロファージによる細菌の貪食を特に促進したのか否か疑問を抱いた。我々は、ヒトマクロファージによる大腸菌の貪食の広がり、凝固クラスターの個々のSPM即ちRvD1、RvE1、LXB4及びMaR1によって統計学的に大幅に促進されたことを見出した。個別にいうと、LXB4及びRvE1がマクロファージによる貪食を最も大きく増大させた。SPMパネルのメンバー、ともに用いられる場合は各々1nMである、は、選択されたSPM単独とともに扱われたマクロファージによる貪食と比べて、マクロファージによる貪食が促進したとの結果をもたらした(図3D)。これらの結果は、血液凝固中に生成されたSPMが、ヒト血液において支配的な白血球(即ち好中球及び単球)によ

40

50

る殺菌及び封じ込めを強く促進することを示唆する。疾病組織対健康組織を用いてこのアプローチの有用性をさらに示すために、固体組織腫瘍と、健康なヒトにおけるヒト臓器のなかでもDHA濃縮箇所として知られる精巢と、直接比較するための悪性精巢とを入手した。各組織から明確に区別されるLM-SPMプロファイルが得られた。例えば、これらの組織は、プロスタグランジンとトロンボキサンの両方を含んでいるが、健康な精巢はSPMの増大した量を示した(図11)。これらのデータは、我々のアプローチを用いて疾病組織及び健康組織をプロファイルし比較することができることを示唆する。

#### 【0062】

##### 議論

トロンボキサン及びプロスタグランジンは確立された凝固のモジュレータである(6)が、ヒト全血中で生成されたレゾルピン及び他のSPMなどのリボキシゲナーゼ由来メディエータの役割については不明である。我々の発見は、SPMの特異的クラスターが凝固中に形成され、これらの作用が、全血中で機能する周辺環境における貪食をターゲットにすることを示唆する。RvE1は、リボゾームS6を活性化させるGPCR仲介経路(即ちChemR23受容体)を介して分離されたマクロファージによる貪食を増大させる(32)。RvD1及びMaR1は各々、ヒト単球中のpCREBの存在度を増大させる(35)。我々の単細胞分析は、RvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1(同じ血栓SPMクラスターの構成要素)が各々、好中球及び単球中のCREB及びS6を活性化させ、これにより血中のこれらの白血球による貪食を促進して病原体に対する防御の最前線を加速させることを示した。我々が確認したヒト全血中の別のSPM活性化経路は、B細胞内のS6のリン酸化である(図3C及び図3D)。これは、SPMがリンパ器官にも存在し(15)かつRvD1、RvD2及びMaR1がT細胞により仲介された適応免疫応答を制御すると仮定すると、B細胞応答でも役割を果たし得る(36)。興味深いのは、オメガ-3脂肪酸を用いた食事の補給が、炎症性サイトカインの生成を弱める(37)とともに末梢血中のSPMの量を増大させる(15, 38)ということである。研究によれば、SPMの前駆体であるオメガ-3必須脂肪酸が、致命的な冠状動脈性心疾患のリスクがより低いことを示すバイオマーカーであることが確認された(39, 40)。したがって、我々の結果は、自然免疫細胞に影響を及ぼす機能性n-3由来SPMの内因性生成を凝固によって開始させる生理学的メカニズムの可能性を示す。血液の生理学的凝固は人間において保護的なものであることから、血栓によるSPM生成は、手術(41)、感染(11, 27, 42, 43)、血管炎症(44, 45)、発作及び癌(46, 47)における病態生理学事象に直接関連する可能性がある。

#### 【0063】

レゾルピン及びプロテクチンD1は血漿及び血清(15, 38)中に存在する。特に、RvD4を一致する総合的基準とともに確認することができる前に(48)、RvD1、RvD2、PD1及び17R-RvD1はヒト血漿中に確認された(38)。したがって、凝固によってSPMクラスター(RvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1)が生成されることを示す本明細書に記載の結果を鑑みると、これがPD1、MaR2、RvD2、RvE2又はRvE3の量の増大を伴うようにはみえない。したがって、血漿SPMの量及び確認された血栓駆動SPMクラスターの特定のメンバーの量は、SPMの血液伝搬性生成、組織から血液循環内へのSPMの放出又はその両方を反映し得る。本明細書で明らかにしたSPMは血流状態下では調べていないものの、COX-2は層せん断応力(49)及び低酸素症(50)によって存在度及び活量が増大したことに留意されたい。また、COX-2は、血中白血球及び血管内皮細胞間の細胞間相互作用によってRvE1を含むSPMの生成にも寄与することができる(8)。

#### 【0064】

我々のプロファイリングシステムの有用性を説明するとともに示すために、我々は、健康組織と疾病組織との間で脂質メディエータSPMプロファイルにおける差異が、このLC-MS/MSに基づくメタボロリポミクスアプローチを用いて区別できるか否かを割り出した。この例として、生殖能力及び精子形成に必須のDHAを豊富に含む(51)健

10

20

30

40

50

康ヒト精巣組織並びに悪性精巣組織から、各々区別可能なプロファイルが得られた。セミノーマ組織はプロスタグランジン及びトロンボキサンの両方を含み、正常精巣組織はSPMの量が増大した(図11)。正常精巣組織は、より統計学的に大幅に多いSPM及びLTB4の量を含み(図11B)、これは、ヒト全血及び固体組織腫瘍を用いた我々のメタボロリピドミクスアプローチの診断能力の可能性を説明するとともに、この組織におけるSPMの機能を示唆する。

#### 【0065】

我々のLMメタボロリピドミクスの結果は、ヒト血液の凝固を介して開始された脂質メディエータのファミリーの合成における時間的シーケンスを示した。血栓形成促進性TXA2及び炎症性エイコサノイド(プロスタグランジン及びロイコトリエン)は、予期されたように血小板によって、そして血小板-白血球凝集体によって急速生成され、炎症の特性炎症収束性メディエータの形成においてピークとなった。これらの収束性メディエータは、RV D1、RV D5、RV E1、LXB4及びMAR1からなる区別可能なSPMクラスターを含み、その各メンバーが、ERK1/2、CREB、p38MAPK、S6及びAKTを含む全血マトリックス内の単白血球内の区別可能な細胞内シグナリング経路を活性化させた。血栓形成を介して生成されたこれらのSPMは、ヒト好中球、単球及びマクロファージによる貪食及び大腸菌の殺菌の両方を促進した。

10

#### 【0066】

生合成されたSPMの全機能的可能性は、SPMの生成を阻害した局所的なアデノシンの蓄積により不明瞭であり、故に炎症部位においてSPM生成を妨害する収束毒物についての追加の証拠を提供する(8)。人為的な赤血球溶血は採血中に時折生じ、これによりアデノシンの量が増大し、血小板-好中球相互作用が減少する(52)。したがって、アデノシンの排除によって血小板-好中球凝集体及びRV D3、RV D4及びRV D6の生合成が増大し、Dシリーズレゾルビンの全スペクトルの定量化が可能となったが、但しRV D2(図1Aから図1E)は除かれ、RV D2は全血凝固中に増大しなかったが、それでも腹部大動脈瘤(19)及び熱傷における二次的ネクロシス(18)に対する保護をする。また、SPMはフィブリン血栓状の血栓を貪食するためにマクロファージを刺激し(53)、これにより血栓のリモデリング又はその除去を容易にする。本明細書で報告した分離及び精密検査方法は、ヒト組織により生成されたSPMのスペクトル及びこの環境におけるそれらの機能の割り出しを可能とすることができる。これとともに、これらの結果は、血液の凝固とヒト組織内の特異的炎症収束性メディエータにより活性化された自然生体防御メカニズムとの間の、SPMにより仲介されるこれまで特徴付けられていなかった関連性を示した。LM及びSPMの基質が重要であり栄養剤を介して生体に取り込まれることを考慮すれば、ヒト組織におけるSPMプロファイリングのためのこのアプローチ及び新規の方法によって個別の及び高精度の薬物療法のための新たな手段が開かれる。

20

30

#### 【0067】

##### [材料及び方法]

##### ヒト末梢血分離

細胞損傷の可能性を最小化するために採血用の特定のチューブ及び採血用シリングを有する19ゲージ翼状針を用いて健康なボランティアから新たなヒト血液をヘパリン(10単位/ml)を用いて又は用いずに採血した。各ボランティアに対し、人研究委員会の承認を受けたプロトコル#1999-P-001297でインフォームドコンセントした。全てのボランティアが提供前2週間以内に非ステロイド性抗炎症薬を摂取したことを否定した。

40

#### 【0068】

##### ヒト血液の凝固

ヒト全血を4mlの一定分量で、抗凝固剤を含まない負に帯電したシリコン被覆10mlチューブ(BD)に移した。ヘパリンを用いる実験については、37でのインキュベーションの前にヘパリン処置血液を15mlポリプロピレンチューブ内に配置した。指定時間でのLMプロファイリングにおいて、全サンプルに対しすぐに精密検査を行い、これによ

50

り全血がドライアイス/イソプロパノール容器内で急速凍結され、4 で100,000 gで遠心分離にかけられる前に室温に戻された(×3サイクル)。上澄み(及び選択実験についての血栓;図6参照)を回収し、LC-MS/MS LMメタボロリポドミクスを施した。

#### 【0069】

##### LMメタボロリポドミクス

エイコサノイド及びSPMの全血液プロファイルを得るために、各サンプルについて、全血を急速凍結しその後室温まで解凍することを含む手順を3回繰り返し、固相抽出(SPE)する前に4 で100,000 gで30分間遠心分離した。タンパク質沈殿を促進するために、d8-5-HETE、d5-RvD2、d5-LXA4、d4-LTB4及びd4-PGE2(各々500 pg; Cayman Chemical社)を含む内部標準を4体積のメタノールとともに足し合せた。4 で1000 gで5分間遠心分離した後、各サンプル体積を、窒素ガス流を用いてメタノールが10%となるまで減少させ、次におよそpH3.5(～pH3.5)まで急速酸性化(<30秒)した後に固相抽出(SPE) Isolute(商標)C18 SPE3 mL、100 mgカートリッジ(バイオターゲット社製)上に搭載した。溶出前に、SPEマトリックスに結合したLMをddH<sub>2</sub>Oを用いて中和した。SPEからのギ酸メチルフракションをゆるやかな窒素流下で乾燥し、メタノール:水が1:1のなかで再懸濁し、その後、島津製作所(日本、東京)製LC-20AD HPLCを備えたQTrap550(AB Sciex社製)から構成される液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析システム内に注入した。Poroshell 120 EC-18カラム(100 mm×4.6 mm×2.7 μm; Agilent Technologies社製)を50 に維持したカラムオープン内に保持し、脂質メ ディエータ(LM)を、55:45:0.01(v/v/v)から100:0:0.01のメタノール/水/酢酸の勾配で、0.5 ml/分の流量で溶出した。関心のある脂質メ ディエータの量をモニター及び定量化するために、多重反応モニタリング(MRM)をMS/MSとともに用いて各分子についてシグネチャーイオンフラグメントをマッチングした(少なくとも6つの診断用イオン;前に記載したように検出限界およそ0.1 pg(～0.1 pg)(15))。前に記載した(15)ようにPCAをバージョン13.0.3のSIMCAソフトウェアを用いて行った。急速凍結血液中の各ターゲットLMについて真の(合成でない)基準及びマトリックス抑制からキャリブレーション曲線を毎日取得するとともに、上澄みを決定してリカバリ及び定量化のために用いた。

10

20

30

40

50

#### 【0070】

##### ヒト血液中のアデノシン定量化

メタボロリポドミクスにおいて用いたようにヒト血液について同じ凍結融解(freeze-thaw)手順を行った。4 で1000 gで5分間遠心分離を行った後、上澄みを4体積のメタノールを用いて元に戻してタンパク質沈殿を促進するために30分間氷の上に保持した。その後サンプルを4 で1000 gで5分間遠心分離した。上澄みをメタノールが<1%となるように元に戻し、その後、LC-MS/MSに持ち込まれ、プロトン化したアデノシンフラグメント(54)についてMRM遷移268>136を介して99%の純アデノシン(Sigma社製)を用いて一致した保持時間によってアデノシンの識別及び定量化が行われた。

#### 【0071】

##### 血栓のフローサイトメリー分析

健康な個人から抗凝固剤を用いずにヒト末梢血を採血し、前述のように24時間凝固させた。血栓をCa<sup>2+</sup>(0.9 mM)及びMg<sup>2+</sup>(0.5 mM)を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を用いて洗浄し、その後緩やかに均質化させて70ミクロンフィルタに通した。血栓由来細胞をフローサイトメリー分析のために染色した。細胞はFACSバッファー(BSA1%及びアジ化ナトリウム0.1%を含むPBS)内で染色された。Fc受容体仲介の非特異性抗体結合がHuman TruStain FcX(登録商標)溶液によって阻害され、その後APC結合抗ヒトCD14(クローン化 HCD14)、P

ercP - Cy5 . 5 結合抗ヒトCD20 (クローン化2H7)、PE結合抗ヒトCD66b (クローン化G10F5) 及びAPC Cy7 結合抗ヒトCD3 (クローン化 HIT3a) (Biolegend社製) を用いてインキュベートした。生存率評価について、製造者のプロトコルに基づきFITC結合アネキシンV (BD社製) 及びヨウ化プロピジウム (PI) を細胞に追加した。サンプルをFACS Canto IIフローサイトメーター (BD Bioscience社製) 及びFlowJo (登録商標) Xソフトウェアを用いて分析した。

#### 【0072】

##### 好中球 - 血小板相互作用

健康な個人から抗凝固剤を用いずに全血を採血し、ADAを用いて又は用いずに1, 6又は24時間凝固させた。血栓をPBSを用いて洗浄し、その後緩やかに均質化させて70ミクロンフィルタに通した。血栓由来好中球 - 血小板相互作用を、FITC結合抗ヒトCD16抗体 (クローン化ebio CB16) 及びPE結合抗ヒトCD42b (クローン化HIP1) を用いてフローサイトメリー分析によって分析した。好中球は、そのCD16の細胞表面発現並びにハイサイド (high side) 及び前方散乱によって識別した。血小板は、対数スケールでのそのローサイド (low side) 及び前方散乱並びにそのCD42bの細胞表面発現に基づき識別した。好中球及び血小板凝集体は、CD14<sup>-</sup>、CD42b<sup>+</sup>、CD16<sup>+</sup>、SSChigh、FSChighのようにCD42b及びCD16についてダブルポジティブであったCD14<sup>-</sup>細胞として識別した。

#### 【0073】

##### マウス腹膜炎及び出血性滲出液

全ての実験手順はブリガム・アンド・ウィメンズ・ホスピタルの動物に関する常任委員会 (プロトコル番号2016N000145) により承認されたものであるとともに、制度上の及びアメリカ国立衛生研究所のガイドラインに従うものである。雄FVBマウス (生後6~8週間) にザイモサンA (1mg/0.5ml; Sigma社製)、トロンピン (5単位/0.5ml; Sigma社製) 又はその両方を4時間与えた。その後、二価カルシウムを用いずに4.0mlの氷冷PBSを用いて腹膜洗浄を行う前にマウスをイソフルランを用いて安楽死させた。PE結合抗マウスLy6G抗体 (クローン化1A8) を用いて好中球の数のメタボロリポドミクス分析及びフローサイトメリー分析をするために洗浄液にLC-MS/MSを行った。洗浄液からの細胞もまたサイトスピンによってガラススライドに付着させ、ライトギムザ染色 (Sigma社製) を用いて赤血球と白血球を互いに差別化して各スライドにつき最低4低倍率視野で数え上げた。細胞はまたディフクイック (Electron Microscopy Science社製) を用いて製造元の使用書に基づき染色され、BZ-IIIピュアソフトウェア (Keyence社製) を用いてモノクロ/カラー切替カメラを備えたKeyence BZ-9000 (BIOREVO社製) 倒立型蛍光位相コントラスト顕微鏡 (倍率40x) を用いて画像を取得した。

#### 【0074】

##### ヒト全血中における殺菌

大腸菌 (血清型O6:K2:H1) をLBブロス中でインキュベートして血液に追加する前に無菌食塩水中で洗浄した。ヒト末梢血 (45µl) を、0.1, 1, 10若しくは50nMのSPMパネル (RvD1, RvD5, RvE1 Mar1, LXB4) の各メンバー又は対照 (PBS5µl, 0.1%エタノール) を用いて37°Cで15分間インキュベートし、その後およそ $2 \times 10^7$ 個 ( $\sim 2 \times 10^7$ ) の大腸菌 (5µl) を用いて37°Cで60分間インキュベートした。その後サンプルを氷上にてPBS中で1:10<sup>5</sup>に希釈して一定分量をLB寒天上に置き37°Cのインキュベータ内で一晩インキュベートした。コロニーを目視により数え上げた。

#### 【0075】

##### 凝固中の全血殺菌

抗凝固剤を含まない新たなヒト血液 (2.0ml) をバイカレイン (LOX阻害剤; Sigma社製) 200mMの存在下又は非存在下で大腸菌 (およそ $7 \times 10^8$ 個) ととも

10

20

30

40

50

にインキュベートし、37℃で24時間凝固させた。血液からの血清を氷上にてPBS中で希釈し、一定分量をLB寒天上に置いて37℃のインキュベータ内で一晚インキュベートした。コロニーを数え上げた。

#### 【0076】

##### ヒト末梢血貪食細胞による貪食

新たなヘパリン処置した全血(100ml)を健康なドナーから採血してSPMのパネル(RvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1;各々0.1~50nMの組み合わせ)又は対照(0.1エタノール)を用いて37℃で15分間インキュベートした。大腸菌をBacLight(登録商標)蛍光Green色素(Life Technologies社製)を用いて製造元の使用書に従い標識付けした。標識付けされた大腸菌をサンプルに、貪食細胞:細菌比1:50で追加して37℃で45分間貪食を開始させた。その後サンプルをAPC-Cy7結合抗ヒトCD66b抗体(好中球の標識付けのため)及びACP-Cy7結合抗ヒトCD14抗体(単球の標識付けのため)(Biolegend社製)を用いて氷上にて15分間インキュベートした。細胞を2mlの氷冷PBSを用いて2度洗浄し、その後、3%パラホルムアルデヒド中で赤血球溶解及び固定を行った。その後細胞を、BD FACS Canto IIフロー血球計算器(BD Biosciences社製)又はImageStream Xイメージングフロー血球計算器(Amnis社製)を用いて分析した。次に好中球(CD66b+)及び単球(CD14+)個体群中の蛍光関連貪食細胞をFlowJoソフトウェアバージョンXを用いて識別した。

10

20

#### 【0077】

##### ヒトマクロファージ

ボストンチルドレンズ病院血液バンクからの匿名の健康な人間のボランティアのヒト末梢血単核細胞を密度勾配であるFicoll-Histopaque分離によって分離し、次に単球精製を行った。次に単球をRPMI1640内で10%ウシ胎児血清(FCS)を用いて7日間インキュベートし、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF、20ng/ml)を用いたインキュベートを介してマクロファージに分化させた。

#### 【0078】

##### 貪食作用のリアルタイム分析

細胞(PBS++中50,000細胞/ウェル)を8ウェルチャンバースライド上にプレートングすることによってヒトマクロファージのリアルタイムイメージングを行った。チャンバースライドは、デジタルガスマキサー及び温度レギュレータ内蔵顕微鏡のためのStage Topインキュベーションシステム(TOKAI HITモデルINUF-K14)内に保持された。SPMのパネル(RvE1、RvD1、RvD5、LXB4及びMaR1;各々又は組み合わせで1nM)を15分間マクロファージに追加し、次にBacLight(登録商標)Green標識された大腸菌を追加した(大腸菌:貪食細胞比50:1)。次に、BZ-III Viewerソフトウェア(Keyence社製)を用いてモノクロ・カラー切替カメラを備えたKeyence BZ-9000(BIOREVO社製)倒立型蛍光位相コントラスト顕微鏡(倍率20x)を用いて37℃で3時間にわたり10分毎に画像を取得した。平均蛍光強度をBZ-III分析器を用いて定量化した。

30

40

#### 【0079】

##### 統計学的分析

グループをスチューデントの両側t検定(2つのグループについて)又はボンフェローニの多重比較検定を用いた1元配置分散分析(3以上のグループについて)により、Prismソフトウェアバージョン6(GraphPad社製)を用いて比較した。統計学的優位性の判定基準は $P < 0.05$ であった。SIMCA13.0.3ソフトウェア(MKS Data Analytics Solutions)を用いて主成分分析(PCA)を行った。

#### 【0080】

50

## 【表 1】

表 1 : LM及びSPMの略語

| 略語                                  | 定義   |
|-------------------------------------|--|
| 5S,15S-diHETE                       | 5S,15S-ジヒドロキシ-エイコサ-6E, 8Z, 11Z, 13E-テトラエン酸   |
| AA                                  | アラキドン酸   |
| COX                                 | シクロオキシゲナーゼ   |
| d deuterated                        | 重水素化   |
| DHA                                 | ドコサヘキサエン酸  |
| EPA                                 | エイコサペンタエン酸   |
| HDHA                                | ヒドロキシドコサヘキサエン酸   |
| HEPE                                | ヒドロキシ-エイコサペンタエン酸   |
| HETE                                | ヒドロキシ-エイコサテトラエン酸   |
| HpETE                               | ヒドロペルオキシ-エイコサテトラエン酸  |
| LC-MS-MS                            | 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法  |
| LM                                  | 脂質メディエータ   |
| LOX                                 | リボキシゲナーゼ   |
| LT                                  | ロイコトリエン  |
| LTB <sub>4</sub>                    | ロイコトリエン B <sub>4</sub> , (5S, 12R-ジヒドロキシ-エイコサ-6Z, 8E, 10E, 14Z-テトラエン酸)                               |
| LX                                  | リボキシン  |
| LXA <sub>4</sub>                    | リボキシン A <sub>4</sub> (5S, 6R, 15S-トリヒドロキシ-エイコサ-7E, 9E, 11Z, 13E-テトラエン酸)                              |
| LXA <sub>5</sub>                    | リボキシン A <sub>5</sub> (5S, 6R, 15S-トリヒドロキシ-エイコサ-7E, 9E, 11Z, 13E, 17Z-エイコサペンタエン酸)                     |
| LXB <sub>4</sub>                    | リボキシン B <sub>4</sub> , (5S, 14R, 15S-トリヒドロキシ-エイコサ-6E, 8Z, 10E, 12E-テトラエン酸)                           |
| MaR1                                | マレシン 1 (7R, 14S-ジヒドロキシドコサ-4Z, 8E, 10E, 12Z, 16Z, 19Z-ヘキサエン酸)   |
| MRM                                 | 多重反応モニタリング   |
| PCA                                 | 主成分分析  |
| PD                                  | プロテクチン   |
| PD1                                 | プロテクチン D1 (10R, 17S-ジヒドロキシドコサ-4Z, 7Z, 11E, 13E, 15Z, 19Z-ヘキサエン酸), also known as ニューロプロテクチン D1 (NPD1) |
| PGD <sub>2</sub>                    | 11-オキソ-9 $\alpha$ , 15S-ジヒドロキシ-プロスタ-5Z, 13E-ジエン-1-酸  |
| PGE <sub>2</sub>                    | 9-オキソ-11 $\alpha$ , 15S-ジヒドロキシ-プロスタ-5Z, 13E-ジエン-1-酸  |
| PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> | 9 $\alpha$ , 11 $\alpha$ , 15S-トリヒドロキシ-プロスタ-5Z, 13E-ジエン酸   |
| Rv                                  | レゾルビン  |
| RvD1                                | レゾルビン D1 (7S, 8R, 17S-トリヒドロキシドコサ-4Z, 9E, 11E, 13Z, 15E, 19Z-ヘキサエン酸)                                  |
| RvD2                                | レゾルビン D2 (7S, 16R, 17S-トリヒドロキシドコサ-4Z, 8E, 10Z, 12E, 14E, 19Z-ヘキサエン酸)                                 |
| RvD3                                | レゾルビン D3 (4S, 11R, 17S-トリヒドロキシドコサ-5Z, 7E, 9E, 13Z, 15E, 19Z-ヘキサエン酸)                                  |
| RvD5                                | レゾルビン D5 (7S, 17S-ジヒドロキシドコサ-4Z, 8E, 10Z, 13Z, 15E, 19Z-ヘキサエン酸)                                       |
| RvE1                                | レゾルビン E1 (5S, 12R, 18R-トリヒドロキシ-エイコサ-6Z, 8E, 10E, 14Z, 16E-ペンタエン酸)                                    |
| RvE2                                | レゾルビン E2 (5S, 18R-ジヒドロキシ-エイコサ-6E, 8Z, 11Z, 14Z, 16E-ペンタエン酸)  |
| RvE3                                | レゾルビン E3 (17R,18R-ジヒドロキシ-エイコサ-5Z, 8Z, 11Z, 13E, 15E-ペンタエン酸)  |
| SPM                                 | 特異的炎症収束性メディエータ   |
| SRM                                 | 標準物質   |
| Tx                                  | トロンボキサン  |
| TxB <sub>2</sub>                    | 9 $\alpha$ , 11, 15S-トリヒドロキシトロンボキサ-5Z, 13E-ジエン-1-酸   |

## 【 0 0 8 1 】

表 2 において、白血球及びリンパ球の個体数は凝固中で一定である。5つの別個の実験

10

20

30

40

50

(n = 5)からの細胞個体数を各々フローサイトメリー分析を用いて分析した(細胞型マーカーについては上記参照)。値は平均 ± SEMである。

【0082】

【表2】

| 血液凝固時間 | 単球 (%)    | 好中球 (%)    | B細胞 (%)   | T細胞 (%)    |
|--------|-----------|------------|-----------|------------|
| 0 時間   | 3.6 ± 1.2 | 35.7 ± 6.0 | 6.6 ± 1.8 | 30.0 ± 3.7 |
| 1 時間   | 3.2 ± 0.4 | 32.5 ± 7.6 | 2.0 ± 0.1 | 21.8 ± 1.0 |
| 6 時間   | 3.6 ± 0.4 | 36.4 ± 2.5 | 2.8 ± 1.0 | 26.1 ± 3.1 |
| 24 時間  | 2.1 ± 0.1 | 30.2 ± 3.4 | 2.1 ± 0.4 | 19.2 ± 2.7 |

10

【0083】

表3において、白血球及びリンパ球は凝固中に生存維持した。5つの別個の実験(n = 5)からの細胞生存率を各々フローサイトメリー分析を用いて分析した(アポトーシス及びネクローシスについてのマーカーについては上記参照)。値は平均 ± SEMである。白血球及びリンパ球は凝固 + 中に生存維持した。

【0084】

【表3】

| 血液凝固時間 | 生存 (%)     | 壊死 (%)    | 初期アポトーシス (%) | 後期アポトーシス (%) |
|--------|------------|-----------|--------------|--------------|
| 0 時間   | 88.3 ± 1.0 | 0.8 ± 0.2 | 10.4 ± 0.7   | 1.5 ± 0.6    |
| 1 時間   | 84.8 ± 1.7 | 1.0 ± 0.3 | 12.0 ± 1.9   | 2.2 ± 0.5    |
| 6 時間   | 79.3 ± 2.2 | 1.3 ± 0.2 | 16.1 ± 1.6   | 3.9 ± 0.4    |
| 24 時間  | 81.6 ± 2.5 | 0.8 ± 0.6 | 10.6 ± 1.2   | 6.4 ± 2.4    |

20

【0085】

表4は凝固中のヒト全血中のLM濃度を示す。LC-MS-MSに基づくLMメタボロリポドミクス分析を、凝固後0, 0.25, 0.5, 1, 3, 6及び24時間後において回収されたヒト血液を用いて行った。LM濃度(pg/ml)を12人のドナーの平均 ± SEMとして表す。( - )は濃度が < 0.1 pg/mlであったことを示す。

【0086】

30

【表 4】

| メディアエータ       | 凝固                |                   |                   | 凝固                |                    |                    | 凝固                 |                    |                   | 凝固                |     |     | 凝固  |     |     |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
|               | t = 0 h           | t = 0.25 h        | t = 0.5 h         | t = 1 h           | t = 3 h            | t = 6 h            | t = 24 h           | SEM                | Avg               | SEM               | Avg | SEM | Avg | SEM | Avg |
| DHA           | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| メタボローム        | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD1          | 0.8 ± 0.6         | 1.3 ± 0.8         | 1.1 ± 0.7         | 1.7 ± 0.8         | 3.4 ± 0.8          | 6.8 ± 0.8          | 10.7 ± 2.2         | 3.1 ± 3.1          | 57.8 ± 57.8       | 18.9 ± 18.9       | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD2          | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD3          | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD4          | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD5          | 0.8 ± 0.6         | 1.3 ± 0.8         | 1.1 ± 0.7         | 1.7 ± 0.8         | 3.4 ± 0.8          | 6.8 ± 0.8          | 10.7 ± 2.2         | 3.1 ± 3.1          | 57.8 ± 57.8       | 18.9 ± 18.9       | -   | -   | -   | -   | -   |
| RVD6          | -                 | -                 | -                 | -                 | -                  | -                  | -                  | -                  | -                 | -                 | -   | -   | -   | -   | -   |
| PD1           | 0.8 ± 0.3         | 0.8 ± 0.3         | 0.8 ± 0.3         | 0.8 ± 0.4         | 0.8 ± 0.4          | 1.5 ± 0.3          | 2.2 ± 0.6          | 7.9 ± 1.1          | 20.3 ± 0.7        | 55.8 ± 1.6        | -   | -   | -   | -   | -   |
| 10S,17S-dHDHA | 1.3 ± 0.6         | 1.1 ± 0.5         | 0.8 ± 0.4         | 1.0 ± 0.4         | 2.4 ± 0.4          | 4.1 ± 0.7          | 7.9 ± 1.1          | 10.3 ± 5.1         | 6.1 ± 6.1         | 6.1 ± 6.1         | -   | -   | -   | -   | -   |
| マレシン1         | 1.4 ± 1.2         | 2.9 ± 1.9         | 2.4 ± 1.6         | 1.6 ± 1.1         | 5.2 ± 1.1          | 7.1 ± 3.4          | 10.3 ± 5.1         | 10.3 ± 5.1         | 6.1 ± 6.1         | 6.1 ± 6.1         | -   | -   | -   | -   | -   |
| 7S,14S-dHDHA  | 2.2 ± 1.5         | 2.6 ± 1.9         | 0.5 ± 1.0         | 1.1 ± 1.0         | 3.5 ± 1.0          | 3.7 ± 2.9          | 9.7 ± 3.3          | 9.7 ± 3.3          | 5.7 ± 5.7         | 5.7 ± 5.7         | -   | -   | -   | -   | -   |
| 4S,14S-dHDHA  | 44.1 ± 32.6       | 25.4 ± 16.7       | 15.2 ± 8.9        | 14.3 ± 8.7        | 32.9 ± 8.7         | 60.2 ± 14.0        | 111.5 ± 31.6       | 111.5 ± 31.6       | 55.8 ± 55.8       | 55.8 ± 55.8       | -   | -   | -   | -   | -   |
| 17-HDHA       | 61.2 ± 37.5       | 84.5 ± 55.1       | 59.6 ± 35.3       | 65.2 ± 38.4       | 152.7 ± 38.4       | 230.8 ± 72.8       | 439.7 ± 126.8      | 439.7 ± 126.8      | 203.3 ± 203.3     | 203.3 ± 203.3     | -   | -   | -   | -   | -   |
| 14-HDHA       | 893.1 ± 335.8     | 1185.7 ± 585.9    | 662.2 ± 198.9     | 588.1 ± 172.3     | 2294.6 ± 172.3     | 3295.5 ± 979.2     | 4038.9 ± 1732.6    | 4038.9 ± 1732.6    | 1777.5 ± 1777.5   | 1777.5 ± 1777.5   | -   | -   | -   | -   | -   |
| 7-HDHA        | 11.5 ± 9.1        | 12.7 ± 10.0       | 13.2 ± 10.5       | 11.9 ± 9.0        | 13.7 ± 9.0         | 17.6 ± 8.8         | 28.8 ± 12.6        | 28.8 ± 12.6        | 20.1 ± 20.1       | 20.1 ± 20.1       | -   | -   | -   | -   | -   |
| 4-HDHA        | 70.0 ± 52.0       | 59.7 ± 36.0       | 90.4 ± 67.6       | 73.9 ± 54.7       | 108.0 ± 54.7       | 97.7 ± 78.0        | 240.5 ± 61.4       | 240.5 ± 61.4       | 155.5 ± 155.5     | 155.5 ± 155.5     | -   | -   | -   | -   | -   |
| DHA           | 89076.1 ± 36548.6 | 83199.7 ± 18381.6 | 82468.1 ± 21723.9 | 95770.8 ± 28977.8 | 127830.5 ± 28977.8 | 131952.1 ± 35145.9 | 183397.3 ± 36032.5 | 183397.3 ± 36032.5 | 52665.7 ± 52665.7 | 52665.7 ± 52665.7 | -   | -   | -   | -   | -   |

10

20

30

40



表 5 において、白血球及びリンパ球はエプチフィバチド又は ADA の存在下で凝固中生存維持した。細胞生存率  $n = 3$  ; フローサイトメリー分析を用いて分析した (アポトーシス及びネクローシスについてのマーカーについては方法参照)。値は平均  $\pm$  SEM である。

【 0 0 8 8 】

【 表 5 】

| 処理         | 生存 (%)         | 壊死 (%)        | 初期アポトーシス (%)  | 後期アポトーシス (%)  |
|------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| 対照         | $86.5 \pm 2.3$ | $1.4 \pm 0.5$ | $8.0 \pm 1.8$ | $4.0 \pm 0.6$ |
| + エプチフィバチド | $90.6 \pm 1.3$ | $0.9 \pm 0.1$ | $5.1 \pm 1.9$ | $2.0 \pm 0.5$ |
| + ADA      | $81.5 \pm 0.5$ | $2.7 \pm 2.0$ | $9.9 \pm 2.9$ | $5.8 \pm 1.4$ |

10

【 0 0 8 9 】

表 6 はインドメタシンの存在下の凝固中のヒト全血中の LM 濃度を示す。LC - MS - MS に基づく LM メタボロリピドミクス分析を、インドメタシンの存在下で、凝固後 0 , 0 . 2 5 , 0 . 5 , 1 , 3 , 6 及び 2 4 時間で回収されたヒト血液を用いて行った。LM 濃度 (  $\text{pg} / \text{ml}$  ) を 6 人のドナーの平均  $\pm$  SEM として表す。( - ) は濃度が  $< 0 . 1 \text{ pg} / \text{ml}$  であったことを示す。

【 0 0 9 0 】

20

【表 6】

| メディエータ        | インドメタシン<br>t = 0 h |           | インドメタシン<br>t = 0.25 h |           | インドメタシン<br>t = 0.5 h |           | インドメタシン<br>t = 1 h |           | インドメタシン<br>t = 3 h |           | インドメタシン<br>t = 6 h |           | インドメタシン<br>t = 24 h |     |
|---------------|--------------------|-----------|-----------------------|-----------|----------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|-----------|---------------------|-----|
|               | Avg                | SEM       | Avg                   | SEM       | Avg                  | SEM       | Avg                | SEM       | Avg                | SEM       | Avg                | SEM       | Avg                 | SEM |
| DHA           | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| メタボローム        | 0.4                | ± 0.3     | 0.5                   | ± 0.3     | 0.6                  | ± 0.4     | 1.8                | ± 0.8     | 5.6                | ± 2.3     | 34.2               | ± 10.6    | -                   | -   |
| RVD1          | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| RVD2          | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| RVD3          | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| RVD4          | 1.2                | ± 0.8     | 1.6                   | ± 1.1     | 2.1                  | ± 1.7     | 7.0                | ± 3.7     | 10.1               | ± 4.3     | 14.7               | ± 6.1     | -                   | -   |
| RVD5          | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| RVD6          | -                  | -         | -                     | -         | -                    | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                  | -         | -                   | -   |
| PD1           | 0.5                | ± 0.3     | 0.5                   | ± 0.2     | 0.6                  | ± 0.5     | 0.6                | ± 0.2     | 0.8                | ± 0.3     | 1.6                | ± 0.5     | -                   | -   |
| 10S,17S-diHDA | 0.3                | ± 0.2     | 0.4                   | ± 0.3     | 0.4                  | ± 0.3     | 1.5                | ± 0.6     | 3.6                | ± 1.2     | 5.5                | ± 1.9     | -                   | -   |
| マレシン 1        | 1.0                | ± 0.8     | 1.9                   | ± 1.6     | 0.4                  | ± 0.5     | 1.4                | ± 0.8     | 1.8                | ± 1.2     | 4.8                | ± 2.8     | -                   | -   |
| 7S,14S-diHDA  | 0.7                | ± 0.8     | -                     | -         | 0.2                  | ± 0.6     | 0.4                | ± 1.9     | 3.4                | ± 2.0     | 1.0                | ± 2.0     | -                   | -   |
| 4S,14S-diHDA  | 2.8                | ± 1.5     | 3.2                   | ± 1.9     | 3.0                  | ± 1.5     | 9.0                | ± 4.4     | 12.2               | ± 4.7     | 15.7               | ± 7.0     | -                   | -   |
| 17-HDHA       | 16.2               | ± 8.7     | 18.9                  | ± 8.5     | 19.7                 | ± 10.6    | 62.7               | ± 22.6    | 95.8               | ± 24.2    | 179.7              | ± 35.1    | -                   | -   |
| 14-HDHA       | 485.7              | ± 259.3   | 491.0                 | ± 202.0   | 436.3                | ± 156.7   | 987.4              | ± 328.3   | 1218.7             | ± 238.6   | 1492.9             | ± 223.7   | -                   | -   |
| 7-HDHA        | 1.4                | ± 0.6     | 1.6                   | ± 0.6     | 1.9                  | ± 0.4     | 3.6                | ± 1.0     | 4.3                | ± 0.9     | 6.2                | ± 1.6     | -                   | -   |
| 4-HDHA        | 8.5                | ± 4.1     | 10.7                  | ± 4.9     | 11.3                 | ± 3.2     | 17.1               | ± 4.7     | 26.6               | ± 5.8     | 42.3               | ± 11.8    | -                   | -   |
| DHA           | 28879.8            | ± 12073.0 | 49377.8               | ± 20997.4 | 57569.2              | ± 19253.8 | 85033.5            | ± 40114.6 | 84930.1            | ± 35684.3 | 108998.3           | ± 40268.0 | -                   | -   |

10

20

30

40



## [ 参考文献 ]

いかなる文献の引用も本発明に対する先行技術であることを認めるものと解釈されるべきではない。

1. J. Hunter, *A Treatise on the Blood, Inflammation, and Gun-Shot Wounds* (1794). (The Classics of Medicine Library, Special Ed., Birmingham, Alabama, 1982)
2. R. De Caterina, n-3 fatty acids in cardiovascular disease. *N Engl J Med* 364, 2439-2450 (2011).
3. R. I. Handin, S. E. Lux, T. P. Stossel, Eds., *Blood: Principles and Practice of Hematology*, (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2003). 10
4. H. Z. Movat, in *Chemical Messengers of the Inflammatory Process*, J. C. Hock, Ed. (Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1979), chap. 2.
5. S. L. Robbins, R. Cotran, *Pathologic Basis of Disease*. (W.B. Saunders Co., Philadelphia, ed. 2nd, 1979), pp. 1598.
6. B. Samuelsson, M. Goldyne, E. Granstrom, M. Hamberg, S. Hammarstrom, C. Malmsten, Prostaglandins and thromboxanes. *Annu Rev Biochem* 47, 997-1029 (1978).
7. J. Z. Haeggstrom, C. D. Funk, Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chem Rev* 111, 5866-5898 (2011).
8. C. N. Serhan, Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510, 92-101 (2014). 20
9. R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454, 428-435 (2008).
10. C. Nathan, Fresh approaches to anti-infective therapies. *Sci Transl Med* 4, 140sr142 (2012).
11. M. J. Delano, P. A. Ward, Sepsis-induced immune dysfunction: can immune therapies reduce mortality? *J Clin Invest* 126, 23-31 (2016).
12. J. N. Fullerton, D. W. Gilroy, Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov* 15, 551-567 (2016).
13. J. Dalli, J. W. Winkler, R. A. Colas, H. Arnardottir, C. Y. C. Cheng, N. Chiang, N. A. Petasis, C. N. Serhan, Resolvin D3 and aspirin-triggered resolvin D3 are potent immunoresolvents. *Chem. Biol.* 20, 188-201 (2013). 30
14. J. Claria, J. Dalli, S. Yacoubian, F. Gao, C. N. Serhan, Resolvin D1 and resolvin D2 govern local inflammatory tone in obese fat. *J Immunol* 189, 2597-2605 (2012).
15. R. A. Colas, M. Shinohara, J. Dalli, N. Chiang, C. N. Serhan, Identification and signature profiles for pro-resolving and inflammatory lipid mediators in human tissue. *Am J Physiol Cell Physiol* 307, C39-54 (2014).
16. A. E. Barden, E. Mas, T. A. Mori, n-3 Fatty acid supplementation and pro-resolving mediators of inflammation. *Curr. Opin. Lipidol.* 27, 26-32 (2016).
17. A. E. Barden, M. Moghaddami, E. Mas, M. Phillips, L. G. Cleland, T. A. Mori, Specialised pro-resolving mediators of inflammation in inflammatory arthritis. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 107, 24-29 (2016). 40
18. S. Bohr, S. J. Patel, D. Sarin, D. Irimia, M. L. Yarmush, F. Berthiaume, Resolvin D2 prevents secondary thrombosis and necrosis in a mouse burn wound model. *Wound Repair Regen.* 21, 35-43 (2013).
19. N. H. Pope, M. Salmon, J. P. Davis, A. Chatterjee, G. Su, M. S. Conte, G. Ailawadi, G. R. Upchurch, Jr., D-series resolvins inhibit murine abdominal aortic aneurysm formation and increase M2 macrophage polarization. *FASEB J.* 30, 4192-4201 (2016).
20. M. Hamberg, J. Svensson, B. Samuelsson, Thromboxanes: a new group of bio- 50

- ogically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72, 2994-2998 (1975).
21. E. Krump, S. Picard, J. Mancini, P. Borgeat, Suppression of leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis by endogenous adenosine in ligand-activated human neutrophils. *J. Exp. Med.* 186, 1401-1406 (1997).
22. A. J. Marcus, M. J. Broekman, J. H. Drosopoulos, N. Islam, D. J. Pinsky, C. Sesti, R. Levi, Heterologous cell-cell interactions: thromboregulation, cerebroprotection and cardioprotection by CD39 (NTPDase-1). *J Thromb Haemost* 1, 2497-2509 (2003).
23. C. N. Serhan, K. A. Sheppard, Lipoxin formation during human neutrophil-platelet interactions. Evidence for the transformation of leukotriene A<sub>4</sub> by platelet 12-lipoxygenase in vitro. *J. Clin. Invest.* 85, 772-780 (1990). 10
24. R. E. Abdulnour, J. Dalli, J. K. Colby, N. Krishnamoorthy, J. Y. Timmons, S. H. Tan, R. A. Colas, N. A. Petasis, C. N. Serhan, B. D. Levy, Maresin 1 biosynthesis during platelet-neutrophil interactions is organ-protective. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 16526-16531 (2014).
25. B. Deng, C. W. Wang, H. H. Arnardottir, Y. Li, C. Y. Cheng, J. Dalli, C. N. Serhan, Maresin biosynthesis and identification of maresin 2, a new anti-inflammatory and pro-resolving mediator from human macrophages. *PLoS One* 9, e102362 (2014). 20
26. V. Brancaleone, T. Gobbetti, N. Cenac, P. le Faouder, B. Colom, R. J. Flower, N. Vergnolle, S. Nourshargh, M. Perretti, A vasculo-protective circuit centered on Lipoxin A<sub>4</sub> and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A<sub>4</sub> operative in murine microcirculation. *Blood*, 10.1182/blood-2013-1104-496661 [doi] (2013).
27. M. J. Stables, J. Newson, S. S. Ayoub, J. Brown, C. J. Hyams, D. W. Gilroy, Priming innate immune responses to infection by cyclooxygenase inhibition kills antibiotic-susceptible and -resistant bacteria. *Blood* 116, 2950-2959 (2010).
28. K. Sekiya, H. Okuda, Selective inhibition of platelet lipoxygenase by baicalein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 105, 1090-1095 (1982).
29. J. M. Schwab, N. Chiang, M. Arita, C. N. Serhan, Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. *Nature* 447, 869-874 (2007). 30
30. M. Spite, L. V. Norling, L. Summers, R. Yang, D. Cooper, N. A. Petasis, R. J. Flower, M. Perretti, C. N. Serhan, Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature* 461, 1287-1291 (2009).
31. B. Gaudilliere, G. K. Fragiadakis, R. V. Bruggner, M. Nicolau, R. Finck, M. Tingle, J. Silva, E. A. Ganio, C. G. Yeh, W. J. Maloney, J. I. Huddleston, S. B. Goodman, M. M. Davis, S. C. Bendall, W. J. Fantl, M. S. Angst, G. P. Nolan, Clinical recovery from surgery correlates with single-cell immune signatures. *Sci Transl Med* 6, 255ra131 (2014).
32. G. Fredman, C. N. Serhan, Specialized proresolving mediator targets for RvE1 and RvD1 in peripheral blood and mechanisms of resolution. *Biochem J* 437, 185-197 (2011). 40
33. A. D. Amir el, K. L. Davis, M. D. Tadmor, E. F. Simonds, J. H. Levine, S. C. Bendall, D. K. Shenfeld, S. Krishnaswamy, G. P. Nolan, D. Pe'er, viSNE enables visualization of high dimensional single-cell data and reveals phenotypic heterogeneity of leukemia. *Nat Biotechnol* 31, 545-552 (2013).
34. S. Massberg, L. Grahl, M. L. von Bruehl, D. Manukyan, S. Pfeiler, C. Goosmann, V. Brinkmann, M. Lorenz, K. Bidzhekov, A. B. Khandagale, I. Konrad, E. Kernerkecht, K. Reges, S. Holdenrieder, S. Braun, C. Reinhardt, M. Spannagl, K. T. Preissner, B. Engelmann, Reciprocal coupling of coagulation and innate immunity 50

- via neutrophil serine proteases. *Nat. Med.* 16, 887-896 (2010).
35. Z. Gu, G. J. Lamont, R. J. Lamont, S. M. Uriarte, H. Wang, D. A. Scott, R. esolvin D1, resolvin D2 and maresin 1 activate the GSK3beta anti-inflammatory axis in TLR4-engaged human monocytes. *Innate Immun* 22, 186-195 (2016).
36. V. Chiurchiu, A. Leuti, J. Dalli, A. Jacobsson, L. Battistini, M. Maccarrone, C. N. Serhan, Proresolving lipid mediators resolvin D1, resolvin D2, and maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med* 8, 353ra111 (2016).
37. S. Endres, R. Ghorbani, V. E. Kelley, K. Georgilis, G. Lonemann, J. W. van der Meer, J. G. Cannon, T. S. Rogers, M. S. Klempner, P. C. Weber, et al., The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med* 320, 265-271 (1989). 10
38. E. Mas, K. D. Croft, P. Zahra, A. Barden, T. A. Mori, Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin. Chem.* 58, 1476-1484 (2012).
39. L. C. Del Gobbo, F. Imamura, S. Aslibekyan, M. Marklund, J. K. Virtanen, M. Wennberg, M. Y. Yakoob, S. E. Chiuve, L. Dela Cruz, A. C. Frazier-Wood, A. M. Fretts, E. Guallar, C. Matsumoto, K. Prem, T. Tanaka, J. H. Wu, X. Zhou, C. Helmer, E. Ingelsson, J. M. Yuan, P. Barberger-Gateau, H. Campos, P. H. Chaves, L. Djousse, G. G. Giles, J. Gomez-Aracena, A. M. Hodge, F. B. Hu, J. H. Jansson, I. Johansson, K. T. Khaw, W. P. Koh, R. N. Lemaitre, L. Lind, R. N. Luben, E. B. Rimm, U. Riserus, C. Samieri, P. W. Franks, D. S. Siscovick, M. Stampfer, L. M. Steffen, B. T. Steffen, M. Y. Tsai, R. M. van Dam, S. Voutilainen, W. C. Willett, M. Woodward, D. Mozaffarian, omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Biomarkers and Coronary Heart Disease: Pooling Project of 19 Cohort Studies. *JAMA Intern Med* 176, 1155-1166 (2016). 20
40. A. Sekikawa, L. Steingrimsdottir, H. Ueshima, C. Shin, J. D. Curb, R. W. Evans, A. M. Hauksdottir, A. Kadota, J. Choo, K. Masaki, B. Thorsson, L. J. Launer, M. E. Garcia, H. Maegawa, B. J. Willcox, G. Eiriksdottir, A. Fujiyoshi, K. Miura, T. B. Harris, L. H. Kuller, V. Gudnason, Serum levels of marine-derived n-3 fatty acids in Icelanders, Japanese, Koreans, and Americans--a descriptive epidemiologic study. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 87, 11-16 (2012). 30
41. H. Uno, K. Furukawa, D. Suzuki, H. Shimizu, M. Ohtsuka, A. Kato, H. Yoshitomi, M. Miyazaki, Immunonutrition suppresses acute inflammatory responses through modulation of resolvin E1 in patients undergoing major hepatobiliary resection. *Surgery* 160, 228-236 (2016).
42. C. R. Lee, D. C. Zeldin, Resolvin Infectious Inflammation by Targeting the Host Response. *N. Engl. J. Med.* 373, 2183-2185 (2015).
43. J. K. Baillie, P. Digard, Influenza--time to target the host? *N. Engl. J. Med.* 369, 191-193 (2013). 40
44. I. Tabas, K. E. Bornfeldt, Macrophage Phenotype and Function in Different Stages of Atherosclerosis. *Circ Res* 118, 653-667 (2016).
45. B. E. Sansbury, M. Spite, Resolution of Acute Inflammation and the Role of Resolvins in Immunity, Thrombosis, and Vascular Biology. *Circ Res* 119, 113-130 (2016).
46. G. P. Pidgeon, J. Lysaght, S. Krishnamoorthy, J. V. Reynolds, K. O'Byrne, D. Nie, K. V. Honn, Lipoxygenase metabolism: roles in tumor progression and survival. *Cancer Metastasis Rev* 26, 503-524 (2007).
47. C. N. Serhan, G. Fredman, R. Yang, S. Karamnov, L. S. Belayev, N. G. Baza 50

n, M. Zhu, J. W. Winkler, N. A. Petasis, Novel proresolving aspirin-triggered DH A pathway. *Chem. Biol.* 18, 976-987 (2011).

48. J. W. Winkler, S. K. Orr, J. Dalli, C. Y. Cheng, J. M. Sanger, N. Chiang, N. A. Petasis, C. N. Serhan, Resolvin D4 stereoassignment and its novel actions in host protection and bacterial clearance. *Sci Rep* 6, 18972 (2016).

49. J. N. Topper, J. Cai, D. Falb, M. A. Gimbrone, Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: Cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 10417-10422 (1996).

50. C. N. Serhan, C. B. Clish, J. Brannon, S. P. Colgan, N. Chiang, K. Gronert, Novel functional sets of lipid-derived mediators with antiinflammatory actions generated from omega-3 fatty acids via cyclooxygenase 2-nonsteroidal antiinflammatory drugs and transcellular processing. *J. Exp. Med.* 192, 1197-1204 (2000).

51. M. Roqueta-Rivera, C. K. Stroud, W. M. Haschek, S. J. Akare, M. Segre, R. S. Brush, M. P. Agbaga, R. E. Anderson, R. A. Hess, M. T. Nakamura, Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. *J. Lipid Res.* 51, 360-367 (2010).

52. T. Minamino, M. Kitakaze, H. Asanuma, Y. Tomiyama, M. Shiraga, H. Sato, Y. Ueda, H. Funaya, T. Kuzuya, Y. Matsuzawa, M. Hori, Endogenous adenosine inhibits P-selectin-dependent formation of coronary thromboemboli during hypoperfusion in dogs. *J. Clin. Invest.* 101, 1643-1653 (1998).

53. T. K. Elajami, R. A. Colas, J. Dalli, N. Chiang, C. N. Serhan, F. K. Weltly, Specialized proresolving lipid mediators in patients with coronary artery disease and their potential for clot remodeling. *FASEB J.* 30, 2792-2801 (2016).

54. R. Liu, Y. Ye, L. Qiang, X. Liao, Y. Zhao, The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. *Life Sci. J.* 5, 37-40 (2008).

55. B. Bodenmiller, E. R. Zunder, R. Finck, T. J. Chen, E. S. Savig, R. V. Bruggner, E. F. Simonds, S. C. Bendall, K. Sachs, P. O. Krutzik, G. P. Nolan, Multiplexed mass cytometry profiling of cellular states perturbed by small-molecule regulators. *Nat Biotechnol* 30, 858-867 (2012).

【 0 0 9 2 】

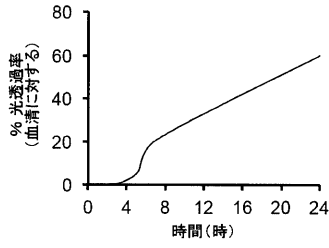
本発明は、一以上の好ましい実施形態に基づき記載され、明確に記載されたもの以外にも、多くの同等のもの、代替のもの、パリエーション及び修正が可能であるとともに本発明の範囲内であるところは明らかである。

10

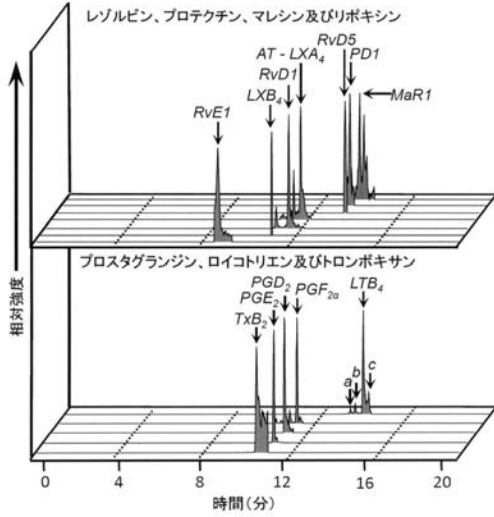
20

30

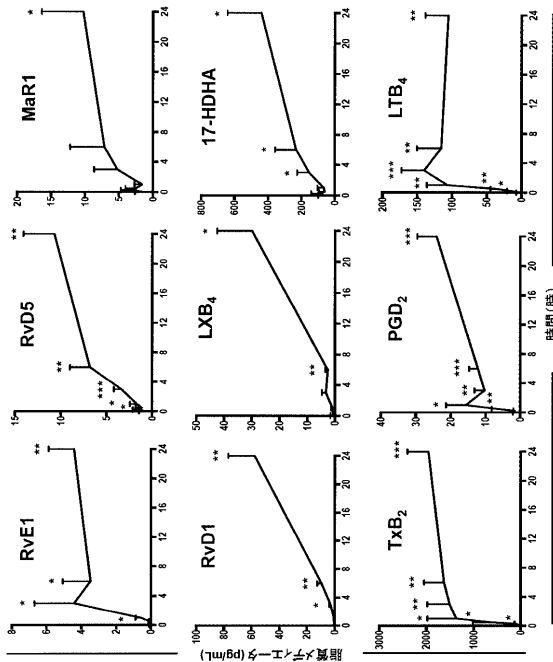
【 図 1 A 】



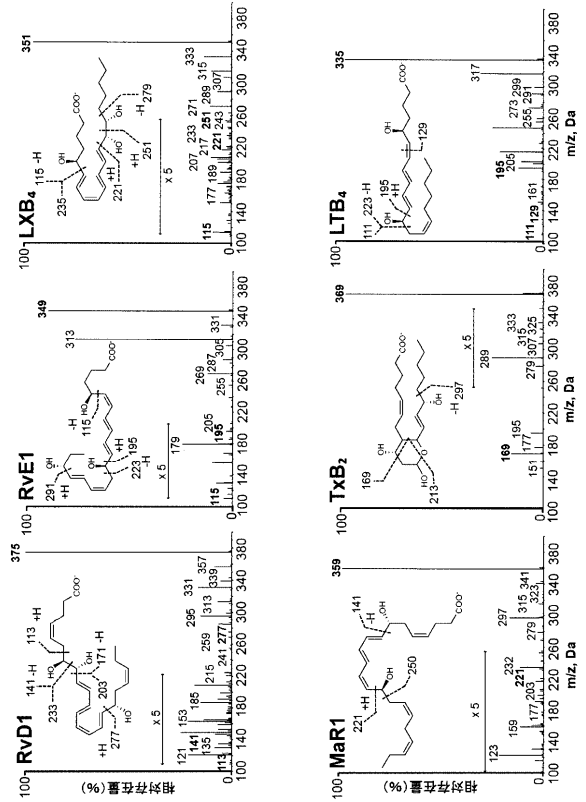
【 図 1 B 】



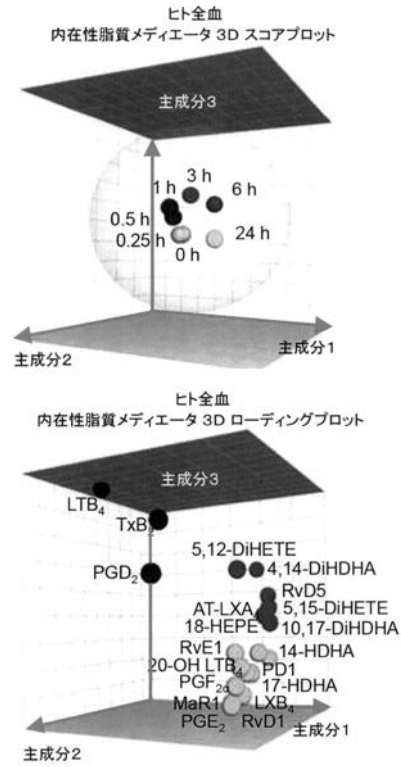
【 図 1 D 】



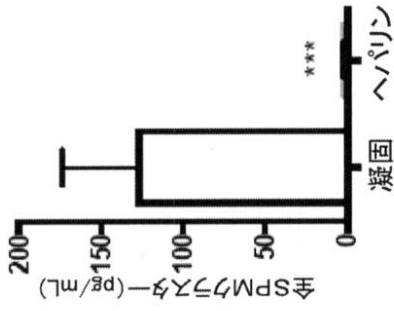
【 図 1 C 】



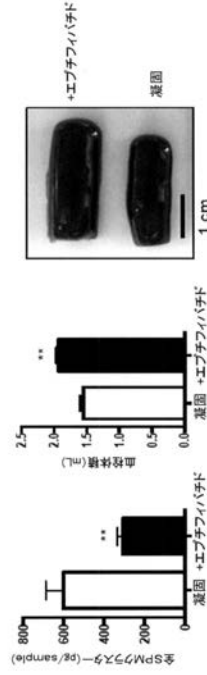
【 図 1 E 】



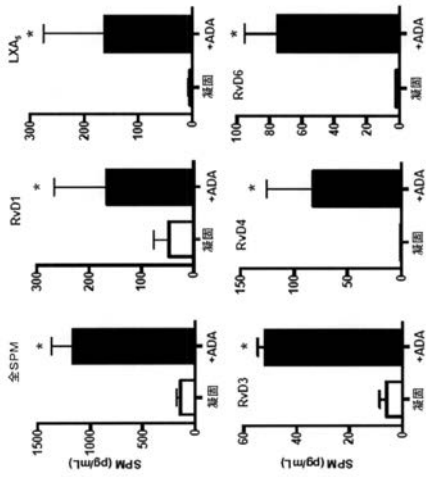
【 図 2 A 】



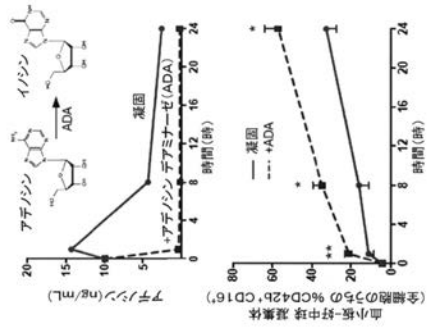
【 図 2 B 】



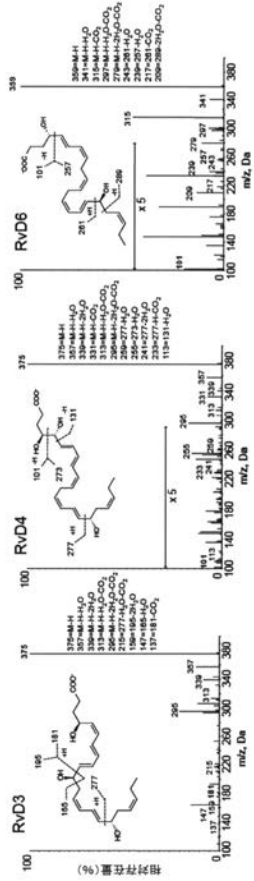
【 図 2 C 】



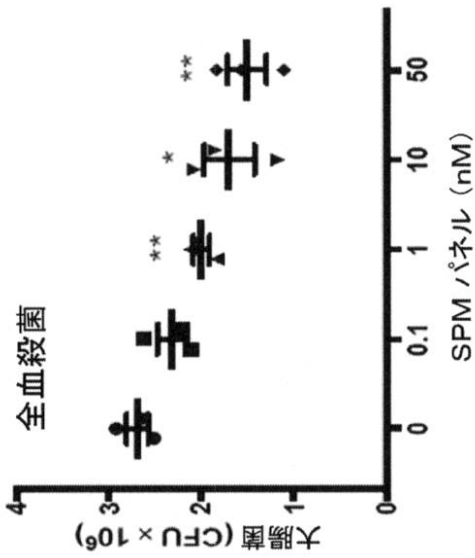
【 図 2 D 】



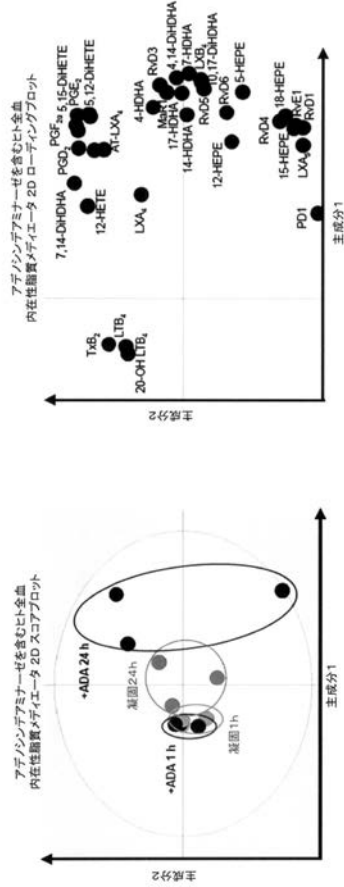
【 図 2 E 】



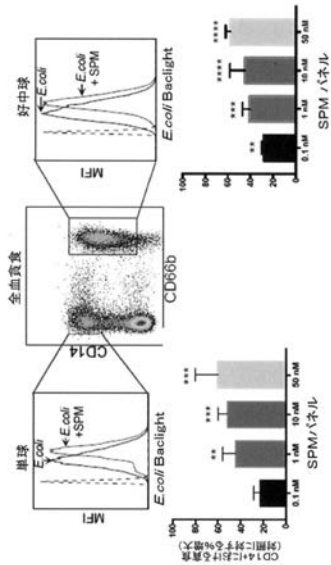
【 図 3 A 】



【 図 2 F 】

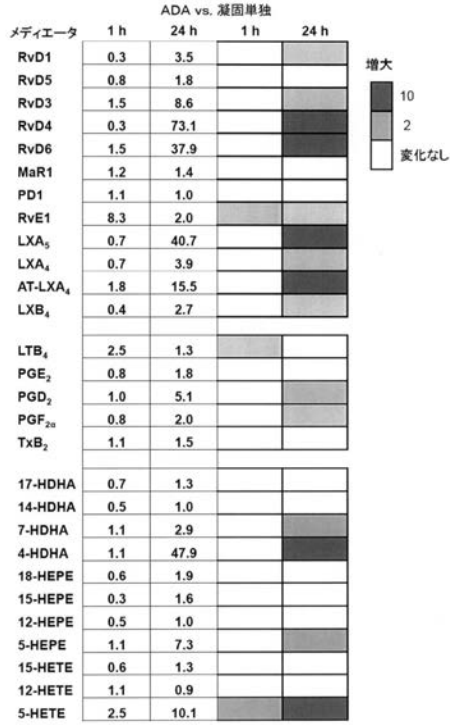


【 図 3 B 】

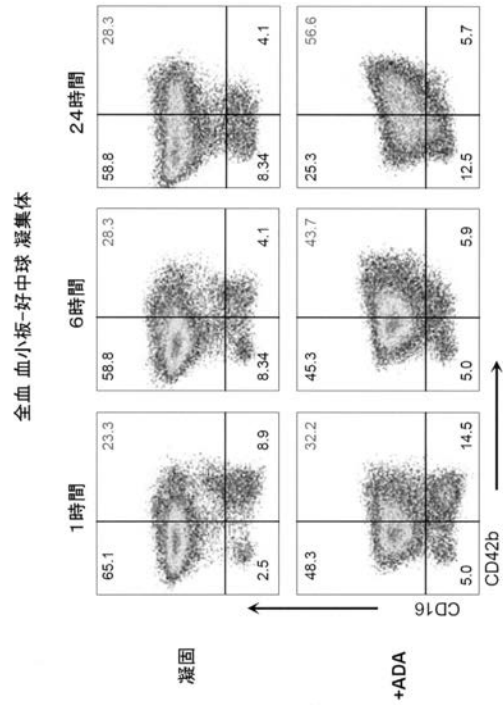




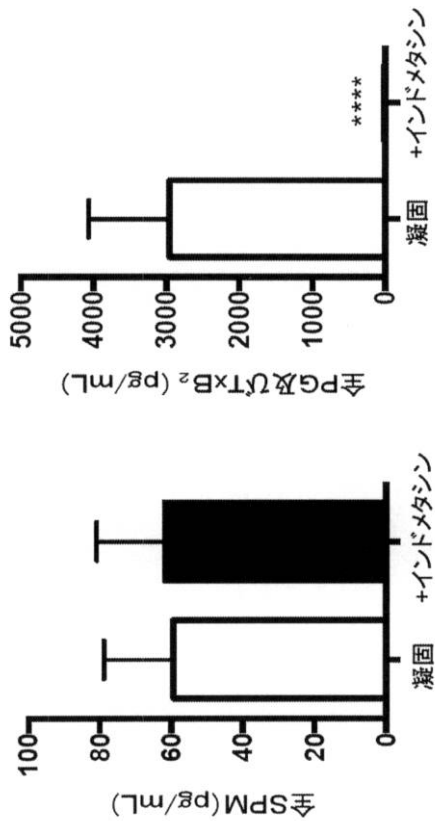
【図 7 A】



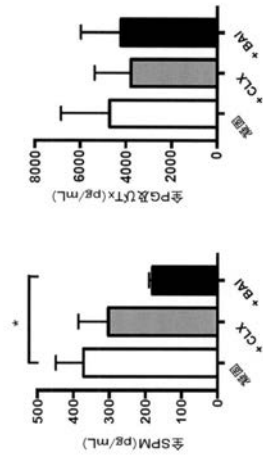
【図 7 B】



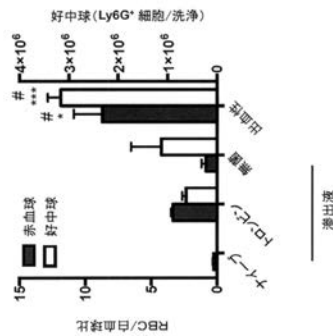
【図 8 A】



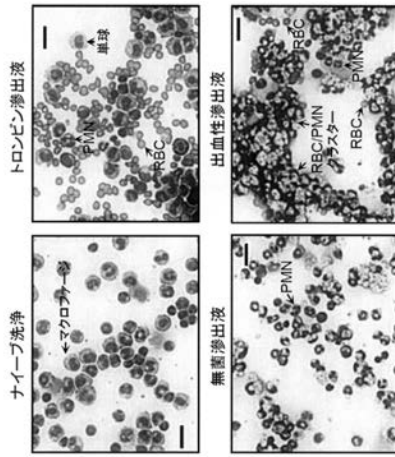
【図 8 B】



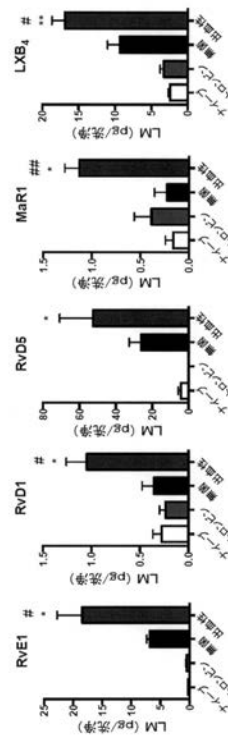
【図 9 A】



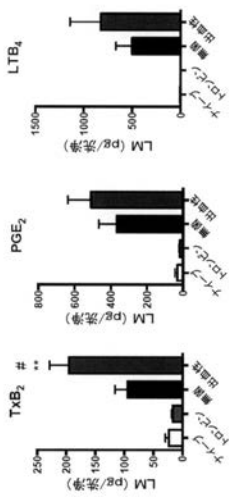
【 図 9 B 】



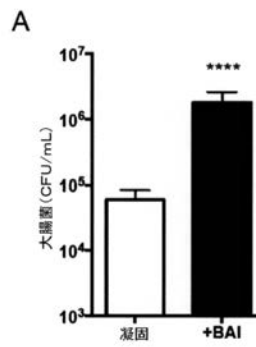
【 図 9 C 】



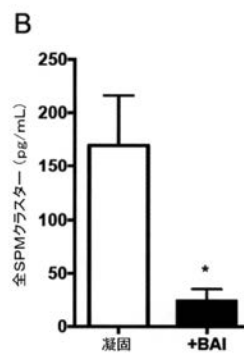
【 図 9 D 】



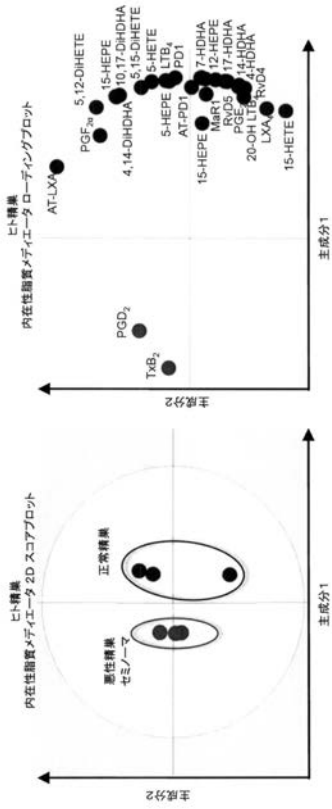
【 図 10 A 】



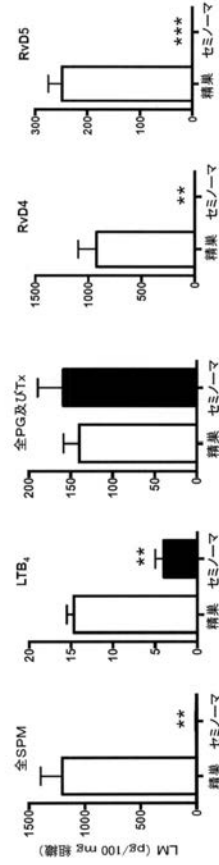
【 図 10 B 】



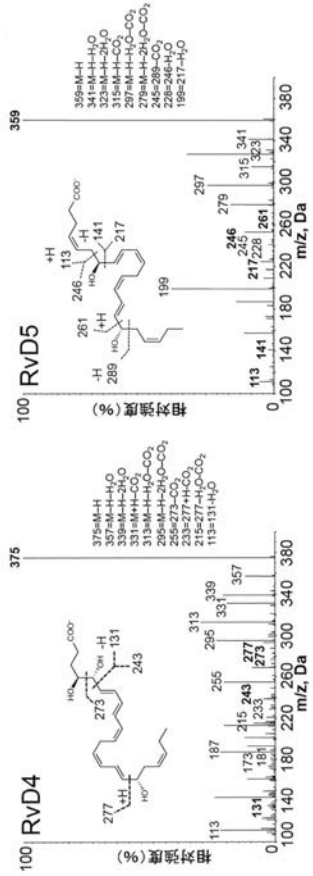
【 図 1 1 A 】



【 図 1 1 B 】



【 図 1 1 C 】



## 【 国際調査報告 】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT  |  | International application No.<br>PCT/US 17/62966   |
|--|--|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(8) - A61P 29/00, A61B 5/00, G01N 33/50 (2018.01)<br>CPC - C07D 303/00, G01N 2800/00, C07C 57/00, C07C 59/00, A61M 2230/20  |  |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |  |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>See Search History Document   |  |  |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>See Search History Document   |  |  |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>See Search History Document  |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |  |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.  |
| X<br>---   | US 2016/0115112 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL INC) 28 April 2016 (28.04.2016) Abstract; para [0006-0007]; para [0126]; para [0130-0132]; para [0200]; para [0331]; para [0333]; para [0336-0338]; para [0345]; para [0354]; para [0366]; para [0370]; para [0373] | 20-24, 29, 37<br>-----<br>1-18, 25-28, 30-36   |
| Y  | US 2005/0026296 A1 (BAENKLER et al.,) 3 February 2005 (03.02.2005) Abstract; Claim 9; para [0052]; para [0065]; para [0115]; para [0119]; para [0121]; para [0141]; para [0160];   | 1-18   |
| Y  | US 2003/0032827 A1 (SERHAN) 13 February 2003 (13.02.2003) para [0003-0004]; para [0009]; para [0018]; para [0578]  | 6-9, 12, 25-28, 31   |
| Y  | WO 2016/057700 A1 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL INC) 14 April 2016 (14.04.2016) p1, ln 27-p2, ln 1; p48, ln 5-10; p62, ln 2-3;   | 8, 11-12, 27-36  |
| Y  | US 2008/0254146 A1 (HUEY et al.,) 16 October 2008 (16.10.2008) Abstract  | 5  |
| Y  | KRUMP et al., Suppression of leukotriene B4 biosynthesis by endogenous adenosine in ligand-activated human neutrophils. J. Exp. Med. 20 October 1997, Volume 186, Number 8, pp 1401-1406. Abstract   | 13-17, 32-36   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |  |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>"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)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"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<br>"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<br>"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<br>"G" document member of the same patent family |  |  |
| Date of the actual completion of the international search<br>5 February 2018   |  | Date of mailing of the international search report<br><b>16 FEB 2018</b>                       |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents<br>P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450<br>Facsimile No. 571-273-8300  |  | Authorized officer:<br>Lee W. Young<br><br>PCT Helpdesk: 571-272-4900<br>PCT OSP: 571-272-7774 |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US 17/62966

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|---|--|-----------------------|
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                 | Relevant to claim No. |
| Y   | WO 2014/039984 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 13 March 2014 (13.03.2014) Claim 23; p10, ln 29-30 | 17, 36                |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/62966

**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:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  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:
  
3.  Claims Nos.: 19, 38  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**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:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  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.:
  
4.  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.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- 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.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(72)発明者 セルハン チャールズ エヌ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02492 ニーダム スミス ストリート 23

(72)発明者 チアン ナン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン フランシス ストリート 75

ザ プリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド

(72)発明者 ノリス ポール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02115 ボストン フランシス ストリート 75

ザ プリガム アンド ウィメンズ ホスピタル インコーポレイテッド

Fターム(参考) 2G041 CA01 EA04 FA10 GA09 HA01 LA08

2G045 AA02 AA10 AA13 AA16 AA22 AA25 AA26 AA28 BA13 BA14

BB03 BB10 BB20 BB24 CA02 CA11 CA15 CA20 CA24 CA25

CA26 CB01 CB02 CB03 CB04 CB07 CB21 DA36 DA37 DA60

DA80 FA16 FA34 FA37 FB03 FB06 FB12 GC15 JA01

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ70 QR10 QS28 QS33 QS39 QX01

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 特定炎症聚焦介质的个体代谢组学分析   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2020513546A</a>   | 公开(公告)日 | 2020-05-14 |
| 申请号            | JP2019527341  | 申请日     | 2017-11-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 激光ブリガムアンドウィメンズホスピタルインコーポレイテッド<br>布赖汉姆妇女医院   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 在布莱根妇女医院公司  |         |            |
| [标]发明人         | セルハンチャールズエヌ<br>チアンナン<br>ノリスポール  |         |            |
| 发明人            | セルハン チャールズ エヌ.<br>チアン ナン<br>ノリス ポール   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/92 G01N33/53 G01N33/86 G01N27/62 C12Q1/34  |         |            |
| CPC分类号         | A61B5/00 A61P29/00 G01N33/86 G01N33/92 A61B5/150755 G01N30/7233 G01N33/96 G01N2030/027  |         |            |
| FI分类号          | G01N33/92.Z G01N33/53.N G01N33/86 G01N27/62.V C12Q1/34  |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G041/CA01 2G041/EA04 2G041/FA10 2G041/GA09 2G041/HA01 2G041/LA08 2G045/AA02 2G045/AA10 2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA22 2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/AA28 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB03 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045/CA02 2G045/CA11 2G045/CA15 2G045/CA20 2G045/CA24 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045/DA60 2G045/DA80 2G045/FA16 2G045/FA34 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB06 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ70 4B063/QR10 4B063/QS28 4B063/QS33 4B063/QS39 4B063/QX01 |         |            |
| 代理人(译)         | 津田俊明<br>福田 康弘   |         |            |
| 优先权            | 62/425367 2016-11-22 US   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

本文公开了一种在血凝后先天宿主防御反应的进程中提供代谢血脂组学特征和SPM签名的方法。该方法可以包括在患者的血液样本中进行一项或多项测量的步骤，其中该样本是在血栓形成和促炎性介质（类花生酸）的凝固或凝结的时间过程中获得的。以及专业的专业解决调解员SPM。从这些测量结果中，可以获得个性化的代谢脂质谱。通过将测量结果与正常或参考血液的测量结果进行比较，可以得出比较结果。轮廓比较轮廓然后可以用于做出医学或治疗决定。

Fig. 1 (CONTINUED)

