

(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2019-516086

(P2019-516086A)

(43) 公表日 令和1年6月13日(2019.6.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Z NAM	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50 (2006.01)	GO 1 N 33/50 Z	4 BO 6 3
GO 1 N 33/15 (2006.01)	GO 1 N 33/15 Z	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2018-551248 (P2018-551248)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月29日 (2017. 3. 29)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年10月16日 (2018.10.16)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/057469  
 (87) 国際公開番号 W02017/174421  
 (87) 国際公開日 平成29年10月12日 (2017.10.12)  
 (31) 優先権主張番号 16305403.4  
 (32) 優先日 平成28年4月6日 (2016.4.6)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 515010235  
 ユニヴェルシテ ド ボルドー  
 UNIVERSITE DE BORDE  
 AUX  
 フランス、エフー33000 ボルドー、  
 プラス ペ ベルラン、35  
 35, Place Pey Berla  
 nd, F-33000 Bordeau  
 x, France

(71) 出願人 506316557  
 サントル ナショナル ドゥ ラ ルシェ  
 ルシュ シアンティフィック  
 フランス国 75794 パリ セデック  
 ス 16、リュ ミシェル - アンジュ  
 、3

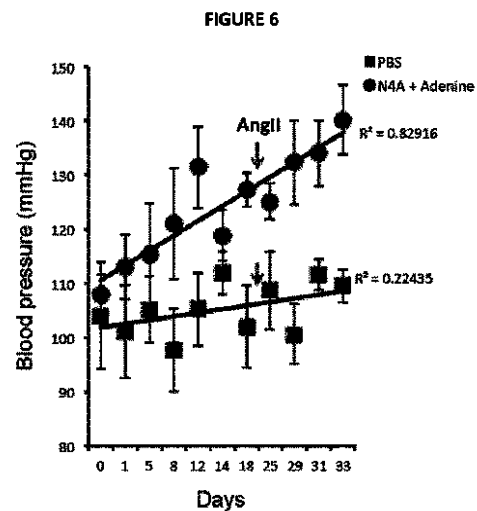
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症関連疾患の診断のためのバイオマーカー

(57) 【要約】

本発明は炎症関連疾患の診断のためのバイオマーカーに関する。

【選択図】 図 6



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

疾患が炎症関連疾患である、疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンおよびアデニンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の使用。

## 【請求項 2】

疾患がインフラマソーム関連疾患である、請求項1に記載の使用。

## 【請求項 3】

疾患が慢性炎症、好ましくは低悪性慢性炎症、または心血管疾患、好ましくは高血圧症である、請求項1か2のいずれか1項に記載の使用。

10

## 【請求項 4】

疾患が慢性炎症により誘導された心血管疾患である、請求項1か2のいずれか1項に記載の使用。

## 【請求項 5】

被験者が少なくとも60歳である、請求項1～4のいずれか1項に記載の使用。

## 【請求項 6】

試料が血液、血清、血漿、尿であり、好ましくは血清である、請求項1～5のいずれか1項に記載の使用。

## 【請求項 7】

少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が免疫アッセイ、アプタマーに基づくアッセイ、質量分析に基づくアッセイから成る群から選択されるアッセイを用いて測定される、請求項1～6のいずれか1項に記載の使用。

20

## 【請求項 8】

疾患が炎症関連疾患であり、方法がアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度測定のステップを含み、被験者から得た試料中での被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法。

## 【請求項 9】

疾患がインフラマソーム関連疾患である、請求項8に記載の方法。

## 【請求項 10】

疾患が慢性炎症、好ましくは低悪性慢性炎症、または心血管疾患、好ましくは高血圧症である、請求項8か9のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 11】

疾患が慢性炎症により誘導された心血管疾患である、請求項8か9のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

被験者が少なくとも60歳である、請求項8～11のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 13】

化合物が疾患の治療に有効であるかを測定するスクリーニング方法であって、かかる方法は：

- N4 アセチルシチジンおよびアデニンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物を産生する細胞により、インビトロでの化合物をインキュベートするステップ、および、

40

- 少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の産生における、かかる化合物による減少の程度を測定するステップ  
を包含する、前記方法。

## 【請求項 14】

疾患治療中の被験者における治療有効性のモニターリング方法であって、疾患が炎症関連疾患であり、かかる方法は：

- 時間をかけて被験者から得た試料中の、アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度測定、および

50

- 少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度の進展測定

を包含し、それによって：

時間をかけて少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が低下している場合は、かかる治療は有効であり、および

時間をかけて少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が安定的か、または増加している場合は、かかる治療は効果が無い

前記方法。

【請求項15】

試料中の疾患を診断するキットであって、疾患が炎症関連疾患であり、かかるキットは

：  
アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレ

オチド由来代謝物の検出を可能にする1つ以上の試薬

を包含する、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は炎症関連疾患の診断の為のバイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

炎症、特に低悪性慢性炎症は心血管状態を含めた加齢による多くの疾患の特徴であるが、そのメカニズムは不明のままである (Howcroft et al., The role of inflammation in age-related disease. *Aging* 5, 84-93, 2013; Okin et al., Evolution of inflammatory diseases. *Current biology: CB* 22, R733-740, 2012; Scrivo et al., Inflammation as "common soil" of the multifactorial diseases. *Autoimmunity reviews* 10, 369-374, 2011)。

【0003】

インフラマソームは炎症の重要な決定因子である。NOD様受容体 (NLRs) または「アプセント・イン・メラノマ2」 (AIM2) 蛋白質からなる、これらの構造は病原体または細胞ストレスの産生する特異的なサイトゾル決定因子を認識して、カスパーゼ1依存的な成熟と、インターロイキン 1ファミリーのサイトカイン (IL1FC) の分泌を誘発する (Martinon et al., The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular cell* 10, 417-426, 2002)。

IL1FCは一部の高齢者に高レベルで見出される強力な炎症性サイトカインを含んでおり (Furman et al., Apoptosis and other immune biomarkers predict influenza vaccine responsiveness. *Molecular systems biology* 9, 659, 2013)、心血管疾患 (Düwell et al., NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 464, 1357-1361, 2010)、癌 (Zitvogel et al., Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nature immunology* 13, 343-351, 2012)、機能低下 (Youm et al., Canonical Nlrp3 inflammasome links systemic low-grade inflammation to functional decline in aging. *Cell metabolism* 18, 519-532, 2013)、その他の変性疾患 (Sardi et al., Alzheimer's disease, autoimmunity and inflammation. The good, the bad and the ugly. *Autoimmunity reviews* 11, 149-153, 2011) などとのリスク増加と直接的に結合していることが示されている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

老齢化ラットの近年の試験ではインフラマソームの活性化と関連した複数分子の発現レベルは、IL1FCのレベルのように有意に上昇した (Song et al., The expression changes of inflammasomes in the aging rat kidneys. *The journals of gerontology. Series*

10

20

30

40

50

A, Biological sciences and medical sciences, 2015)。

しかしインフラマソームがヒトの加齢において活性化されているか、またこのような変化が臨床的に関連するかは知られていない。

このことから炎症関連疾患のリスクのある患者の同定に有用なバイオマーカーが必要である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

この観点から本発明の目的は炎症関連疾患の診断に有用なバイオマーカーの提供である。

本発明の別の目的は炎症関連疾患の診断方法の提供である。

本発明の別の目的は治療用の化合物の有効性の測定のためのスクリーニング法の提供である。

本発明の別の目的は炎症関連疾患がある治療中の被験者において、治療有効性のモニタリング方法の提供である。

更に別の目的は炎症関連疾患の診断キットの提供である。

【発明の効果】

【0006】

本発明は炎症関連疾患の診断に有用なバイオマーカーとして少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の使用に関する。

本発明は疾患が炎症関連疾患であり、疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の使用に関する。

【発明を実施するための形態】

【0007】

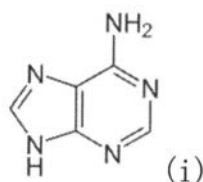
本発明は2種類の循環ヌクレオチド由来代謝物、つまりアデニンおよびN4 アセチルシチジンがNLRC4インフラマソーム (N4 アセチルシチジンはNLRC4蛋白質の発現を誘導し、またアデニンはNLRC4インフラマソームを活性化する) を刺激して活性化することで、結果的にインターロイキンIL-1、IL-18の産生を誘導してin vivoでのマウスの血小板の活性化と血圧の上昇が引き起こされるという、発明者らが行った予期外の観察に基づいている。

【0008】

本発明において用語「はプリンまたはピリミジン、それぞれから由来の窒素塩基の2種類の群という意味である。これらの窒素塩基はリボース (リボヌクレオシド) またはデオキシリボース (デオキシリボヌクレオシド) に結合しても結合しなくても良い。

とりわけアデニンは下記の式 (i) で表されるプリン誘導体である：

【化1】



とりわけN4 アセチルシチジンは下記の式 (ii) で表されるリボースに結合しているピリミジン誘導体である：

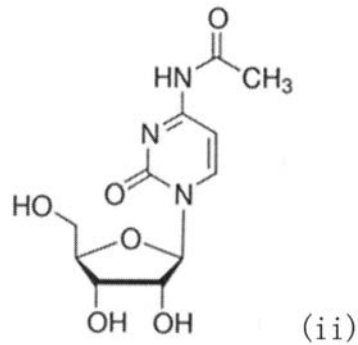
10

20

30

40

## 【化2】



10

## 【0009】

本発明において用語「炎症関連疾患」とは炎症反応から直接的または間接的に生じる疾患という意味である。かかる疾患は必ずしも炎症疾患であるわけではないが、この疾患は疾患プロセスに有意に寄与する炎症成分を有すると認められる。

## 【0010】

1つの実施形態において本発明は、かかる疾患がインフラマソーム関連疾患である上に定義した使用に関する。

本発明において用語「インフラマソーム」とはNLRP3、NLRC4、AIM2、NLRP6を含む、いくつかの蛋白質の周りに構築された蛋白質複合体という意味である。微生物、ストレス、損傷などの多様なシグナルに応答して、この蛋白質複合体はカスパーゼ-1を活性化し、引き続き炎症促進性サイトカインの分泌および細胞死を誘導する。

20

本発明において用語「インフラマソーム関連疾患」とは、インフラマソームが疾患の発症と進展に重要な役割を果たす炎症関連疾患の一群という意味である。

インフラマソームにより誘導されるIL-1 とIL-18は数多くの主要炎症性サイトカイン (TNF、IL-6、...) の産生を誘導するので、炎症反応の刺激と、炎症に関与する種々の細胞型 (マクロファージ、血小板、好中球など) の活性化に重要な役割を果たしている。

インフラマソーム関連疾患としてはこれらに限定されないが慢性炎症、代謝異常に関連する炎症 (肥満、2型糖尿病、アテローム性動脈硬化)、心血管疾患 (高血圧症、血管疾患 / 血管収縮)、変性疾患 (アルツハイマー病、パーキンソン病) が挙げられる。

30

## 【0011】

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症、好ましくは低悪性慢性炎症、または心血管疾患、好ましくは高血圧症である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が代謝異常に関連する炎症である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が変性疾患である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症により誘導された心血管疾患である、上に定義した使用に関する。

## 【0012】

本発明において用語「慢性炎症」とは新たな結合組織形成を主に特徴とする、遅延性かつ持続性 (数日間、数週間、または数か月間) の炎症という意味である。これは急性型または遅延性低悪性型の継続であり得る。

40

本発明において用語「低悪性慢性炎症」とは、炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- またはIFN- など) および急性期蛋白質 (C反応性蛋白質 (CRP) など) の血漿濃度における遅延的かつ持続的な2~3倍増加で特徴付けられる。

本発明において用語「心血管疾患」とは、心臓と血管の機能障害を特徴とする異常という意味である。これらに限定されないが高血圧症、動脈硬化、脳卒中が挙げられる。

## 【0013】

1つの実施形態において本発明は疾患が高血圧症である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が動脈硬化である、上に定義した使用に関する。

50

1つの実施形態において本発明は疾患が脳卒中である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が低悪性慢性炎症および/または高血圧症である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がアデニンである、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がN4 アセチルシチジンである、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がアデニンおよびN4 アセチルシチジンである、上に定義した使用に関する。

【0014】

本発明者が示すようにN4 アセチルシチジンおよびアデニンとの両者の存在は、インフラマソームの活性化とIL1FCの分泌を行う信号を供給する。このことから好ましくは、これら2つの代謝物は炎症関連疾患の診断において組み合わせて使用される。

好ましい実施形態において本発明は被験者がヒトである、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明はかかるヒトが少なくとも60歳である、上に定義した使用に関する。

好ましい実施形態において被験者は好ましくは60、65、70、75、80、85、90、95、100歳以上の高齢者である。

【0015】

1つの実施形態において本発明は試料が血液、血清、血漿、尿であり、好ましくは血清である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が免疫アッセイ、アプタマーに基づくアッセイ、質量分析に基づくアッセイから成る群から選択されるアッセイを用いて測定される、上に定義した使用に関する。

【0016】

1つの実施形態において本発明は慢性炎症についての、特に低悪性慢性炎症についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患についての、特に高血圧症、脳卒中、動脈硬化から成る群から選択される心血管疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は代謝異常に関連する炎症についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は変性疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンの使用に関する。

【0017】

1つの実施形態において本発明は慢性炎症についての、特に低悪性慢性炎症についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患についての、特に高血圧症、脳卒中、動脈硬化から成る群から選択される心血管疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は代謝異常に関連する炎症についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は変性疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は慢性炎症についての、特に低悪性慢性炎症についてのインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンおよびN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患についての、特に高血圧症、脳卒中、動脈

10

20

30

40

50

硬化から成る群から選択される心血管疾患についてのインビトロ/エキスビボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンおよびN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は代謝異常に関連する炎症についてのインビトロ/エキスビボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンとN4 アセチルシチジンの使用に関する。

1つの実施形態において本発明は変性疾患についてのインビトロ/エキスビボ診断における、被験者から得た試料中のアデニンとN4 アセチルシチジンの使用に関する。

【0018】

他の態様において本発明は疾患が炎症関連疾患であり、方法がアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度測定ステップを含み、被験者から得た試料中での被験者の疾患についてのインビトロ/エキスビボ診断方法に関する。

他の態様において本発明はまた、疾患がインフラマソーム関連疾患である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症、好ましくは低悪性慢性炎症、または心血管疾患、好ましくは高血圧症である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が代謝異常に関連する炎症である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が変性疾患である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症により誘導された心血管疾患である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が高血圧症である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が動脈硬化である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が脳卒中である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は疾患が低悪性慢性炎症および/または高血圧症である、上に定義した方法に関する。

【0019】

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がアデニンである、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がN4 アセチルシチジンである、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物がアデニンおよびN4 アセチルシチジンである、上に定義した方法に関する。

【0020】

1つの実施形態において本発明は被験者がヒトである、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明はヒトが少なくとも60歳である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は試料が血液、血清、血漿、尿であり、好ましくは血清である、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が免疫アッセイ、アプタマーに基づくアッセイ、質量分析に基づくアッセイから成る群から選択されるアッセイを用いて測定される、上に定義した方法に関する。

【0021】

1つの実施形態において本発明は疾患の診断をされる被験者から得た試料中の少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度を基準値と比較するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は被験者から得た試料中の少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が、かかる疾患を示す少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の最低濃度と、好ましくは疾患を有する被験者から得た試料中の少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の平均濃度に対応した最低濃度と比べて有意に同等かそれ以上であるのかを

10

20

30

40

50

測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は被験者から得た試料中の少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が、健康な状態を示す少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の最大濃度と、好ましくは健康な被験者から、または炎症関連疾患の無い被験者から得た試料中の少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の平均濃度に対応した最大濃度と比べて有意に大きいのかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

【0022】

1つの実施形態において本発明は被験者から得た血清試料中のN4 アセチルシチジンの濃度が200nMより大きい、好ましくは250nMより大きい、より好ましくは300nMより大きいのかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

10

1つの実施形態において本発明は被験者から得た血清試料中のアデニンが100nMより大きい、好ましくは150nMより大きい、より好ましくは200nMより大きいのかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

発明において、被験者の血清中での200nMより大きいN4 アセチルシチジン濃度および/または被験者の血清中での100nMより大きいアデニン濃度は炎症関連疾患のリスク、特にインフラマソーム関連疾患のリスク、より詳しくは慢性炎症または高血圧症のリスクを示す。

【0023】

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症、好ましくは低悪性慢性炎症から選択される被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンの濃度を測定するステップを含む。

20

1つの実施形態において本発明は疾患が心血管疾患であり、好ましくは高血圧症、脳卒中、動脈硬化から成る群から選択される被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンの濃度を測定するステップを含む。

【0024】

1つの実施形態において本発明は疾患が代謝異常に関連する炎症である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が変性疾患である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンの濃度を測定するステップを含む。

30

【0025】

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症であり、好ましくは低悪性慢性炎症である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が心血管疾患であり、好ましくは高血圧症、脳卒中、動脈硬化から成る群から選択される被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

40

1つの実施形態において本発明は疾患が代謝異常に関連する炎症である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が変性疾患である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のN4 アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が慢性炎症であり、好ましくは低悪性慢性炎症である、被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンおよびN4 アセチルシチジンの濃度を測定す

50

るステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が心血管疾患であり、好ましくは高血圧症、脳卒中、動脈硬化から成る群から選択される被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンおよびN4アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が代謝異常に関連する炎症である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンおよびN4アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

1つの実施形態において本発明は疾患が変性疾患である被験者の疾患についてのインビトロ/エクスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のアデニンおよびN4アセチルシチジンの濃度を測定するステップを含む。

10

#### 【0026】

他の態様において本発明はまた、化合物が疾患の治療に有効であるかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- アデニンおよびN4アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物を産生する細胞により、インビトロでの化合物をインキュベートするステップ、および、

- 少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の産生における、かかる化合物による減少の程度を測定するステップ

を包含する。

20

#### 【0027】

1つの実施形態において本発明は化合物がアデニンおよびN4アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の存在下で、インビトロでの細胞でインキュベートする上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる細胞によるIL-1分泌に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる細胞によるIL-18分泌に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

30

#### 【0028】

好ましい実施形態において細胞は単球、マクロファージ、好中球から成る群から選択される。

好ましい実施形態において本発明は疾患が慢性炎症であり、好ましくは低悪性慢性炎症である、上に定義したスクリーニング方法に関する。

好ましい実施形態において本発明は血管疾患、好ましくは高血圧症である、上に定義したスクリーニング方法に関する。

#### 【0029】

他の態様において本発明はまた、化合物が疾患の治療に有効であるかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- 動物に化合物を投与するステップ、および

- 動物の血清中でのアデニンおよびN4アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップ

を包含する。

40

#### 【0030】

1つの実施形態において、本発明は化合物がアデニンおよびN4アセチルシチジンから成る群から選択されるヌクレオチド由来代謝物の存在下で、動物に投与される上に定義したスクリーニング方法に関する。好ましくは、動物はマウス、ラット、ラビットから成る群から選択される。

50

1つの実施形態において、かかる動物はヒトではない。

【0031】

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-1 の濃度に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-18の濃度に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる動物の血圧低下および/または動脈硬化の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

【0032】

他の態様において本発明は化合物が炎症反応を誘導するかどうかを決定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物を産生する細胞により、インビトロでの化合物をインキュベートするステップ、および、

- 少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の産生における、かかる化合物による増加の程度を測定するステップ

を包含する。

とりわけ上に定義したスクリーニング方法はインフラマソームに関連する炎症反応を誘導するかどうかの決定に使用することができる。

【0033】

1つの実施形態において本発明は化合物がアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の存在下で、インビトロでの細胞でインキュベートする、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は細胞によるIL-1 分泌に対する、化合物による増加の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は細胞によるIL-18分泌に対する化合物による増加の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

【0034】

好ましい実施形態において細胞は単球、マクロファージ、好中球から成る群から選択される。

他の態様において本発明は、化合物が炎症反応を誘導するかどうかを決定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- 動物に化合物を投与するステップ、および

- 動物の血清中でのアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度に対する、かかる化合物による増加の程度を測定するステップ

を包含する。

1つの実施形態において本発明は化合物がアデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択されるヌクレオチド由来代謝物の存在下で、動物に投与される、上に定義したスクリーニング方法に関する。

好ましくは、動物はマウス、ラット、ラビットから成る群から選択される。

1つの実施形態において、かかる動物はヒトではない。

【0035】

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-1 の濃度に対する、かかる化合物による増加の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-18の濃度に対する、かかる化合物による増加の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に

10

20

30

40

50

関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる動物の血圧上昇および/または動脈硬化の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

【0036】

他の態様において本発明は疾患治療中の被験者における治療有効性のモニターリング方法に関連するが、疾患が炎症関連疾患であり、かかる方法は：

- 時間をかけて被験者から得た試料中の、アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度測定、および
- 少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度の進展測定

を包含し、それによって：

時間をかけて少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が低下している場合は、かかる治療は有効であり、および

時間をかけて少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が安定的か、または増加している場合は、かかる治療は効果が無い

方法である。

【0037】

1つの実施形態において本発明は少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の濃度が治療前に得られた少なくとも1つの試料と、治療のための一回目の投与後に得られた少なくとも1つの試料において測定される、上に定義した治療有効性のモニターリング方法に関連する。

【0038】

他の態様において本発明は、また試料中の疾患を診断するキットに関連するが、疾患が炎症関連疾患であり、かかるキットは：

アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の検出を可能にする1つ以上の試薬を包含する。

他の態様において本発明は疾患がある治療中の被験者において、治療有効性のモニターリング用キットに関連するが、疾患が炎症関連疾患であり、かかるキットは：

アデニンおよびN4 アセチルシチジンから成る群から選択される少なくとも1つのヌクレオチド由来代謝物の検出を可能にする1つ以上の試薬

を包含する。

1つの実施形態において本発明は1つ以上の試薬が少なくとも1つ以上のヌクレオチド由来代謝物を検出するアダプターを含む、上に定義したキットに関連する。

1つの実施形態において本発明はアデニン検出用のアダプターおよび/またはN4 アセチルシチジン検出用のアダプターを含む、上に定義したキットに関連する。

【0039】

補完的態様において本発明はまた、心血管疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子の使用に関連する。

本発明はNLRC4遺伝子が心血管疾患の被験者において過剰発現されるという、発明者らが行った予想外の観察に基づいている。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中の配列番号1に少なくとも90%の同一性を有する配列を含むか、またはそれよりなる核酸の使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中の配列番号1に少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれよりなる核酸の使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、被験者から得た試料中の配列番号2に少なくとも90%の同一性を有する配列を含むか、またはそれよりなる蛋白質の使用に関する。

1つの実施形態において本発明は心血管疾患のインビトロ/エクスピボ診断における、

10

20

30

40

50

被験者から得た試料中の配列番号2に少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含むか、またはそれよりなる蛋白質の使用に関する。

【 0 0 4 0 】

【表 1 - 1】

<p>配列番号: 1</p>	<p>AGAATGTCATCCTCAAGGAAGTGCAGAGAGATTTCTTCAGTCCTCAGCTGAGTATAAGCTGG  CCTCCTGGAGTCTGTGAACACAAACGTCCAATGTGAGTGTGCCTGTGCAAGCCCCTGGCTGT  TATACTCCGGAGGGTGTCCCGTGCCTCATCGGTGGAGTGGACCAAACTGGTGATCTGTTTG  CCCTGTGTGACCTTGCCAGAACCCTGCTGACTGAGAGAACACATCTGCTGGAAGTCCCTGG  GATTC AAGGTACAGGAAGAACTCGAGGCCCTACTGAAACGAAAGCAAATACAAAGAACTTT  ATTTTAAAAACGTGTCTTGGTCTCCCAAGAAGAGGGCAATTGGATTGCTCAGCCAGAATGAAG  AGTAGTTTTACAGAAAAAGAGGACAATATTGGGATCACCTTTGACCTTTCCATTTGGAAATA  ATATTTTCTATTGTGTATAGAAAGGTGGGAAGCTTTCATCCAGAACAATGAATTTCATAAAG  GACAATAGCCGAGCCCTTATTCAAAGAATGGGAATGACTGTTATAAAGCAAATCACAGATGAC  CTATTTGTATGGAATGTTCTGAATCGCGAAGAAGTAAACATCATTGCTGCGAGAAGGTGGAG  CAGGATGCTGCTAGAGGGATCATTACATGATTTTAAAAAGGGTTCAGAGTCCGTGAACCTC  TTTCTTAAATCCCTTAAGGAGTGGAACTATCCTCTATTTTCAGGACTTGAATGGACAAAGTCTT  TTTCATCAGACATCAGAAGGAGACTTGGACGATTTGGCTCAGGATTTAAAGGACTTGTACCAT  ACCCCATCTTTTCTGAACTTTTATCCCCTTGGTGAAGATATTGACATTATTTTAACTGAAA  AGCACCTTACAGAACCAGTCCGTGGAGGAAGGACCAACCCATCACCGCGTGGAGCAGCTG  ACCCTGAATGGCCTCCTGCAGGCTCTCAGAGCCCCTGCATCATTGAAGGGGAATCTGGCAAA  GGCAAGTCCACTCTGCTGCAGCGCATTGCCATGCTCTGGGGTCCGGAAAGTGAAGGCTCTG  ACCAAGTTCAAATTCGTCTTCTTCCCGTCTCAGCAGGGCCAGGGTGGACTTTTTGAAACC  CTCTGTGATCAACTCCTGGATATACCTGGCACAATCAGGAAGCAGACATTCATGGCCATGCTG  CTGAAGCTGCGGCAGAGGGTTCTTTTCTTCTTGATGGCTACAATGAATTAAGCCCAGAAC  TGCCAGAAATCGAAGCCCTGATAAAGGAAAACCACCGCTCAAGAACATGGTCATCGTCACC  ACTACCCTGAGTGCCTGAGGCACATACGGCAGTTTGGTGCCCTGACTGCTGAGGTGGGGGAT  ATGACAGAAGACAGCGCCAGGCTCTCATCCGAGAAGTGTGATCAAGGAGCTTGTGAAGGC  TTGTTGCTCCAAATTCAGAAATCCAGGTGCTTGAAGAAATCTCATGAAGACCCCTCTTTGTG  GTCATCACTTGTGCAATCCAGATGGGTGAAAGTGAGTCCACTCTCACACACAAACAACGCTG  TTCCATACCTTCTATGATCTGTTGATACAGAAAAACAAACACAAACATAAAGGTGTTGGCTGCA  AGTGACTTCATTCGGAGCCTGGACCACTGTGGAGACCTAGCTCTGGAGGGTGTGTTCTCCAC  AAGTTTGATTTGAACTGCAGGATGTGTCCAGCGTGAATGAGGATGCCCTGCTGACAACTGGG  CTCCTCTGTAATAATACAGCTCAAAGTTCAAGCCAAAGTATAAATTCTTTCACAAGTCATTC  CAGGAGTACACAGCAGGACGAAGACTCAGCAGTTTATTGACGTCTCATGAGCCAGAGGAGGTG  ACCAAGGGGAATGGTACTTGCAGAAAATGGTTTCCATTCGGACATTACATCCACTTATAGC  AGCCTGCTCCGTACACCTGTGGGTCTCTGTGGAAGCCACCAGGGCTGTTATGAAGCACCTC  GCAGCAGTGTATCAACACGGCTGCCTTCTCGGACTTCCATCGCCAAGAGGCCTCTCTGGAGA  CAGGAATCTTTGCAAAGTGTGAAAAACCACTGAGCAAGAAATTCTGAAAGCCATAAACATC  AATTCCTTTGTAGAGTGTGGCATCCATTTATATCAAGAGAGTACATCCAAATCAGCCCTGAGC  CAAGAATTTGAAGCTTTCTTTCAAGGTAAGGCTTATATATCAACTCAGGGAACATCCCGAT  TACTTATTTGACTTCTTTGAACATTTGCCAATTGTGCAAGTGCCCTGGACTTCATTAAGCTG  GACTTTTATGGGGAGCTATGGCTTCATGGGAAAAGGCTGCAGAAGACACAGGTGGAATCCAC  ATGGAAGAGGCCCCAGAAACCTACATTCAGCAGGGCTGTATCTTTGTTCTCAACTGGAAG  CAGGAATTCAGGACTCTGGAGGTCACACTCCGGATTCAGCAAGTTGAATAAGCAAGATATC  AGATATCTGGGGAAAATATTCAGCTCTGCCACAAGCCTCAGGCTGCAAATAAAGAGATGTGCT  GGTGTGGCTGGAAGCCTCAGTTTGGTCTCAGCACCTGTAAGAACATTTATTCTCTCATGGTG  GAAGCCAGTCCCCTCACCATAGAAGATGAGAGGCACATCATCTGTAACAAACCTGAAAACC  TTGAGTATTCATGACCTACAGAATCAACGGCTGCCGGTGGTCTGACTGACAGCTGGGTAAC  TTGAAGAACCCTTACAAAGCTCATAATGGATAACATAAAGATGAATGAAGAAGATGCTATAAAA  CTAGCTGAAGCCTGAAAACCTGAAGAAGATGTGTTATTTCAATTTGACCCACTGTCTGAC  ATTGGAGAGGGAATGGATTACATAGTCAAGTCTCTGTCAAGTGAACCCTGTGACCTTGAAGAA</p>
----------------	--

10

20

30

40

【表 1 - 2】

	<p>ATTCAATTAGTCTCCTGCTGCTTGTCTGCAAATGCAGTGAAAATCCTAGCTCAGAATCTTCAC  AATTTGGTCAAACGAGCATTCTTGATTTATCAGAAAATTACCTGGAAAAAGATGGAAATGAA  GCTCTTCATGAACTGATCGACAGGATGAACGTGCTAGAACAGCTCACCAGCTGATGCTGCCC  TGGGGCTGTGACGTGCAAGGCAGCCTGAGCAGCCTGTTGAAACATTTGGAGGAGGTCCCACAA  CTCGTCAAGCTTGGGTTGAAAACTGGAGACTCACAGATACAGAGATTAGAATTTTAGGTGCA  TTTTTTGGAAAGAACCCTCTGAAAACTTCCAGCAGTTGAATTTGGCGGGAAATCGTGTGAGC  AGTGATGGATGGCTTGCCTTCATGGGTGATTTGAGAATCTTAAGCAATTAGTGTTTTTTGAC  TTTAGTACTAAAGAATTTCTACCTGATCCAGCATTAGTCAGAAAATTTAGCCAAGTGTATCC  AAGTTAACTTTTCTGCAAGAAGCTAGGCTTGTGGGTGGCAATTTGATGATGATGATCTCAGT  GTTATTACAGGTGCTTTTAACTAGTAACTGCTTAAATAAAGTGTACTCGAAG</p>
<p>配列番号: 2</p>	<p>MNFIKDNSRALIQRMGMTVIKQITDDLFWVNVNLRREEVNIICCEKVEQDAARGI IHMILKKG  ESCNLFLKSLKEWNYPLFQDLNGQSLFHQTSEGLDDLAQDLKDYHTPSFLNFYPLGEDIDI  IFNLKSTFTEPVLWRKQHHHRVEQLTLNGLLQALQSPCIEGESGK GKSTLLQRIAMLWGS  KCKALTKFKFVFLRLSRAQGGLFETLCDQLLDIPGTIRKQTFMAMLLKLRQVFLLDGYNE  FKPQNCPEIEALIKENHRFKNMVIVTTTTTECLRHIRQFGALTAEVGDMTEDSAQALIREVLIK  ELAEGLLLQIQKSRLRNLMTPLFVVITCAIQMGESEFHSHTQTTLFHTFYDLLIQKNKHKH  KGVAASDFIRSLDHCGLALEGVFVSHKDFELQDVSSVNE DALLTGLLCKYTAQRFKPKYKF  FHKSFEYTAGRRLSLLTSHEPEEVTKGNVYLQKMSISDITSTYSSLLRYTCGSSVEATRA  VMKHLA AVYQHGC LLGLSIAKRPLWRQESLQSVKNTTEQEILKAININSFVECGIHLYQESTS  KSALSQEFEAFFQGSLSYINSGNIPDYLDFDFEHLPCASALDFIKLDFYGGAMASWEKAAED  TGGIHMEEAPETYIPSRVSLFFNWKQEFRTLEVTLRDFS KLNKQDIRYLGKIFSSATSLRLQ  IKRCAGVAGSLSLVLSTCKNIYSLMVEASPLTIEDERHITSVTNLKTL SIHDLQNQRLPGGLT  DSLGNLKNLTKLIMDNIKMNEEDA I KLAEGLKNLKKMCLFHLTHLSDIGEGMDYIVKSLSSEP  CDLEEIQLVSCCLSANAVKILAQNLHNLVKLSILDSENYLEKDGNEALHELIDRMNVLEQLT  ALMLPWGCDVQGSLSLLKHLEEVQVLVGLKNWRLTDTEIRILGAFFGKNPLKNFQQLNLA  GNRVSSDGWLA FMGVFENLQLVFFDFSTKEFLPDPALVRKLSQVLSKLTFLQEARLVGWQFD  DDDL SVITGAFKLVTA</p>

10

20

30

表 1 NLRC4 遺伝子の核酸配列 (Acc. No. AF376061.1) および、かかる遺伝子によりコードされた蛋白質のアミノ酸配列

【0041】

1つの実施形態において本発明は心血管疾患が高血圧症および/または動脈硬化である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は被験者がヒトである、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明はヒトが少なくとも60歳である、上に定義した使用に関する。

好ましい実施形態において被験者は、好ましくは60、65、70、75、80、85、90、95、100歳以上の高齢者である。

40

【0042】

1つの実施形態において本発明は試料が血液、血清、血漿、尿またはPBMC(末梢血単核細胞)である、好ましくは血清である、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明はRT-PCR、マイクロアレイ、またはノーザンブロットから成る群から選択されるアッセイを使用してNLRC4遺伝子発現がそのmRNAの濃度測定で決定される、上に定義した使用に関する。

1つの実施形態において本発明は免疫ブロットまたはELISAなどの免疫アッセイを使用してNLRC4遺伝子発現がその蛋白質の濃度測定で決定される、上に定義した使用に関する。

。

【0043】

50

他の態様において本発明は被験者の心血管疾患についてのインビトロ/エキスピボ診断方法に関するものであり、かかる方法は被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子発現測定のステップを含む。

1つの実施形態において本発明は被験者から得た試料中のNLEC4遺伝子発現が心血管疾患を示すNLRC4遺伝子の最低発現と、好ましくは疾患を有する被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子の平均濃度に対応した最低濃度と比べて有意に同等かそれ以上であるのかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は被験者から得た試料中のNLEC4遺伝子発現が健康な状態を示すNLRC4遺伝子の最大発現と、好ましくは健康な被験者または炎症関連疾患でない被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子の平均発現に対応した最大発現と比べて有意に大きいかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子発現が被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子発現が健康な被験者または炎症関連疾患でない被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子の平均発現に比べて少なくとも1.5倍高いかを測定するステップを更に含む、上に定義した方法に関する。

#### 【0044】

本発明においてNLRC4遺伝子発現の1.5倍増加は心血管疾患のリスク、特に高血圧症を示す。

他の態様において本発明はまた化合物が心血管疾患の、好ましくは高血圧症の治療に有効であるかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- NLRC4遺伝子を発現する細胞とインビトロでの化合物をインキュベートするステップ、および、
- NLRC4遺伝子発現に対する化合物による減少の程度を測定するステップ

を包含する。

#### 【0045】

1つの実施形態において本発明は、かかる細胞によるIL-1 分泌に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる細胞によるIL-18分泌に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

好ましい実施形態において細胞は単球、マクロファージ、好中球から成る群から選択される。

#### 【0046】

他の態様において本発明はまた化合物が心血管疾患の、好ましくは高血圧症の治療に有効であるかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- 動物に化合物を投与するステップ、および
- かかる動物の血中細胞（少なくとも単球）におけるNLRC4遺伝子発現に対する、化合物による減少の程度を測定するステップ

を包含する。

好ましくは、動物はマウス、ラット、ラビットから成る群から選択される。

1つの実施形態において、かかる動物はヒトではない。

#### 【0047】

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-1 の濃度に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は動物の血清中でのIL-18の濃度に対する、かかる化合物による減少の程度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

1つの実施形態において本発明は、かかる動物の血圧低下および/または動脈硬化の程

10

20

30

40

50

度を測定するステップを更に含む、上に定義したスクリーニング方法に関する。

他の態様において本発明は化合物が高血圧症を誘導するかどうかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- NLRC4遺伝子を発現する細胞とインピトロでの化合物をインキュベートするステップ、および、

- NLRC4遺伝子発現に対する、かかる化合物による増加の程度を測定するステップ

を包含する。

他の態様において本発明は化合物が高血圧症を誘導するかどうかを測定するスクリーニング方法に関するが、かかる方法は：

- 動物に化合物を投与するステップ、および

- かかる動物の血中細胞（少なくとも単球）におけるNLRC4遺伝子発現に対する、かかる化合物による増加の程度を測定するステップ

を包含する。

【0048】

他の態様において本発明は心血管疾患がある治療中の被験者において、治療有効性のモニタリング方法に関連するが、かかる方法は：

- 時間をかけて被験者から得た試料中のNLRC4遺伝子発現測定、および

- NLRC4遺伝子発現の進展測定

を包含し、それによって：

時間をかけてNLRC4遺伝子発現が低下している場合は、かかる治療は有効である、およびNLRC4遺伝子発現が安定的か、または増加している場合は、かかる治療は無効である。

1つの実施形態において本発明はNLRC4遺伝子発現が治療前に得られた少なくとも1つの試料と、治療のための一回目の投与後に得られた少なくとも1つの試料において測定される、上に定義した治療有効性のモニタリング方法に関連する。

【0049】

他の態様において本発明はNLRC4遺伝子発現の測定を可能にする1つ以上の試薬を含む、試料中の心血管疾患を診断するキットに関する。

本発明は下に記載した図と実施例で示される。これらの実施例は本発明を限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0050】

【図1】高齢者におけるインフラマソーム遺伝子モジュールの高発現は縦方向に安定的である。Stanford-Ellisonの試験(N=89)による遺伝子発現のデータは、サイトカイン産生に関連する年齢関連遺伝子モジュールを発見するために使用され、かつインフラマソーム遺伝子に関して濃縮される(図7も参照)。インフラマソーム遺伝子モジュール62およびモジュール78の発現における有意な差の測定については、QuSAGE遺伝子セット分析法が使用された。ポジティブな褶曲した変化値(X軸)は高齢者でより高い発現を示す。遺伝子モジュールそれぞれにおける結合データに基づく年齢のためのp値 $<10^{-3}$ 。

【図2】インフラマソームモジュール高(IMH)の高齢者は高い比率での高血圧症、動脈硬化の進行、家族性長寿が不良な家族歴、および慢性炎症の兆候を示す。(a) ロジスティクス回帰分析をIML(N=11)とIMH(N=12)カテゴリー、および高血圧症(年齢、性別、IML/IMHステータスについて回帰係数を示す)について実施した。(b) 合計で17個の極端な表現型からなる追跡調査は脈波伝播速度により測定される、IMLとIMHカテゴリーの比較において動脈硬化との有意な関連性を示す。(c) 家族性長寿の頻度は少なくとも一人の家族メンバーが90歳を超える家族にIMHよりもIMLにおいてより測定される。(d) 2013年からのデータ(IML N=8, IMH N=8)を使用して62種の異なるサイトカイン、ケモカイン、および成長因子の血清レベルをIML被験者とIMH被験者とで比較した。各検体の年齢、性別、IML/IMHステータスにおけるMFIについて多重回帰分析を実施(共変量の調整済み)して、並び替え検定により有意性(Y軸)を得た。(e) 最大の差は2008年から2011年の間

10

20

30

40

50

に収集されたデータ（各年それぞれでIML N (2008, 2009, 2010, 2011) = 10, 10, 8, 7 および各年それぞれでIMH N (2008, 2009, 2010, 2011) = 12, 11, 12, 8）の縦断的分析で示すようにIMH群で安定的に増加するIL-1 $\beta$ で観察された。

【図3】IMH個人における大量の酸化ストレスおよび増加したヌクレオチド代謝物は、初代単球におけるサイトカイン産生およびインフラマソーム遺伝子発現を誘導することができる。幅広い範囲のメタボロミクスプロファイリングを2011年からの利用可能な血清試料に関して実施した（9 IMLおよび11 IMH個人）。分析された合計で692個の代謝物から67個がFDR < 0.2で（SAM分析により）IMHと比較してIMLで差次的に発現した（全てアップレギュレートされる）。機能的注釈および経路分析はMetPAを使用して実施した。（a）数種の代謝経路のための有意な濃縮が、これらの代謝物について同定された（ $P < 0.05$ ）。（b）

ROS存在下のシスチンからシスチンへの変換；およびアラキドン酸から8-イソプロスタタンへの変換。（cおよびd）IMH（bおよびc）におけるシスチンおよび8-イソプロスタタンの循環レベルの増加は高いレベルの酸化ストレスを示す。アデニン、DL-4-ヒドロキシ-3-メトキシマンデル酸（パニリルマンデル酸）（MMA）、scyllo-イノシトール、N4

アセチルシチジン、N4-アセチルシチジン（N4A）が、それらの有意性の水準（ $Q < 0.01$ 、表5を参照）を基にして選択され、また異なる代謝経路を表し、4人の健康なドナーからの初代単球におけるIL1FCおよびNLRC4の発現を誘導する能力を評価する（1つの代表的実験の結果が示されている）。アデノシンを正の対照として使用した。（e）IL1FCの有意な誘導がアデノシンおよびアデニンに観察されるが、他の化合物では観察されない。（e）

最高用量の各化合物（100  $\mu$ M）を使用してサイトカイン定量に使用したのと同じ試料についてqPCRによってNLRC4とNLRP3の発現を測定した。NLRC4とNLRP3での有意な増加がN4-アセチルシチジンのみで示された（ $P < 0.01$ ）。（f）マウスにより上に示したようにアデノシン治療はNLRP3遺伝子発現をアップレギュレートする（ $P < 0.01$ ）。GAPDHの発現を使用して試料の標準化をしたあとで、その結果を対照に対する変化率として表す。誤差バーは実験変動性を反映する。

【図4】N4-アセチルシチジンおよびアデニンはNLRC4インフラマソームを誘導する。（a）分化したTHP-1細胞はATP（5mM、30分間）で処理を行うか、LPS（1  $\mu$ g/ml、4時間）で刺激を受けた後、ATPでパルスされるか；または、アデニン（Ad）かN4-アセチルシチジン（N4A）単独か組み合わせで6時間、指示濃度（mM）で処理を行った後、ATP併用または非併用でパルスされる。サイトカインIL-1 $\beta$ 、IL-18、TNF- $\alpha$ の分泌はELISAにより細胞培養上清から測定される。（c）分化したTHP-1細胞は示された化合物（1mM N4A；300  $\mu$ M Ad）で6時間、またはATP 5mMで30分間の処理を行い、細胞は溶解され、続けて細胞溶解物は各種抗体で免疫プロットされて、NLRs、Casp1、proIL-1 $\beta$ の発現をモニターした。（d）分化したTHP-1細胞は上に記載したように処理を行い、細胞溶解物はBiotinyl-YVAD-fmkペプチドを用いた免疫沈降反応を受けた。次にストレプトアビジン-セファロースビーズを使用して複合体を回収し、抗カスパーゼ-1 p10抗体で免疫プロットされた。（e）分化したTHP-1細胞はAc-YVAD-fmkが対照DMSOの存在下または非存在下で上に記載の化合物で処理を行い、IL-1 $\beta$ 分泌が測定された。（f）分化したWTまたは細胞株（1mM N4A；300  $\mu$ M Ad）は上に記載した化合物で処理を行い、IL-1 $\beta$ 分泌が測定された。右側において安定的なshTHP-1細胞株でのNLRC4のタンパク質発現を示す。（g）上に記載したWTかKOマウスからの骨髓由来マクロファージが単離され、化合物の組み合わせ（1mM N4A；300  $\mu$ M Ad）で処理を行い、IL-1 $\beta$ 分泌が測定された。データはサイトカイン濃度で表す（pg/ml）（mean  $\pm$  SD；n = 3）。 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 。

【図5】N4-アセチルシチジンおよびアデニンは血小板を活性化する。一次血小板は二人のドナーの血液から単離されたらトロンビン、またはADP、または種々の濃度のアデニンあるいはN4-アセチルシチジンを用いて37 $^{\circ}$ Cで6時間、インキュベートした。血小板活性化はフローサイトメトリーによりCD61とCD62Pの膜発現を測定し、モニターした。データは類似の結果となった少なくとも3つの独立した実験を表す。

【図6】IMH高齢者において同定されたヌクレオチド代謝物はマウスにおける高血圧を誘導する。成熟マウス（12~18週齢）は1日1回、体重につき100  $\mu$ l/25 gの20mMストック溶

液でN4Aとアデニンとの併用投与をして、テイルカフ法を用いて血圧の変化をモニターした。N4Aおよびアデニンでの処理は初回投与後、早ければ8日目に血圧において境界域の有意の上昇を伴う軽度の効果（前高血圧症）がでる（ $P = 0.02$ ）。20日目には浸透圧ポンプにより（化合物で処理されたマウスに）AdとN4Aを併用するか、または（対照マウスに）PBSと併用するアンジオテンシンII（140 ng/kg/分）が皮下に埋め込まれた。対照群の112（ $\pm 3$ ）と比較して平均で140（ $\pm 7$ ）の収縮期血圧であった処理マウスで有意な上昇が観察された（ $P = 0.008$ ）。

【図7】カフェインはインフラマソーム遺伝子モジュール62およびモジュール78の発現と負に相関し、かつコーヒー由来代謝物はIML被験者で増加する。多重回帰分析をモジュール62およびモジュール78（2008年に収集されたデータからの、 $N = 89$ ）の発現レベルと、

10

mg/週でのカフェイン摂取（年齢、性別、BMIについて調整済み）に対して実施した。(a) カフェイン摂取とモジュール62（ $P < 0.01$ ）およびモジュール78（ $P = 0.024$ ）の発現の間に有意な関連性が見出された。(b) IML群とIMH群の間におけるコーヒーの循環レベルとコーヒー由来代謝物との差が片側（one-tail）スチューデントt検定を使用して計算され、またP値はFisherの組合せ確率試験を使用して統合された（ $P < 0.01$ ）。

【図8】モジュール62およびモジュール78はインフラマソーム遺伝子に関して濃縮され、その発現レベルは高い相関がある。(a) 濃縮分析は超幾何検定を使った老化に関する以前の研究から導かれた41個の年齢関連遺伝子モジュールで実施した。遺伝子モジュール62およびモジュール78の両方ともインフラマソーム遺伝子に関して有意に濃縮された（ $P < 0.01$ ）。(b) モジュール62およびモジュール78の遺伝子発現は、2008年のデータセットからの89人の個人において高い相関があった（ $P < 0.01$ ）。

20

【図9】アデノシン誘導体はIML被験者と比べてIMH被験者で増加する。アデノシンおよびN1 メチルアデノシン、N6 メチルアデノシン、N6 カルバモイルトレオニルアデノシン、N6 スクシニルアデノシン、5-メチルチオアデノシンを含むアデノシン誘導体のレベルは多重回帰によりIML群とIMH群とで比較された（年齢と性別について調整済み）。有意な差がN6 メチルアデノシン、N6 カルバモイルトレオニルアデノシン、5-メチルチオアデノシンで見出された（ $P < 0.05$ ）。バーは適合からの回帰係数の大きさを表す。

【図10】N4 アセチルシチジンおよびアデニンはヒトの一次血小板および好中球を活性化する。(a) 免疫細胞型集団（ImmGenデータベース）の分析はモジュール62およびモジュール78が主としてマクロファージ、単球、顆粒球（それぞれMP、Mn、GN）で発現していることを示す（ $P < 10^{-10}$ ）。(b) 一次好中球は健康なドナーの血液から単離され、アデニンがN4A単体が、または組合せで種々の濃度で24時間、インキュベートしたら、RANK-L+細胞がCD66b+集団中で測定された。(c) 一次好中球はN4A（1 mM）および/またはアデニン（1mM）で処理されて、脱顆粒された集団のパーセントが各ドナーについて測定された。(d) 一次好中球は上に記載されたのと同じ化合物で処理され、IL-1 分泌が各ドナーについて細胞培養上清から測定された。データはサイトカインの濃度（pg/ml）で、または記載のように非処理（NT）状態に対する倍増加で表される。\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

30

【図11】ヌクレオチド代謝物はマウスの腎臓におけるT細胞浸潤を誘導した。成熟雄マウス（12~18週齢）は無作為に対照群（ $N = 4$ ）か、処理群（ $N = 4$ ）に割り振られた。こうした試験を同様の結果である一群当たり10匹のマウスを使用して繰り返した。処理群のマウスは1日1回、体重につき100  $\mu$ l/25 gの20mMストック溶液で、N4Aとアデニンとの併用投与をした。(a) 大動脈ではなく肝臓における高いレベルの湿潤T細胞が対照群と比較して処理群で観察される。(b) 対照群（AngII単独）と比較したN4Aとアデニン - AngII併用処理マウスからの血液細胞の分析は、シグナル伝達蛋白質のより高いリン酸化レベルにより示された、顆粒球と単球における免疫活性化のレベルの増加を示す（FDR  $Q < 0.05$ ）。パネルはマウスの2群を比較したSAM分析の結果を示すが、X軸はスコア（d）パラメータ（y軸）の関数としてFDRまたは有意性（カットオフ5%）を表しており、これは2つの試料を比較する時のT-統計値に等価である。pNF B = NF B（p65 Ser529）のリン酸化型、pCREB = CREB（Ser133）のリン酸化型、pS6 =40Sリボソーム蛋白質56のリン酸化型。

40

【実施例】

50

【 0 0 5 1 】

実施例1 高齢者における選択的なインフラマソーム遺伝子モジュールの高発現

ヒトの老化における免疫細胞からの遺伝子発現の変化を調べるために、遺伝子発現データ用モジュールアプローチを使用してStanford-Ellisonの縦断的コホートで老化関連遺伝子の存在が分析された。遺伝子モジュールは調節プログラムとして作用していると思われる共通の転写因子の制御下での一組の共発現遺伝子として定義される。このアプローチの重要な特徴は遺伝子の機能的注釈にかかわらず、その成分の協調的な発現に従い遺伝子がモジュール内に組織化されることであり、そのようなモジュールは機能に関与すると以前から知られている遺伝子と、機能がまた発見されていない遺伝子を含んでいる。このアプローチを使用して、2008年中に収集されたデータから導かれた合計109個の遺伝子モジュールのアプローチが年齢と相関することが見出されたが (FDR  $Q < 0.05$ )、遺伝子機能的注釈分析に従うサイトカイン産生の関与に、この内の2個 (それぞれ82と17個の遺伝子からなるモジュール62およびモジュール78) だけに注釈をつけた ( $P < 0.01$ )。41個の年齢関連遺伝子モジュールについて偏りのない方法で確認するために、これらの遺伝子モジュールのみがインフラマソーム結合遺伝子に関して濃縮され、また超幾何検定を実施することでモジュール62およびモジュール78のみに対して有意に濃縮されることが見出された (FDR  $Q < 0.01$ ) (図8a参照)。

10

NLRC4 を含有するモジュール78と、幾つかある遺伝子の中で特にNLRC5およびIL1Bを含有するモジュール62はIL1RN、TLR6、IL1B (モジュール62) と、IFAR1、TLR5 (モジュール78) などのインフラマソーム活性に関連していた。モジュール62はまた細胞死に関与するために注釈をつけ ( $P < 0.05$ )、このことは炎症性カスパーゼの活性化がサイトカイン成熟に加え、急速なパイロトーシス細胞死を引き起こすことを考えれば驚くに当たらない。興味深いことに、この2つの遺伝子モジュールは類似した転写因子により制御されているようである。例えばBCL6、CEBPB、MXD4、NFIL3などの遺伝子は遺伝子モジュールの両方の調節プログラムに存在していた (濃縮  $P < 0.01$ )。

20

モジュール62およびモジュール78の年齢関連性の安定性を測定するために、Stanford-Ellisonのコホートにおいて連続の5年を通じて収集された試料からのデータを分析した。各年とも新しい被験者と復帰できた前年からの被験者から成っており (表2)、若者と高齢者における遺伝子モジュール62と遺伝子モジュール78の発現はQuSAGE遺伝子セット分析方法を使用して比較された。

30

【 0 0 5 2 】

【表2】

	2008	2009	2010	2011	2012
若者	29	22	20	28	19
高齢者	60	51	55	59	52

表2 各年の若者 (20~30歳) と高齢者 (60~89歳) の人数。

この分析の場合、かかる試験 (N=114) における個人の最初の出現からの試料はモジュール発現についての年齢関連性の分析に使用された。総合して考えると、このデータセットは2つの遺伝子モジュールについてベースラインの年齢依存性増加を示す (図1、 $p$ 値 $< 10^{-3}$ )。この結果は集団レベルにおいてインフラマソーム経路の遺伝子はヒトの加齢においてアップレギュレートされ、かつこれらの変化は縦方向に安定的であることを示す。

40

【 0 0 5 3 】

実施例2 インフラマソームモジュール62および78の持続的発現は高血圧症、中心動脈硬化、自己申告家族性長寿に相関する

慢性炎症が種々の年齢関連疾患と関連しているので、モジュール62およびモジュール78の発現が年齢コホートにおける臨床表現型に結合しているかを調べた。このため極端な表現型は、モジュール62およびモジュール78の発現レベルにおける大きさと慢性化に基づく

50

分類を使用して定義された。被験者は分析された5年間における3年以上で、各遺伝子モジュールについて、それぞれ上側四分位数であるか、または下側四分位数であるかによりインフラマソームモジュール高度 (IMH) 群か、またはインフラマソームモジュール低度 (IML) 群かに帰属させた。これらのカテゴリーに属しない被験者は分析には含まれていない。モジュール62の場合は極端な表現型を示す19人の個人、つまり9人のIMHと10人のIMLが得られ、またモジュール78の場合は16人の個人、つまり9人のIMHと7人のIMLが得られた。各カテゴリーにおいて、モジュール62およびモジュール78の重複度が有意であると知られている (6人のIMHと6人のIML、濃縮のためのP値 < 0.001)。更に全ての個人における、この2つの遺伝子モジュールの発現レベルは高い相関がある ( $R^2 = 0.76$ ,  $P < 10^{-5}$ ) (図8b参照)。

10

このことから統計的検出力を向上させるために、モジュール62およびモジュール78のIMHまたはIMLの個人は更なる分析のために合わせられた。ロジスティクス回帰分析を実施して糖尿病、高血圧症、精神疾患などの臨床歴についてIMHとIMLの表現型を比較した。糖尿病、精神疾患については有意な関連性は見出されなかった。しかし75%のIMHの被験者は高血圧性 (本態性高血圧症) であり (9/12)、IML群ではほとんどないことが見出された (1/11または9%)。高齢者コホート (60~89歳) における全ての個人を対象とした高血圧症の割合は52%であったが、US20における60歳を超える個人では65%であった。当該の高齢者コホートの年齢範囲が相対的に大きいので (60~89歳)、ロジスティクス回帰モデルには年齢と性別が含まれている。加えて分析は薬歴 (表3) およびボディマスインデックス (BMI) (方法を参照) などの別の交絡因子について調整され、高血圧症とIMH/IML状態の間に有意な関連性がまだ見出された ( $P = 0.002$ ) (図2a参照)。

20

【 0 0 5 4 】

【表3】

名前	作用機序	クラス
アムロジピン	カルシウムチャネル拮抗薬	1
アタカンド	アンジオテンジンII受容体拮抗薬	2
アテノロール	$\beta$ 遮断薬	3
ベニカル	アンジオテンジンII受容体拮抗薬	2
カンデサルタン	アンジオテンジンII受容体拮抗薬	2
カルチアXT	カルシウムチャネル拮抗薬	1
カルベジロール	$\beta$ 遮断薬	3
クロルタリドン	チアジド系利尿薬	4
ジルチアゼム(XR版も)	カルシウムチャネル拮抗薬	1
ディオバン	アンジオテンジンII受容体拮抗薬	2
ドキサゾシン	$\alpha$ アドレナリン遮断薬	5
エナラプリル	ACE阻害薬	6
フロセミド(AKA ラシックス)	ループ利尿薬	7
HCTZ(ヒドロクロロチアジド)	チアジド系利尿薬	4
リシノプリル	ACE阻害薬	6
リシノプリル+HCTZ	ACE阻害薬 + チアジド系利尿薬	6*4
メトプロロール	$\beta$ 遮断薬	3
スピロノラクトン	カリウム保持性利尿薬	8
トリアムテレン	カリウム保持性利尿薬	8

表3 IMLとIMHの被験者に処方される薬剤リスト

IMH群とIML群が診断された高血圧症の病歴および別の交絡因子の潜在的寄与で異なることに基づき、頸動脈 大腿動脈脈波伝播速度(PWV)試験を使用して動脈硬化(心疾患合併症に対する安定なリスク因子)を測定する追跡調査を実施した。中心動脈硬化の測定としてのPWVは、IMH群(10.7 ± 2.1 m/s)と比較するとIML群(7.9 ± 2.4 m/s)において有意に低い(P = 0.02)(図2bを参照)。

興味深いことに少なくとも一人が90歳を超えている家族に帰属していることで測定される自己申告家族性長寿は、IMHの被験者(11%)と比較してIMLの被験者(88%)において有意に高い(P < 10<sup>-4</sup>)(図2cを参照)。このことから高血圧症、動脈硬化、また家族性長寿の不良な家族歴を含んでいる非成功的な加齢関連臨床表現型のクラスはIMHの極端な表現型で表される。

これらの結果は(i)高血圧症発症リスクは長寿の家族において有意に低く、かつ(ii)動脈硬化は年齢、性別、血圧と無関係の心血管疾患と脳卒中を予測することを示して、先の臨床観察を説明する機構的結合を示唆する。

## 【0055】

## 実施例3 IMHの高齢者は高レベルの循環IL1FCで慢性的に炎症を起こしている

過去10年間、高血圧症および血管リモデリングでの慢性炎症の役割への関心が高まっているが多くの研究はCRP、IL-6、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ などを含めた炎症マーカーレベルのような慢性炎症に関する重要なメディエーターに注目している。このことから2013年の年1回の訪問時に、同一の個人より収集された血清試料から得た合計62のサイトカインとケモカインの循環レベルの比較を実施した。IML/IMHステータスに対する各サイトカインの回

10

20

30

40

50

帰分析を実施し、年齢と性別については調整した。回帰係数の有意性を得るために500を超える組合せで再サンプリング分析を実施した。17のサイトカインで有意な増加が認められ、その内のIL-1、IL-6、IL-23、IFN-、IL-17(図2dを参照)は最近、マウスでの高血圧症の炎症モデルでも同定された。

【 0 0 5 6 】

【表 4 - 1】

検体	インターセプト	IMH_I ML	性別	年齢
TGFA	0.07153846	0.062	0.744	0.868
NGF	1	0.062	0.744	0.8266667
IL1B	0.07153846	0.1033333	0.93	0.6763636
IL31	0.775	0.1033333	0.93	1
IL23	1	0.1033333	0.5425	1
IFNB	0.07294118	0.155	0.9358491	1
IL17F	1	0.1641176	0.9789474	1
IL21	0.08611111	0.1641176	0.7560976	0.868
SDF1A	0.07294118	0.1653333	0.7294118	1
IL6	1	0.1653333	0.7294118	1
MCSF	0.10333333	0.1653333	0.62	1
FGFB	0.062	0.1653333	0.7294118	1
IL12P70	0.10333333	0.186	0.7294118	1
GROA	0.062	0.186	0.62	1
IFNG	0.093	0.19375	0.7294118	0.6676923
MIG	0.18083333	0.19375	0.744	1
IL13	0.07153846	0.1972727	0.8414286	0.6716667
IL27	0.10333333	0.2066667	0.8266667	1
PIGF1	0.07153846	0.2066667	0.8414286	0.6888889
TRAIL	0.07294118	0.2066667	0.7294118	1
IL1A	0.07153846	0.2066667	0.8414286	0.6888889
TNFA	1	0.2156522	0.744	1
CD40L	1	0.2156522	0.7560976	1
IL8	0.07153846	0.2232	0.62	0.682
MIP1B	1	0.2232	0.7294118	0.7971429
MIP1A	0.07294118	0.2384615	0.8857143	1
TNFB	1	0.2755556	0.9581818	1
IL4	0.12681818	0.2993103	0.9358491	1
GCSF	1	0.2993103	0.7560976	1
IL15	0.093	0.31	0.8266667	1
IL2	1	0.32	0.9789474	1
LIF	1	0.329375	0.8857143	1
FASL	0.07153846	0.3569697	0.7294118	1
IL5	0.2325	0.4536585	1	1
EOTAXIN	0.63589744	0.4536585	0.8857143	1
SCF	0.19076923	0.4536585	1	1
IFNA	0.07153846	0.4536585	0.7560976	1
TGFB	0.22	0.4536585	0.9358491	1
MCP1	0.10333333	0.4536585	0.7294118	1
EGF	0.24424242	0.4536585	0.8266667	1
MCP3	1	0.4536585	0.7560976	1
IL10	1	0.5166667	1	1
IL17A	0.22	0.5166667	0.9789474	1
IL1RA	1	0.5166667	0.744	1
GMCSF	1	0.5166667	0.744	1
VEGFD	0.27352941	0.5166667	0.7560976	1
RESISTIN	0.16173913	0.5166667	0.744	1
VEGF	1	0.5166667	0.8266667	1
BDNF	1	0.5849057	0.6888889	1

10

20

30

40

【表4 - 2】

IL18	0.22962963	0.5849057	0.8857143	1
VCAM1	0.22	0.5849057	1	1
IL22	1	0.5849057	0.775	1
LEPTIN	1	0.5849057	0.744	1
RANTES	0.90731707	0.6763636	0.5425	1
HGF	1	0.6763636	0.9789474	1
IL7	1	0.7482759	0.9358491	1
IL9	0.19076923	0.7482759	0.5166667	1
PAI1	0.63589744	0.7482759	0.7294118	1
IL12P40	0.63589744	0.8266667	1	1
ICAM1	0.53142857	0.8266667	0.7294118	1
IP10	0.22	0.9147541	0.7294118	1
PDGFBB	0.63589744	1	0.7560976	1

10

表4 高齢者のIMH群/IML群に関連するサイトカインとケモカインのリスト。

最も大きい差は2008年から2011年の間に収集されたデータの回帰分析により、IMH群において安定的に増加したIL-1 $\beta$ で観察された(図2eを参照)。

これらの結果はIL1FCおよび別の炎症性サイトカインの構成的産生による免疫活性化状態がIML群と比較してIMH群の被験者を特徴付けることを示すが、これはまたNLRP4における機能獲得変異が構成的IL-1 $\beta$ 産生を伴うマクロファージ活性化症候群を引き起こすことを示した2つ最近の報告とも合致している。

20

## 【0057】

実施例4 IMH高齢者におけるヌクレオチド代謝機能障害および酸化ストレス

IL1FCの成熟および放出はインフラマソーム機構により制御されている。この機構のコア成分は代謝物を含んでいる多量の炎症性刺激の後で転写レベル(プライミング)と転写後レベル(活性化)で調節される。2つのステップにおける代謝制御を示唆する蓄積の証拠を前提として、代謝機能障害はIMH群において観察されるインフラマソーム遺伝子発現を起動させて、炎症性サイトカインの産生を増加させる潜在的循環危険関連分子パターン(DAMPs)の生成を引き起こす仮説を立てた。仮説を実証するために11人のIML個人と91人のIMH個人の入手可能な血清から質量分析により定量化された、合計で692個の代謝物におけるメタボロミクスプロファイリング分析を実施した。2つの群の間の有意な差を検索するためにマイクロアレイの有意差分析(SAM)を実施した。合計で67個の代謝物について、2つの群の間で有意に異なっていた(図5を参照)。経路濃縮分析によりIMH個人でアップレギュレートされると見出される代謝物はピリミジン代謝に関して( $P < 10^{-4}$ )高度に濃縮され、一方、別の経路に対しては( $P < 0.01$ )より少ない程度であることが明らかになった(図3aを参照)。

30

続けて、この経路に関する遺伝子発現レベルの差をカットオフ $P$ 値 $< 0.01$ と、経路の影響 $> 0.05$ を使用して分析した。分析された代謝経路にはピリミジン代謝、アラニン代謝、パントテン酸とCoA生合成、プリン代謝が挙げられる(図3aを参照)。この分析によりピリミジンおよびプリン経路(図8bを参照)に関する遺伝子の差次的発現が明らかになったが、ただしアラニン代謝において、更にパントテン酸またはCoA生合成経路においてはその限りではない( $P < 0.05$ )。特にヌクレオチド三リン酸(UTP、CTP)を分解してウラシル、およびCMPK1、NT5E、UPRT、ENTPD1、その他のチミン誘導性の種を生成する重要な遺伝子のアップレギュレーションは、IMH群において認められる代謝物の種と一致した。このことからメタボロミクスと遺伝子発現データの統合はIML個人と比較した場合、IMH個人にはヌクレオチド代謝機能障害の兆候があることを示唆した。

40

T細胞の活性化における酸化ストレスの重要性を考慮して(樹状細胞上のイソケタール修飾蛋白質の生成を通して)、酸化ストレスのマーカーの存在はIML被験者と比較してIMH被験者において分析された(図3bを参照)。メタボロミクスのデータを使用して、循環シス

50

チンのレベル（システインの酸化生成物）がIMH被験者とIML被験者とで違いが有るのか、多重比較のための調整なしで直接的に探索した。システインからシスチンへの反応を媒介する酵素が存在しないので、この化合物は活性酸素種（ROS）（図3bを参照）との直接反応で生成され、従ってこれは酸化ストレスの重要なマーカーである。循環シスチンにおける有意な差はIML被験者と比較してIMH被験者において見出された（図3cを参照）。

【 0 0 5 8 】

【表 5】

代謝産物名	スコア(d)	q-値(%)	代謝産物名	スコア(d)	q-値(%)
スタキドリ	2.449	0.000	オロチジン	1.667	13.780
ベトニシ	2.429	0.000	キシリトール	1.663	13.780
scyllo-イノシトール*	2.362	0.000	N3-メチルウリジン	1.656	13.780
5,6-ジヒドロチミン	2.291	0.000	コルチコステロン	1.652	13.780
N-アセチルトレオニン	2.272	0.000	プリンドウリジン	1.644	13.780
N4-アセチルシチジン*	2.238	0.000	コール酸	1.642	13.780
chiro-イノシトール	2.208	0.000	AICA リボヌクレオチド	1.636	13.780
パニルマンデル酸(VMA)*	2.078	0.000	ジメチルグリシン	1.604	13.780
N6-メチルアデノシン	2.022	0.000	3-ヒドロキシ馬尿酸	1.604	13.780
3-ヒドロキシ-3-メチルグルタル酸	2.022	0.000	キサントシン	1.595	13.780
S-アデノシルホモシステイン(SAH)	2.004	0.000	N-メチルピペコリン酸	1.583	13.780
アチソガ	1.955	0.000	クエン酸	1.582	13.780
スクシニルカルニチン	1.939	0.000	ヘキセンジオイルカルニチン	1.577	13.780
アデニン*	1.931	0.000	N-アセチルメチオニン	1.575	13.780
N6-カルバモイルトレオニルアデノシン	1.884	0.000	キノリン酸	1.567	13.780
5,6-ジヒドロウラシル	1.874	0.000	ベノイルスフィンゴミエリン	1.567	13.780
ヒポタウリン	1.873	13.780	ガンマ-トコフェロール	1.567	13.780
4-アセトアミドブタン酸	1.852	13.780	N-アセチルアラニン	1.565	13.780
3-ウレイドプロピオン酸	1.846	13.780	O-スルホ-L-チロシン	1.558	13.780
5-メチルチオアデノシン(MTA)	1.844	13.780	2-アミノオクタノン酸	1.545	13.780
C-グリコシルトリプトファン	1.825	13.780	キシロン酸	1.541	13.780
myo-イノシトール	1.811	13.780	フシトール	1.540	13.780
N-アセチルセリン	1.778	13.780	3-メトキシチロシン	1.500	15.966
マロン酸(プロパン二酸)	1.763	13.780	インドール酪酸	1.495	15.966
N6-アセチルリシン	1.760	13.780	17-ヒドロキシプレグネロングルクロニド	1.474	15.966
ピログルタミン	1.725	13.780	3β,7α-ジヒドロキシ-5-コレステレン酸	1.473	15.966
ホモバニリン酸(HVA)	1.720	13.780	2-ヒドロキシフェニル酢酸	1.466	16.880
N2,N2-ジメチルグアノシン	1.709	13.780	エイコセノイル スフィンゴミエリン	1.459	16.880
ビリドキシン(ピタミンB6)	1.703	13.780	グロン酸	1.453	16.880
スクロース	1.677	13.780	N-メチルプロリン	1.445	16.880
4-ヒドロキシ馬尿酸	1.676	13.780	3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸	1.402	16.880
2-アミノヘブタン酸	1.675	13.780	2-メチルマロニルカルニチン	1.393	16.880
リボン酸	1.670	13.780	ジメチルマロン酸	1.375	16.880
N-アセチルノイライミン酸	1.670	13.780			

表5 IML被験者と比較してIMH被験者においてアップレギュレートされた代謝物のリスト。初代単球における実験のために選択された化合物には(\*)が付されている。

10

20

30

40

加えて循環イソケタル(8 イソプロスタン)を定量化してIML被験者と比較してIMH被験者において有意な差を見出した(図3dを参照)。総合してみると、これらの発見はIM

50

L個人と比較してIMH個人は高いレベルの酸化ストレスに曝露されていることを示している。ヌクレオチド代謝の欠陥に加えて、IMH個人におけるミトコンドリア生体エネルギーの代謝再プログラミングはROSの構成的な高レベルと、その後の慢性的酸化ストレス状態を引き起こす仮説を立てた。

【0059】

実施例5 IMH個人におけるヌクレオチド代謝物は単球でのIL1FC産生を誘導し、一次ヒト血小板を活性化する

上に記載したヌクレオチド代謝とミトコンドリア生体エネルギーにおける機能障害、循環代謝物と慢性的酸化ストレスの生成をそれぞれ説明される。IML被験者と比較してIMH被験者からの血清において高いレベルと見出された循環代謝物が、NLRC4遺伝子発現および/またはサイトカイン産生をアップレギュレートするのかを試験するために、当該分析から同定された4つの候補化合物が選択された。これらは異なる代謝経路を表している。これにはアデニン(プリン代謝)、DL 4 ヒドロキシ 3 メトキシマンデル酸(パニリルマンデル酸)(フェニルアラニンとチロシン代謝)、scyllo イノシトール(イノシトール代謝)、N4 アセチルシチジン(N4A)(ピリミジン代謝)が挙げられる(表5)。アデノシンを正の対照として使用した。4人の健常ドナーからの初代単球が新鮮な血液から単離され、示された化合物の濃度を増加させて6時間、インキュベートした。IL-1 およびIL-18での有意な増加がアデノシンとアデニン処理で見られたが、別の化合物では観察されなかった(図3e)。またこれらの刺激が(アデノシン刺激の正の対照として使用される)NLRC4とNLRP3の発現に変化を引き起こすかを見る試験も行った。予想されるようにアデノシン処理はNLRP3の発現を増加させた(図3fを参照)。しかしNLRC4の増加は、この化合物では観察されなかった。逆にN4Aによる処理はNLRP3とNLRC4の両方を誘導した( $P < 0.01$ )。アデニン、DL 4 ヒドロキシ 3 メトキシマンデル酸、scyllo イノシトールでは遺伝子の発現に対する効果は観察されなかった。この結果から分解の内在性ヌクレオチド生成物tRNA(酸化ストレスのマーカー)であるN4Aは第1のプライミング信号として作用して、またアデノシンおよびアデニンはIL1FCの誘導と分泌のための第2の活性化信号を生成すると示唆される。この点については更なる生化学的研究が必要である。アデニン処理がNLRP3またはNLRC4をアップレギュレートしないで初代単球からのIL1FC産生を誘導する事実は少なくとも、ここで試験されたドナーからの細胞におけるインフラマソーム遺伝子のバックグランド発現を伴うインビボプライミングの程度を示唆している。

平行実験では単独または併用投与した代謝物N4Aおよびアデニンが、インビトロでのインフラマソーム活性化とサイトカイン分泌を誘導する可能性があるかどうかを検討するために分化THP-1細胞およびヒト単球細胞株を処理した。単独でアデニンまたはN4Aをインキュベーションに用いてもIL-1、IL-18(別のIL1FC)またはTNF- $\alpha$ の産生に効果がないことが見出された(図4を参照)。しかしN4Aの存在下でのATPを添加はTNF- $\alpha$ ではなくIL-1とIL-18の分泌を強力に誘導した(図4を参照)。

またアデノシンおよびN4Aを用いた同時処理細胞は、ATPを用いた細胞のプルシング後に更に増大したIL-1とIL-18のレベルの有意な増加を誘導した(図4を参照)。IL-1とIL-18の産生に対するN4Aとアデニンの組合せ効果はTNF- $\alpha$ では観察されず、このことから観察された効果はインフラマソーム活性化に依存する可能性を示唆している。

【0060】

このことはN4 アセチルシチジンおよびアデニンの二つの存在により、ヒト単球からのIL1FCのインフラマソーム活性化と分泌に必要な二つの信号が得られることを示す。

血小板活性化は感染と非感染病巣由来の両方の様々な炎症状態における重要な段階であり、蓄積証拠によると高血圧症患者が健常対照者と比較して活性化血小板の高いレベルを示す。高血圧症における血小板活性化に寄与する推定機構は内皮機能不全、神経液(交感神経系およびレニン-アンジオテンシン系)過活動、血小板一酸化窒素(NO)生合成、増加した剪断に続発する血小板の脱顆粒などを含む。血小板活性化中の重要な特徴は、感染患者またはインビトロでの Dengue 熱に感染した患者からの血小板がNLRP3インフラマソームを活性化してカスパーゼ 1 依存性IL-1 $\beta$ 分泌を誘導することが、Dengue 熱感染に関

する最近の試験に記載されている。このことからN4Aおよびアデニンがヒト血小板を活性化できるかどうかを測定しようと努めることになった。そのために血小板が二人の健常ドナーの血液から単離され、アデニンまたはN4Aの種々の濃度において37℃で6時間、インキュベートした。トロンビンおよびADPが対照として使用され、かつ血小板活性化はフローサイトメトリーによりCD61およびCD62P+の膜発現を測定し、モニターしたアデニンはADPによる正の対照と同程度の、(N4Aとは異なって)活性化された血小板の比率の用量依存的増加をロバストに誘導したことが観察された(図5を参照)。このことはIMH日検査において同定された代謝物が、ヒト単球に加えて血小板を活性化できることを示している。

#### 【0061】

当該明細書で試験された年齢関連遺伝子モジュールの発現に關与する様々な免疫細胞型の分析はモジュール62およびモジュール78が単球、マクロファージ、好中球において優先的に発現されていることを示した( $P < 10^{-10}$ ) (図10aを参照)。加えてIMH高齢者とIML高齢者における22個の異なる細胞サブセット( $N = 22$ )の頻度は推定され、また別の分析では当該頻度は若者と高齢者の間で比較された。これらの分析用にCIBERSORT (Newman et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. Nature Methods 12, 453-457, 2015)が使用されたが、ここでは全血などの複雑な組織における細胞サブセット組成物を特徴付けるのに遺伝子発現プロファイルを使用する。若者と高齢者の間におけるCD4 T調節細胞コンパートメントだけでなく循環マスト細胞の推定頻度においても有意差が見出された( $P < 0.01$ )。しかし分析された別の細胞サブセットでは有意差は観察されなかった。同様にしてIMH高齢者とIML高齢者の間では細胞サブセットの頻度において有意差は無かった。総合してみると、この結果から血液細胞の画分は年齢により影響を受けて、特にIMH被験者において単球、マクロファージ、好中球に対応することを示唆する。このことから一次ヒト好中球活性化およびIL-1分泌におけるN4A+アデニンの効果も調べられた。N4Aとは逆にアデニンはCD66b集団内のRANKL+細胞の大きな増加を誘導した(図10bを参照)。加えてRANKLの発現を促進するためにN4A+アデニンの組み合わせは、好中球の脱顆粒された集団での増加を誘導した(図10cを参照)。最後にN4A+アデニン処理好中球は、低濃度でIL-1を分泌することができた(未処理細胞に比べて2~3倍増加)(図10dを参照)。総合してみると、この結果はN4Aおよびアデニンの年齢関連代謝物がRANKLの増加した発現、脱顆粒された好中球の増加、炎症性サイトカインIL-1の分泌亢進などを含めた様々な方法で好中球だけでなくヒト一次血小板を活性化することを示している。

#### 【0062】

##### 実施例6 実験的マウスモデルにおける血圧に対するN4Aおよびアデニンの効果

選択された化合物がインビボでの血圧に対して直接的な効果が有るのかを試験するために、マウスにN4Aおよびアデニンを指示濃度で毎日投与して合計で34日間、血圧の変化についてテイルカフ法を使用してモニターした。N4Aおよびアデニンによる処理は初回投与後の早くも8日目に、血圧における境界域の有意な上昇(前高血圧症)を伴った軽度の効果があった(群の比較に $P = 0.04$ ) (図6を参照)。アンジオテンシンII (AngII)などの前高血圧刺激と酸化ストレス依存性炎症反応が持続性高血圧中に共同で作用している前回の観察に従って、AngIIポンプ(140 ng/kg/分)は20日目に化合物(処理マウスに)またはPBS(対照マウスに対して)と併用して移植された。有意な増加は対照群の112(±3) mmHgと比較して平均の心収縮期血圧が140(±7)の処理マウス群で観察された( $P = 0.016$ ) (図6を参照)。このことから、この結果はN4Aおよびアデニンがインビボモデルでの血圧を上げることができることを示す。

これらデータの全体はN4Aとアデニンの両方の存在がヒト単球からのIL1FC産生、血小板の活性化、マウスにおける血圧の上昇に必要であることを示している。

この実験は一群当たり10匹のマウスを使用して繰り返し、同一のマウスから収集され、また試験の終了時点では腎臓および大動脈からの組織試料だけでなく末梢血試料も、一群当たり合計で6/10マウスから行われた。

組織レベルでは対象と比較してN4A+アデニン処理マウスにおいて大動脈ではなく、腎臓

(皮質)での実質的なT細胞浸潤が観察された( $P = 0.001$ ) (図11aを参照)。この差は腎臓髄質においては有意には至らなかったが、同様の傾向は対照マウスに見られる高いレベルのT細胞浸潤している皮質においてよりも観察された( $P = 0.09$ ) (図11aを参照)。顆粒球、単球、NK細胞、CD4とCD8T細胞、CD4 T調節細胞、B細胞を含む18の多重の血液細胞サブセットにおける免疫活性化マーカーのレベルを調べるのに質量サイトメトリー (CyTOF) を使用した。これらの細胞サブセットの全てにおいて化合物処理済みマウスと対照マウスとの間でCREB、STAT1、STAT3、STAT5、p38、S6、NFkB、ERK、MAPKAPK2を含む一連のリン酸化細胞内シグナル伝達蛋白質だけでなくNFkB阻害剤I $\kappa$ Bと活性化マーカーCD62Lも比較された。単球と顆粒球とにおける高レベルのpS6およびpCREBと、単球における増加したpNFkBとによって証明された免疫活性化の一般的な状態が観察された (図11bを参照)。

意外なことにI $\kappa$ Bのレベルは単球と顆粒球とにおいてもまた高かった。全てのI $\kappa$ BレベルおよびpNFkBレベルが対照と比較して化合物処理済みマウスで上昇している事実は、ヌクレオチド代謝物を用いた免疫細胞の慢性的な刺激が、以前の報告で観察された状態と類似する活性化状態を誘導することを示し、またこの報告は刺激が長い期間に高まってきた時に、振動しているNFkBリン酸化反応/転座が遺伝子転写に必要であることを示している。急性の条件下では全I $\kappa$ Bの低減は上昇したレベルのpNFkB軌跡を進む。しかし慢性の条件下では刺激後のI $\kappa$ Bシグナル伝達の初期の低減は、pNFkBがまだ高い時にベースラインに戻る。

全般的に見れば、これらのデータはこのヌクレオチド代謝物の慢性的な存在が腎臓にT細胞浸潤を引き起こす全身性炎症の状態を生成し、また血圧を上昇させることを示す。

【0063】

実施例7 カフェインはインフラマソーム遺伝子モジュール62および78に負に相関する

高年齢者における慢性炎症を低下させることで出現を防ぎ、多くの年齢関連疾患の臨床症状を遅らせられる。アデニンおよびアデノシンの誘導体はIMH群において大量に見出され、かつIL1FC産生調節に重要な役割を果たすのでカフェイン、メチルキサンチン、アデノシン拮抗薬がインフラマソームモジュール遺伝子発現と関連するかを探索した。そのためにカフェインの食事源と医薬品原料に関する15項目の質問書が用意された。質問書の15項目の各カテゴリーについて、2007年に米国で最も一般的に消費されているカフェイン入り商品の120品からカフェインの近似値を導き出した。2008年に全て個人からのデータを使用して( $N=89$ )モジュール62およびモジュール78の発現およびカフェイン摂取(mg/週)に対して多重回帰分析を実施した。この分析にあたり、カフェイン摂取に関連した既知の交絡因子であるBMIは調整された。カフェイン摂取とモジュール62( $P < 0.01$ )およびモジュール78( $P = 0.024$ )の発現の間に有意な年齢、性別、修正済みBMIについての関連性が見出された (図7aを参照)。

次にIMH被験者およびIML被験者の血清中のカフェインおよびカフェイン由来代謝物のレベルを比較した。そのために前に生成されたメタボロミクスのデータを使用して多重比較の調節をすることなくカフェインおよびその代謝物、パラキサンチン、1,3,7-トリメチル尿酸、テオフィリン、テオプロミン、1-メチルキサンチンの血清レベルを直接的に比較した。総合して考えると混合された6つの化合物すべてについての差は、IML群とIMH群の間で統計的に有意であることが見出された( $P < 0.01$ ) (図7bを参照)。

この結果からカフェイン摂取は遺伝子モジュール62およびモジュール78の発現レベルと、このメチルキサンチンの循環レベルとに対する負の相関が示唆され、また総合して考えると、この代謝物はIMH被験者と比較してIML被験者において増加した。このことからアデノシンおよびアデニンの阻害に対する既知の効果により、軽度のコーヒーの消費は炎症過程の低下に有益であり、これは死亡率の低下との報告された相関を一部で説明する。

【0064】

実施例8 100人の高血圧症患者コホートにおける臨床的検討

この臨床的検討は高血圧症におけるアデニンおよびアデノシン誘導体の意義を検証するために設計された。

N4 アセチルシチジンおよびアデニンの定量化における超高速性能液体クロマトグラフ

イータンデム質量分析 (UPLC-MS/MS) プロトコールは、その方法検証 (特異性、直進性、校正間隔、収率、精度、正確度) を行う。100人の高血圧症患者の血液試料はこのプロトコールによるN4 アセチルシチジンおよびアデニン定量を受ける。

この結果はインビトロでの高血圧症検出のバイオマーカーとしての、N4 アセチルシチジンおよびアデニンの統計的有意を検証するための健康な被験者の血液試料の結果に相関する。

【0065】

#### 材料と方法

##### 試験設計、被験者、試料収集

2008年から2013年の1-3の期間におけるStanford-LPCHワクチンプログラムでの114人のドナー (年齢は20~89歳) は、インフルエンザワクチン試験に登録された。ベースライン試料はインフルエンザワクチンを用いたワクチン接種前に全ての個人から取得された。この試験のプロトコールはスタンフォード大学のInstitutional Review Board of the Research Compliance Officeにより承認される。

インフォームドコンセントは全ての被験者から取得された。全ての個人は歩行可能であり、臨床評価により測定して全般的に健康である。最初の登録時点で志願者は臨床的に観察された肝疾患、インシュリンで治療された糖尿病、軽度から重度の腎疾患、スクリーニング時で血圧が150/95以上、慢性肝炎BまたはC、免疫抑制剤治療の最近か現在の使用を含めて急性全身性または重度の併発症がなく、免疫不全の病歴がなく、既知または疑いのある免疫機能障害がない。加えて年に1回のワクチン接種日には志願者は血液または血液製剤について、それぞれ過去6か月と6週間以内でレシピエントでもドナーでもなく、またベースライン採血の日に熱性疾患の兆候がない。末梢血試料は静脈穿刺から得られ、全血は遺伝子発現分析に使用された (下に記載)。血清は凝固血液の遠心で分離されサイトカインおよびケモカイン定量前にマイナス80 で保存した。

【0066】

##### 遺伝子発現分析

2つの異なったマイクロアレイを使用してStanford-Ellisonのコホート1-3の一部として募集された合計で114人の個人からの全血試料から発現データを生成した; 2008年と2009年のhuman HT12v3 Expression Bead Chip (Illumina, San Diego, CA) および2010年、2011年、2012年のGeneChip PrimeView Human Gene Expression Array (Affymetrix, Santa Clara, CA)。Illuminaのプラットフォームでは増幅し、ビオチン化した相補的なアンチセンスRNA (cRNA) 標的は増幅キット (Applied Biosystems/Ambion) を使用して200ngから250ngまでの全RNAで調製された。標識cRNAの750ナノグラムが48,000個を超えるプローブを含んだIllumina Human HT-12v3 BeadChip arrays (Illumina) に一晚、ハイブリタイズした。続けてアレイは製造業者のプロトコールに従ってIllumina BeadStation 500にて洗浄され、ブロックされ、着色され、スキャンされた。

BeadStudio/GenomeStudio software (Illumina) を使用してスキャンからのシグナル強度値を生成した。正規化のためにソフトウェアを使用して各試料についてバックグラウンドおよびスケール平均シグナル強度を除去し、すべての試料に全球平均シグナル強度とした。遺伝子発現分析ソフトウェアプログラムのGeneSpring GX version 7.3.1 (Agilent Technologies) を使用して、さらなる正規化を実行した。Affymetrixプラットフォームスタンダードのために、Affymetrix 3'IVT Expressプロトコールを使用して50-500ngsの全RNAからビオチン化したcRNAを生成した。DNAポリメラーゼを二重鎖DNAの産生に使用した。T7 RNAポリメラーゼをビオチン化したcRNAのインビトロ転写 (IVT) のために使用した。

フラグメント化および標識化した標的はPrimeView Human Gene Expression Arrayカートリッジにハイブリタイズさせ、また各転写物の多重 (十分な注釈をつけた配列で1つにつき11プローブであり、残りでは1つにつき9プローブ) 独立測定を使用することで、このカートリッジは試料ごとに36,000を超える転写物と変異体の遺伝子発現を測定する。標準的なAffymetrixハイブリダイゼーションプロトコールはAffymetrix GeneChip Hybridization Oven 645を用いて45、60rpmで16時間 (一晚) ハイブリダイゼーションを含む。次

にAffymetrix GeneChip Fluidics Station 450を用いてアレイを洗浄し、着色した。アレイはAffymetrix GeneChip Scanner 3000 7Gを用いてスキャンされ、遺伝子発現データ加工と抽出にはAffymetrix GeneChip Command Console Software (AGCC)を使用した。2008年から2012年の生データはImmunology Database and Analysis Portal (ImmPort)にそれぞれ受託番号SDY314、SDY312、SDY311、SDY112、SDY315として蓄積された。

#### 【0067】

IL1FC 産生とインフラマソーム活性に関連した遺伝子モジュールを同定するのに、TLRs, NLRs, RIG-I様受容体(RLRs)、C型レクチン様受容体 (CLRs) とそのアダプター; 炎症性カスパーゼとその直接調節因子; インフラマソーム遺伝子発現および活性化を調整するとして知られているNF- $\kappa$ BおよびI型のインターフェロン (IFN) シグナル伝達に参与する転写因子を包含するパターン認識受容体ファミリーとその正および負の調節因子を含む、合計89個の遺伝子のリストは手動で精選されたデータから収集された。これら遺伝子の存在は合計で109個の前もって定義された遺伝子モジュールにおいて検索された。遺伝子モジュールは一連の共発現遺伝子共有調節プログラムに対応する。簡潔に言えばデータは分散によりフィルタリングされ、合計で6234個の高度の変異遺伝子は発現のセンタリングとスケーリングにより正規化され、これにより全ての被験者における各遺伝子発現がクラスタリングのために1に等しいEuclideanノルムを持つ。データは正規分布に近似させるのに対数変換された。リンケージ、euclidean距離、1.5の高さカットオフ値にて階層的集約的クラスタ化を使用し、109個のモジュールを誘導した。各遺伝子モジュールについては、Akaike情報基準(AIC)6を使用して既知の転写因子の発現へのモジュールの遺伝子の回帰分析に基づき、一連の調節遺伝子(調節プログラム)が割り当てられる。そのために線形回帰がLARS-ENアルゴリズムを使用して一連の188個の転写因子への各モジュールの発現の弾性ネットペナルティで実施された。LARS-ENの出力の中から最善のモデルを選択するために、within-module分散によって重み付けされた試料特異的項を用いてAICにより生じたモデルの質を評価した。最善のAICスコアに適合したものが各モジュール用に選択された。

モジュール62およびモジュール78の年齢関連性の安定性を測定するためにQuSAGE遺伝子セット分析方法を使用した。これにより一連の遺伝子の平均および標準偏差を表す確率分布が作られ、異なる群における遺伝子セットの比較が可能になる。この分析の場合、かかる試験における個人の最初の出現からの試料はモジュール発現についての年齢関連性の分析に使用された。

極端な表現型の存在は発現レベルの大きさと安定性(慢性化)に従った分類を使用して調べた。各年についてモジュール62およびモジュール78の発現を使用して被験者を四分位数にいた。少なくとも3/5年間、被験者が、それぞれ上側四分位数(被験者の上位25%)であるか、または下側四分位数(下位25%)であるかによりインフラマソームモジュール高度(IMH)群、またはインフラマソームモジュール低度(IML)群に帰属させられた。少なくとも3/5年間、上側または下側四分位数に属しない被験者はこの分析には含まれていない。

#### 【0068】

##### サイトカイン、ケモカイン、成長因子の定量

1. ポリスチレンビーズのキット: ヒト50-plex(2008年)または51-plex(2009年~2011年)キットをAffymetrixから購入して、下に記載した修正を加えてメーカーの推奨に則り使用した。簡潔に言えば試料は96フィルター底面プレート上に抗体結合ポリスチレンビーズで混合され、4 での一晚培養後に室温で2時間、インキュベートした。室温での培養ステップは500~600rpmに設定してオービタルシェイカーにて実施した。プレートは真空濾過され、洗浄緩衝液で2回洗浄されて、次に室温で2時間、ビオチニル化検出抗体でインキュベートした。続けて試料は濾過され、上の記載と同じく2回洗浄されたら、次にストレプトアビジン PEで懸濁された。室温で40分間の培養後、真空洗浄を2回実施してリーディングバッファに再懸濁された。各試料は2回測定した。プレートはサイトカインの各試料において下限を100ビーズにしたLuminex 200の計器を使用して読まれた。Radix Biosolutions製のカスタムアッセイ制御ビーズが全てのウェルに添加された。

11. 磁性ビーズキット：活性標本は血液試料から採取し-80にてアリコートで凍結した。eBiosciences/Affymetrixから購入したヒト63-plex(2013年)キットでは、62個の分析物がQCを通過して下に記載した修正を加えてメーカーの推奨に則り使用した。簡潔に言えばビーズは96ウエルプレートに添加されBiotek ELx405洗浄機で洗浄された。試料は混合抗体結合ビーズを含むプレートに添加され、振とうしながら4での一晚培養後に室温で1時間、インキュベートした。低温および室温での培養ステップを500~600rpmでの軌道振とう器にて実施した。一晚培養後、プレートは洗浄機で洗浄され、次に振とうしながら室温で75分間、ピオチニル化検出抗体が添加された。プレートは上に記載した様に洗浄されて、ストレプトアビジン PEが添加された。室温での30分間の培養後に上で記載した様に洗浄がなされて、リーディングバッファがウエルに添加された。各試料は2回測定した。プレートはサイトカインの各試料において下限を50ビーズにしたLuminex 200の計器を使用して読まれた。Radix Biosolutions製のカスタムアッセイ制御ビーズが全てのウエルに添加された。平均蛍光強度(MFIs)が記録され、今後の分析に使用された。公平な方法でIHおよびIL個人の差を同定するのに、データの分析を最大数の測定された分析物がある年である2013年から行われた(N=62)。IH/IL状態、年齢、性別に対する各分析物について多重回帰分析を実施し、500回の再サンプリングについて並び替え検定により回帰係数についての有意性を得た。IL被験者と比較してIH被験者において観察されたIL-1とIL-1の差が安定的であるのかを試験するために、多重仮説補正をすることなくIH/IL状態、年齢、性別に対するIL-1またはIL-1をもつ回帰モデルを使用して、2008年から2011年に生成されたデータからのIL-1とIL-1のレベルはIH被験者とIL被験者との間で比較された。

統合されたデータはパートレット検定により等分散性を示した。極端な表現型の個人からのデータが14人しかなかったため、2012年からのサイトカインデータはこの分析に含まれていない。独立検定からのP値を統合するための修正一般化フィッシャー法を使用して2008年から2011年までのP値は統合された。

【0069】

#### 心血管系表現型

Stanford-Ellisonのコホートからの患者のサブグループは、Stanford Cardiovascular Institute Biomarker and Phenotypic Core Laboratoryにて総合的な心血管評価を受けた。血管の研究には頸動脈内膜中膜肥厚(cIMT)および中心大動脈脈波の速度(PWV)の測定が含まれた。9.0 MHz Philips線形アレイプローブが頸動脈および大腿動脈の測定に使用された。cIMTは前方、側面、後方測定の平均であり、右と左の頸動脈について平均する。大動脈PWVは伝播した経路長として計算され、大動脈脈波の移動時間で割り、動脈硬化を反映する。経路長(D)は胸骨角から大腿動脈までの距離から、胸骨角から近位下行大動脈までの心エコー距離を引いた値として測定された。

【0070】

#### メタボロミクスデータの生成および分析

メタボロミクスデータについては非標的メタボロミクスプロファイリングを使用して先に記述したメタボロンで行われた。簡潔に言えば正、負、または極性イオンモードでIMH(N=11)およびIML(N=9)からの血清試料は超高速性能液体クロマトグラフィー/質量分析(UHPLC/MS)により、またガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)による分析にメタノール抽出してアリコートに分けた。代謝物は化学標準の参照ライブラリーに対するイオン特性の自動比較により同定されたら、品質管理のための目視検査をする。統計的分析およびデータ表示について欠測値は検出限界以下であると仮定され、これらの値はコンパウンドミニマムで補完された(最小値補完)。統計的有意性を測定するために、共変量として年齢および性別を含む多重回帰モデルからの残差についてのマイクロアレイの有意性分析(SAM)12を実施した。結果への高い信頼性の証としてQ値<0.05が使用された。合計で67個の特異的に調節された代謝物がIMH個人と比較してIML個人で観察された。経路分析は874個の代謝経路における複数の先進的な経路濃縮分析を経路トポロジー特性の分析と併せるMetPA13を使用して実施した。過剰表現および経路トポロジー分析については、そ

れぞれ超幾何検定および相対的媒介中心性を使用した。

【0071】

プリンおよびピリミジン代謝遺伝子の差次的発現

合計で104個のピリミジン代謝遺伝子 (PYR) とプリン代謝 (PUR) に参加する54個の遺伝子がKEGG14から得られた。年齢と性別について調整しながら、ML/IMHステータスに対する2008年からのマイクロアレイデータを使用して各遺伝子発現について回帰分析が実施された。回帰係数の有意性は並び替え検定により得た。差次的に発現した遺伝子は濃縮分析を受けた。結果への高い信頼性の証としてP値< 0.05が使用された。

【0072】

化合物処理、サイトカイン分泌、qPCRアッセイ

アデノシン、アデニン、DL 4 ヒドロキシ 3 メトキシマンデル酸、scyllo イノシトールのすべてはSigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) から、またN4 アセチルシチジンはSanta Cruz Biotechnology (Dallas, TX) から購入した。化合物は健常ドナーからの単離された単球について指示濃度で調べた。全血は静脈穿刺から (30ml) 得られ、単球はメーカーの推奨に則りRosetteSep™ Human Monocytes Enrichment Cocktail (cat # 15068, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) を使用して濃縮された。細胞は密度を200ulのLGM-3 serum-free media (Lonza) 中で3 × 10<sup>5</sup>細胞にして96ウエルプレートに播種され、37 °Cで6時間、インキュベートした。上清が採集されたら直ちに凍結して-80 °Cで保存する。次に試料は上に記載した63-plex Luminex systemを使用してサイトカイン、ケモカイン、成長因子の定量のためにStanfordにあるHuman Immune Monitoring Coreに移送された。

用量反応実験についての有意性を評価するために時系列または用量反応実験のためのクラスタリング法を使用し、かつ有意な用量依存的プロファイルの同定を可能にするShort Time-series Expression Miner (STEM) を使用した。

RNAはメーカーの推奨に則りRNeasy Micro Kit (Qiagen) を使用して細胞ペレットから抽出された。cDNAはSuperScript(R) VILOTM cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) を使用して調製された。NLRC4およびNLRP3発現は予備設計TaqMan(R) Gene Expression Assays (Life Technologies) を使用して定量的PCRにより測定され、またプレートはStepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosciences) により実施した。GAPDHの発現は試料の標準化に使用され、結果は対照に対する率として表される。

【0073】

マウスでの高血圧症研究

成体雄マウス (12~18週齢) を2群に分けた: PBSまたは化合物処理済みマウス (PBS中に溶解されたN4 アセチルシチジン+アデニン)。化合物処理済みマウスにはN4 アセチルシチジンおよびアデニン (それぞれ保存液20mM、100 ul/25 g体重、後眼窩注入で1日1回)、またはPBSが投与された。処理から3週間後、PBSまたはN4 アセチルシチジン+アデニンを1日1回、投与し続けている間に、両群からのマウスにヒトアンジオテンシンII (AngII, #A9525, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO) をもう2週間の注入を行った。AngII (1分当たり140 ng/kg) 100 ul 20 mM (N4A + Adenine) 中か、または100 ul PBS中に溶解され、小型の浸透圧ポンプ (Durect Corporation, Cupertino, CA, USA) に負荷した。続けて浸透圧ポンプは麻酔 (2%酸素、2.5%イソフルラン) をかけてマウスの首の周りの背面に皮下に埋め込まれた。心収縮期血圧はテイルカフプレチスモグラフィ (Vistech System BP-2000, Apex, NC, USA) を使用して、一日おきに意識のあるマウスで測定された。

【0074】

ヒトTHP-1細胞および一次血小板を用いた実験

THP-1単球細胞株を (10%ウシ胎児血清を添加した) RPMI培地中の6ウエルプレートで培養して、かつTPA (10 ng/ml) で一晚分化した。翌日に接着細胞を新鮮培地で洗浄して種々の濃度における作動薬LPS (1 ng/ml、4時間) およびATP (5mM、30分間)、または化合物アデニン/N4 アセチルシチジンで処理した。

ヒト一次血小板を加速や中断をすることなく、1000 rpmでの20分間の遠心分離後にEDTA

10

20

30

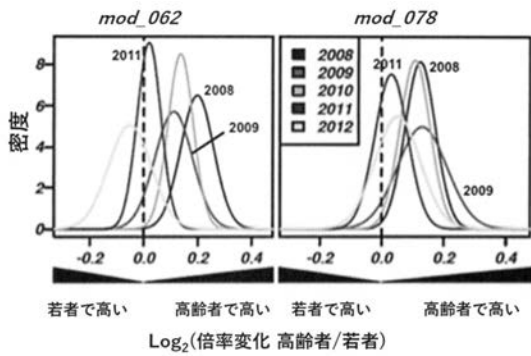
40

50

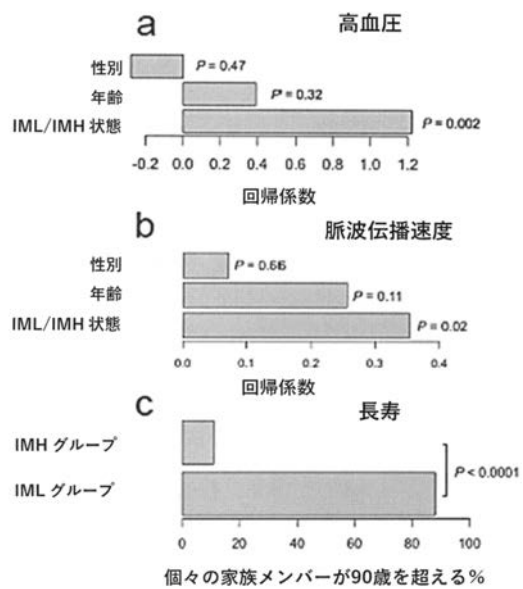
における静脈穿刺を使用して全血から調製した。次に上清を採取して1  $\mu$ M PGE1を添加した。穏やかな遠心分離後（中断なく2000 rpmで1分間）に、上清を除去してTyrode緩衝液を添加した。

次に血小板はトロンピン（0.5 U/mlにおける）、ADP、またはN4Aあるいはアデニンの指示濃度で刺激して、活性化は抗CD61による膜メーカー（血小板集団のメーカー）、および抗CD62-P（凝集に關与する活性化のメーカー）の免疫染色を使用してフローサイトメトリーでモニターした。

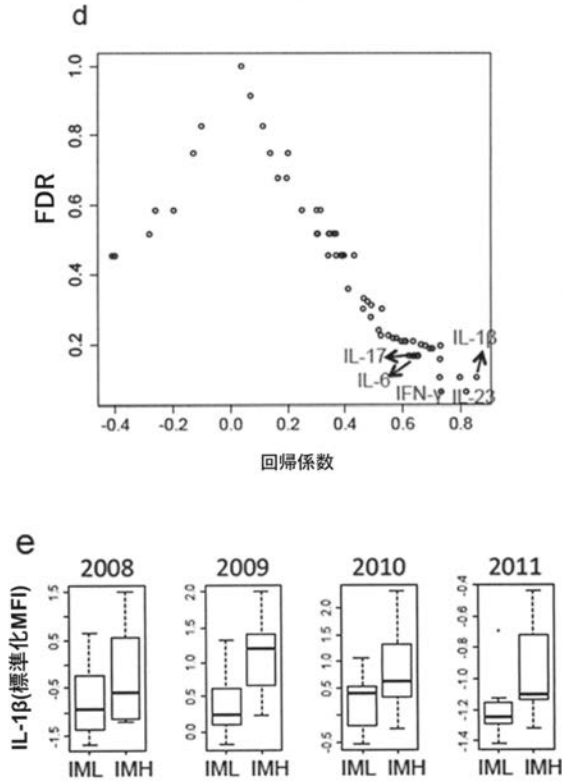
【 図 1 】



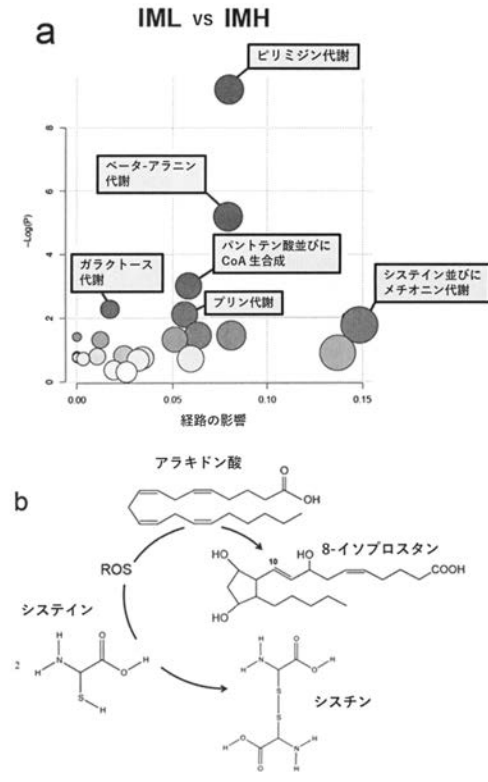
【 図 2 - 1 】



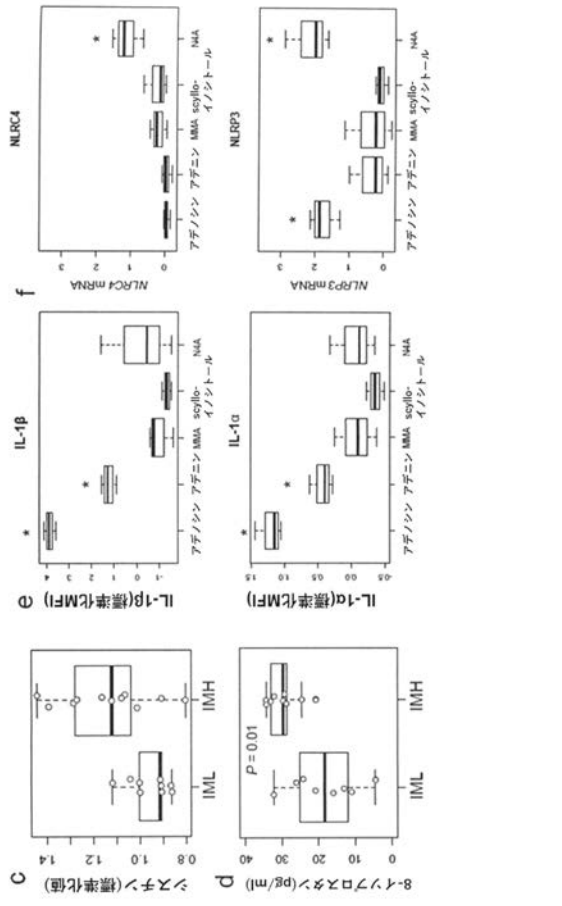
【図 2 - 2】



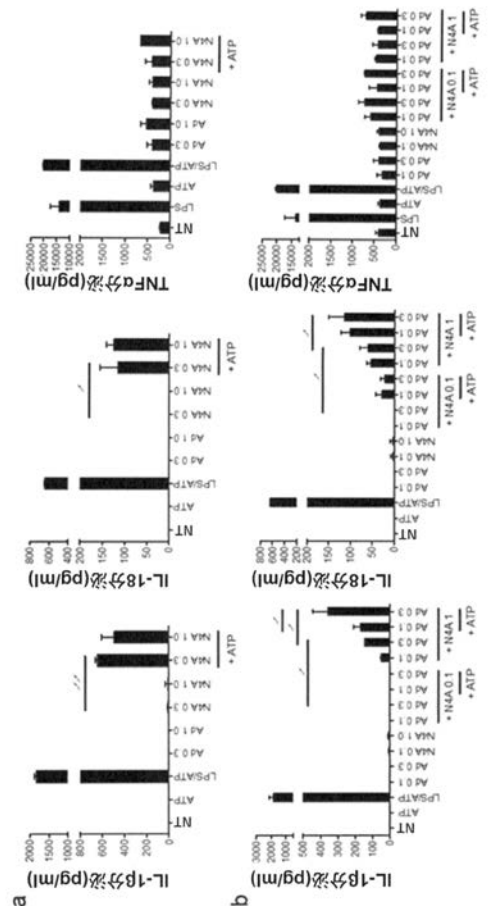
【図 3 - 1】



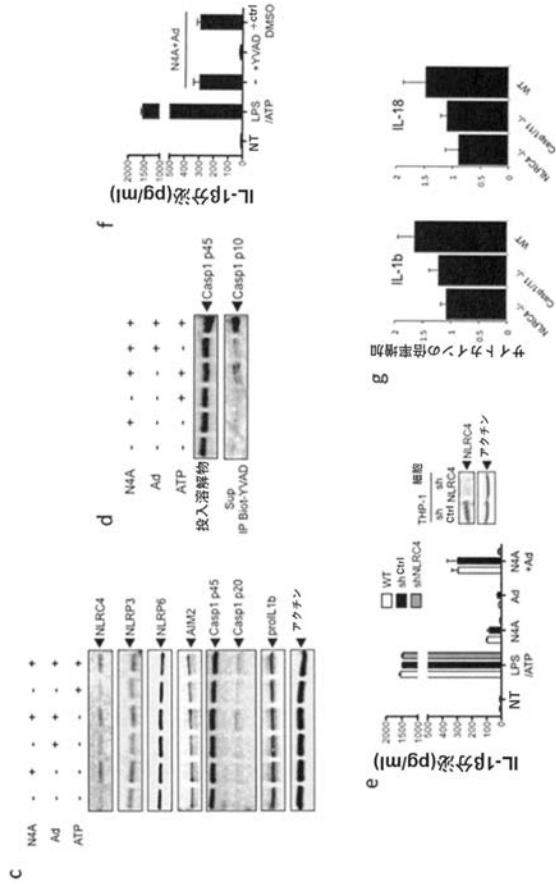
【図 3 - 2】



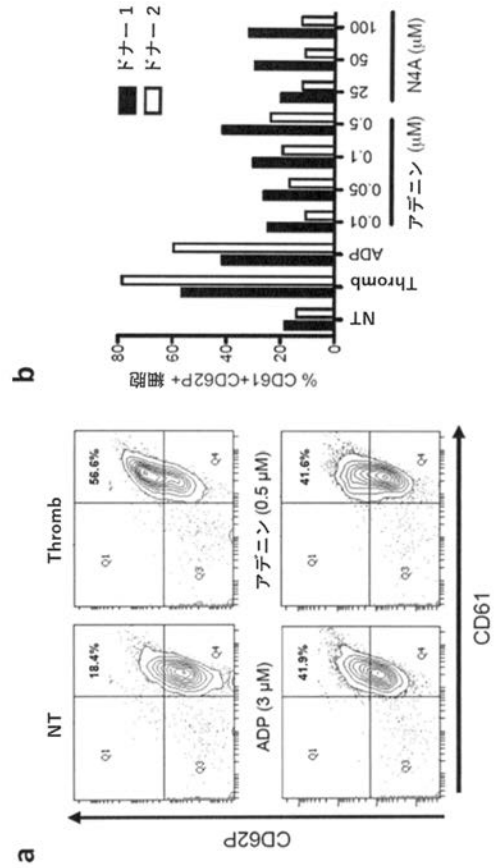
【図 4 - 1】



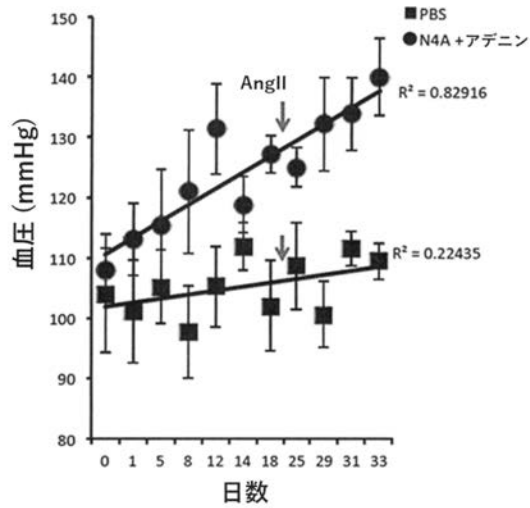
【 図 4 - 2 】



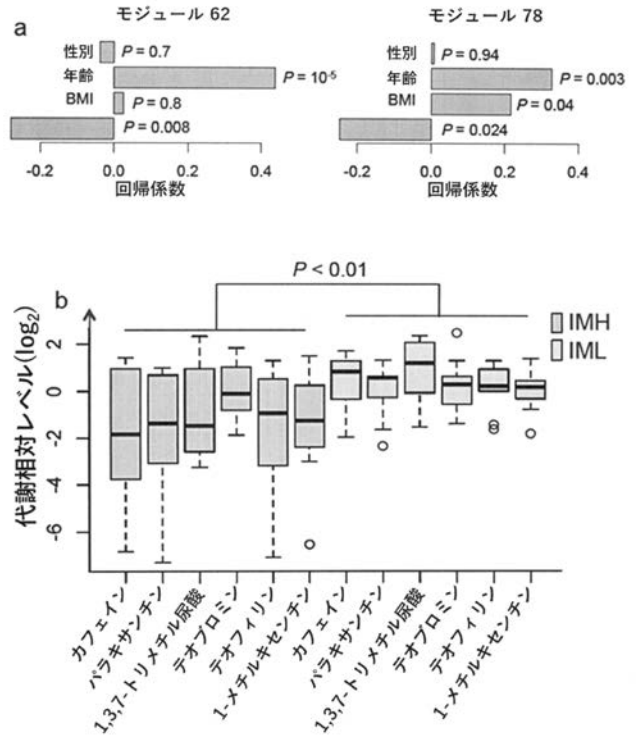
【 図 5 】



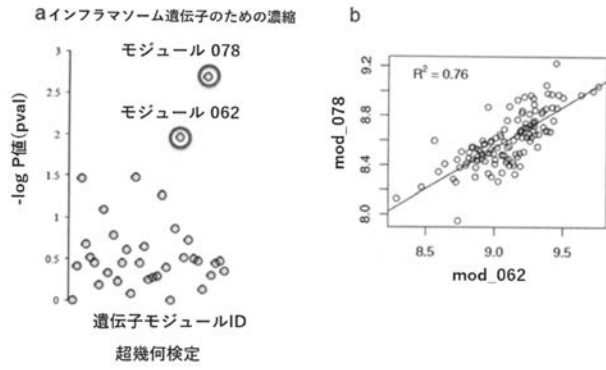
【 図 6 】



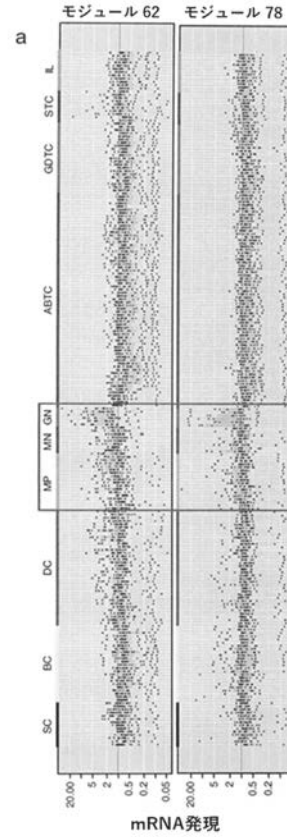
【 図 7 】



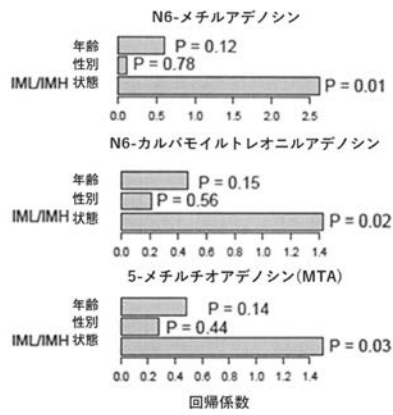
【 図 8 】



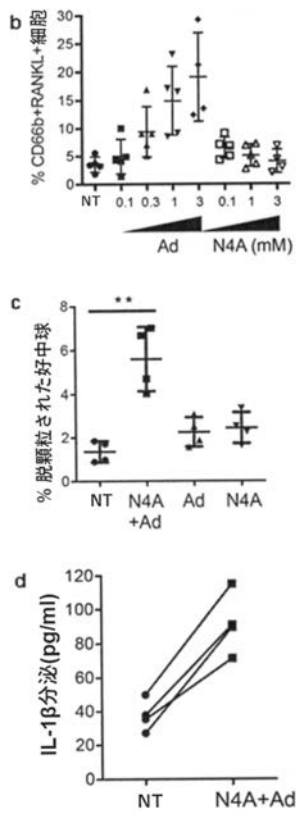
【 図 1 0 - 1 】



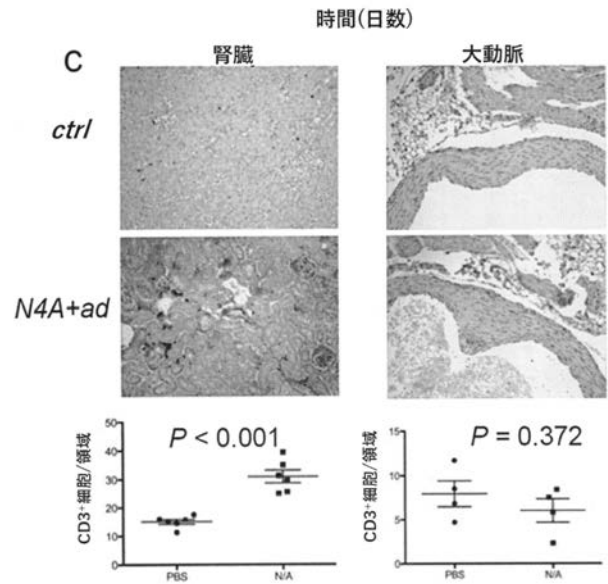
【 図 9 】



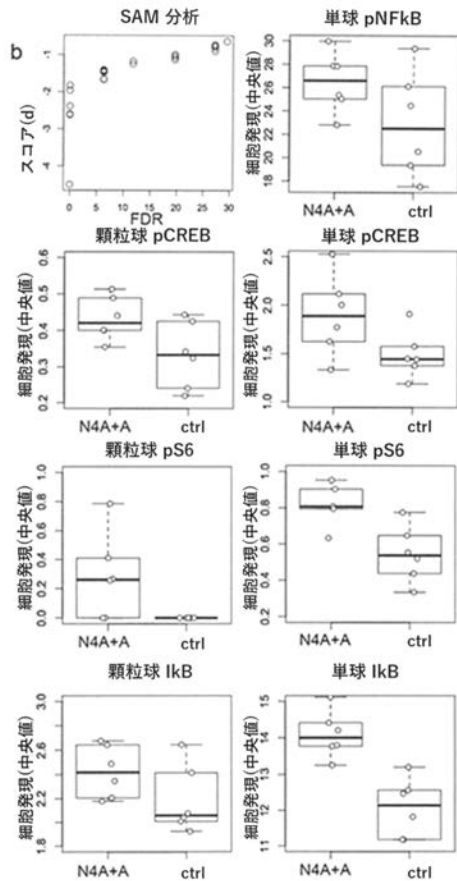
【 図 1 0 - 2 】



【 図 1 1 - 1 】



【図 1 1 - 2】



## 【配列表】

2019516086000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成30年11月29日(2018.11.29)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

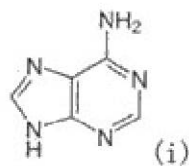
【補正の内容】

【0008】

本発明において用語「ヌクレオチド由来代謝物」はプリンまたはピリミジン、それぞれから由来の窒素塩基の2種類の群という意味である。これらの窒素塩基はリボース(リボヌクレオシド)またはデオキシリボース(デオキシリボヌクレオシド)に結合しても結合しなくても良い。

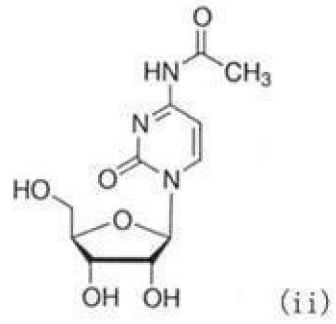
とりわけアデニンは下記の式(i)で表されるプリン誘導体である：

【化1】



とりわけN4 アセチルシチジンは下記の式(ii)で表されるリボースに結合しているピリミジン誘導体である：

【化 2】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2017/057469
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/68 G01N33/50 ADD.		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
<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	WO 2010/126146 A1 (TANAKA NORIAKI [JP]; KOHNO MASAHIRO [JP]; SATO EMIKO [JP]; FUJIWARA KO) 4 November 2010 (2010-11-04) abstract, paragraphs [0001], [0012], [0071], [0080], [0087] and [0088]. -----	1-3, 5-10,12, 14,15
X	US 2012/122243 A1 (KAMLAGE BEATE [DE] ET AL) 17 May 2012 (2012-05-17) claims 27-42 ----- -/--	1-3, 5-10,12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier 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 5 May 2017		Date of mailing of the international search report 18/05/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Lindberg, Pia

1

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/057469

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	L. NGUY ET AL: "Vascular function in rats with adenine-induced chronic renal failure", AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: REGULATORY, INTEGRATIVE AND COMPARATIVE PHYSIOLOGY., vol. 302, no. 12, 15 June 2012 (2012-06-15), pages R1426-R1435, XP055284978, US ISSN: 0363-6119, DOI: 10.1152/ajpregu.00696.2011 abstract, page R1426, bridging passage on pages R1428-R1429, page R1430 right-hand column, 1st full paragraph, section "discussion " on pages R1431 and R1432, figure 2. -----	1,2,4, 6-9,11
A	US 2015/011019 A1 (BRAHMBHATT VIRAL [CH] ET AL) 8 January 2015 (2015-01-08) the whole document -----	1-15
A	SILVIA LUCENA LAGE ET AL: "Emerging concepts about NAIP/NLRC4 inflammasomes", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 5, 2 July 2014 (2014-07-02), pages 1-10, XP055285089, DOI: 10.1126/scitranslmed.3002868 the whole document -----	1-15
A	SI MING MAN ET AL: "Regulation of inflammasome activation", IMMUNOLOGICAL REVIEWS., vol. 265, no. 1, 16 April 2015 (2015-04-16), pages 6-21, XP055284991, US ISSN: 0105-2896, DOI: 10.1111/imr.12296 page 8 - page 10 -----	1-15
A	C. FRANCESCHI ET AL: "Chronic Inflammation (Inflammaging) and Its Potential Contribution to Age-Associated Diseases", JOURNALS OF GERONTOLOGY, SERIES A, BIOLOGICAL SCIENCES ANDMEDICAL SCIENCES, vol. 69, no. Suppl 1, 14 May 2014 (2014-05-14), pages S4-S9, XP055285093, US ISSN: 1079-5006, DOI: 10.1093/gerona/glu057 the whole document -----	1-15

1

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/057469

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010126146 A1	04-11-2010	JP 5197846 B2 WO 2010126146 A1	15-05-2013 04-11-2010
US 2012122243 A1	17-05-2012	CA 2764049 A1 CN 102483416 A DE 112010002253 T5 EP 2438445 A1 EP 2804001 A2 ES 2516866 T3 JP 5933432 B2 JP 2012529021 A JP 2016153808 A US 2012122243 A1 WO 2010139711 A1	09-12-2010 30-05-2012 03-01-2013 11-04-2012 19-11-2014 31-10-2014 08-06-2016 15-11-2012 25-08-2016 17-05-2012 09-12-2010
US 2015011019 A1	08-01-2015	CN 104246507 A EP 2645105 A1 EP 2831594 A1 JP 2015513099 A US 2015011019 A1 WO 2013143839 A1	24-12-2014 02-10-2013 04-02-2015 30-04-2015 08-01-2015 03-10-2013

## フロントページの続き

(81)指定国 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, 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, TZ

(74)代理人 100065248  
弁理士 野河 信太郎

(74)代理人 100159385  
弁理士 甲斐 伸二

(74)代理人 100163407  
弁理士 金子 裕輔

(74)代理人 100166936  
弁理士 稲本 潔

(74)代理人 100174883  
弁理士 富田 雅己

(72)発明者 フォースタン, ベンジャミン  
フランス、33600 ペサック、アベニュー ド ジュネーヴ、2

Fターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA25 AA28 AA29 AA40 BA08 BA13 BB10 BB20  
BB37 CA12 CA18 CA20 CA21 CA25 CA26 CB01 CB03 CB17  
CB21 CB26 DA13 DA14 DA36 FA11 FA34 FB01 FB02 FB03  
FB12 GC15 JA01  
4B063 QA01 QA18 QQ03 QR42 QS10

专利名称(译)	用于诊断炎症相关疾病的生物标志物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2019516086A</a>	公开(公告)日	2019-06-13
申请号	JP2018551248	申请日	2017-03-29
[标]申请(专利权)人(译)	单威赛引用和波尔多 波尔多大学 法国国家科学研究中心		
申请(专利权)人(译)	Université de Bordeaux 中心法国国家科学青		
发明人	フォースタン,ベンジャミン		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/50 G01N33/15 C12Q1/02		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/5038 G01N33/5308 G01N33/6893 G01N2800/32 G01N2800/321 G01N2800/52 G01N2800/7009 G01N2800/7042 G01N2800/7095		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.M G01N33/50.Z G01N33/15.Z C12Q1/02		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA25 2G045/AA28 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA08 2G045/BA13 2G045/BB10 2G045/BB20 2G045/BB37 2G045/CA12 2G045/CA18 2G045/CA20 2G045/CA21 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB03 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/CB26 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FA11 2G045/FA34 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045/GC15 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ03 4B063/QR42 4B063/QS10		
代理人(译)	清稻本潤一 富田雅美		
优先权	2016305403 2016-04-06 EP		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及用于诊断炎症相关疾病的生物标志物。 [选图]图6

