

(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2010-524432
(P2010-524432A)

(43) 公表日 平成22年7月22日(2010.7.22)

(51) Int.Cl.

C 12 Q 1/68 (2006.01)
 G 01 N 33/53 (2006.01)
 A 61 K 45/00 (2006.01)
 A 61 P 3/10 (2006.01)
 A 61 P 3/04 (2006.01)

F 1

C 12 Q 1/68
 G 01 N 33/53
 A 61 K 45/00
 A 61 P 3/10
 A 61 P 3/04

A
 Z N A M
 A 61 K
 A 61 P
 A 61 P

テーマコード(参考)

2 G 04 5
 4 B 02 4
 4 B 06 3
 4 C 08 4

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-554564 (P2009-554564)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月19日 (2008.3.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年11月6日 (2009.11.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/003605
 (87) 国際公開番号 WO2008/115518
 (87) 国際公開日 平成20年9月25日 (2008.9.25)
 (31) 優先権主張番号 60/918,735
 (32) 優先日 平成19年3月19日 (2007.3.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(71) 出願人 507239341
 サーティス ファーマシューティカルズ,
 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02
 139, ケンブリッジ, テクノロジー
 スクエア 200, スイート 300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】サーチュイン活性のバイオマーカーおよびその使用方法

(57) 【要約】

例えばサーチュイン変調化合物での治療的処置の間の対象におけるサーチュイン変調をモニタリングする方法が提供される。その方法は、対象からの生物学的試料における1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を伴う。1つ以上のサーチュインバイオマーカーを用いてサーチュインタンパク質の活性を変調する化合物を同定するための方法もまた提供される。一つの実施形態において、対象におけるサーチュイン活性を決定するための方法が提供される。かかる方法を診断および予後診断適用に使用できる。例えば、サーチュイン変調化合物での治療的処置中を含む、対象におけるサーチュイン変調をモニタリングするための方法もまた提供される。サーチュインタンパク質の活性を変調する化合物を同定するための方法もまた提供される。

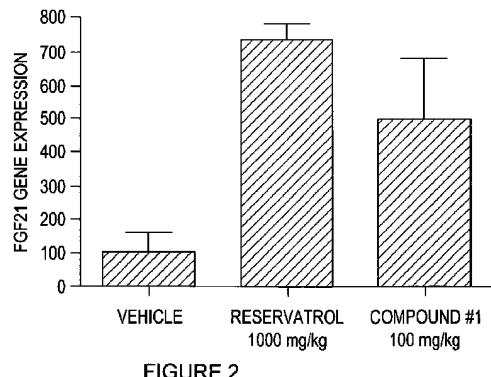


FIGURE 2

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象におけるサーチュイン変調を検出する方法であって、該方法は該対象からの生物学的試料における、少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較した該サーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化が、サーチュイン変調の指標である方法。

【請求項 2】

前記サーチュイン変調が、サーチュイン活性化である請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記対象が、加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパチー、虚血イベントに関連するニューロパチー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、または潮紅に関する疾患または障害を患っている請求項1または2に記載の方法。10

【請求項 4】

前記サーチュイン変調が、サーチュイン阻害である請求項1に記載の方法。

【請求項 5】

前記対象が、食欲刺激または体重増加を必要とする請求項1または4に記載の方法。

【請求項 6】

前記サーチュインバイオマーカーが、表1に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーである請求項1に記載の方法。20

【請求項 7】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：M C P - 1、B M P 受容体 1 A、S m p d 1 3 a、C D 1 4、A p o E、F A S、トランスサイレチン、F A B P 1、アシル - C o A チオエステラーゼ1、アシル - C o A チオエステラーゼ2、アクアポリン4、R r a d、C X C L 9、C C L 8、P p p 1 r 3 g、A p o A - I、A p o A - I I またはA p o B のうちの少なくとも1つである請求項6に記載の方法。

【請求項 8】

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1 である請求項7に記載の方法。

【請求項 9】

前記サーチュインバイオマーカーの発現レベルが、該サーチュインバイオマーカーのm R N A レベル、該サーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルまたは該サーチュインバイオマーカーの活性を測定することにより決定される請求項1に記載の方法。30

【請求項 10】

前記サーチュインバイオマーカーのm R N A レベルが、マイクロアレイまたはP C R を用いて測定される請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記サーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルが、該サーチュインバイオマーカーに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて測定される請求項9に記載の方法。

【請求項 12】

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1 である請求項9に記載の方法。40

【請求項 13】

対照と比較して、前記M C P - 1 の発現レベルの低下が、サーチュイン活性化の指標である請求項8または12に記載の方法。

【請求項 14】

前記対象が、哺乳動物である請求項1に記載の方法。

【請求項 15】

前記哺乳動物が、ヒトである請求項14に記載の方法。

【請求項 16】

前記対象が未処置対象、処置の前の対象、処置の間の初期の時点の対象、またはデータベ50

ース参照である請求項 1 または 13 に記載の方法。

【請求項 17】

前記生物学的試料が血液、血漿、尿、血清、唾液、細胞、組織または毛髪を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】

サーチュインモジュレーターでの治療的処置をモニタリングする方法であって、サーチュインモジュレーターで処置されている対象からの生物学的試料における、少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を含む方法。

【請求項 19】

前記対象が、哺乳動物である請求項 18 に記載の方法。 10

【請求項 20】

前記哺乳動物が、ヒトである請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記生物学的試料が、血液、血漿、尿、血清、唾液、細胞、組織または毛髪を含む請求項 18 に記載の方法。

【請求項 22】

前記サーチュインモジュレーターが、サーチュイン活性化化合物である請求項 18 に記載の方法。 20

【請求項 23】

前記対象が、加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパチー、虚血イベントに関連するニューロパチー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、または潮紅に関する疾患または障害を患っている請求項 18 または 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記サーチュインモジュレーターが、サーチュイン阻害化合物である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

前記対象が、食欲刺激または体重増加を必要とする請求項 18 または 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記サーチュインモジュレーターでの処置時のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化が、前記対象における治療的サーチュイン変調の指標である請求項 18 に記載の方法。 30

【請求項 27】

前記サーチュインバイオマーカーが、表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーである請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：MCP-1、BMP 受容体 1A、Smpd1 3a、CD14、apoE、FAS、トランスサイレチン、FABP1、アシル-CoA チオエステラーゼ 1、アシル-CoA チオエステラーゼ 2、アクアポリン 4、Rrad、CXCL9、CCL8、PP1r3g、apoA-I、apoA-II または apoB のうちの少なくとも 1 つである請求項 27 に記載の方法。 40

【請求項 29】

前記サーチュインバイオマーカーが、MCP-1 である請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記サーチュインバイオマーカーの発現レベルが、該サーチュインバイオマーカーの mRNA レベル、該サーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルまたは該サーチュインバイオマーカーの活性を測定することにより決定される請求項 18 または 26 に記載の方法。

【請求項 31】

前記サーチュインバイオマーカーの mRNA レベルが、マイクロアレイまたは PCR を用

50

いて測定される請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記サーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルが、該サーチュインバイオマーカーに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントを用いて測定される請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1 である請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記サーチュインモジュレーターでの処置時のM C P - 1 の発現レベルの低下が、治療的サーチュイン活性化の指標である請求項 2 9 または 3 3 に記載の方法。 10

【請求項 3 5】

前記生物学的試料におけるサーチュインバイオマーカーの発現レベルが、対照と比較される請求項 2 6 または 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記対照が、未処置対象、処置の前の対象、処置の間の初期の時点の対象、またはデータベース参照である請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

サーチュインモジュレーターでの治療的処置の進展をモニタリングする方法であって、該方法は、

a) サーチュインモジュレーターを対象に投与する工程； 20

b) 該対象から生物学的試料を得る工程；および

c) 該生物学的試料中の少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程；

を含み、対照と比較して、該生物学的試料におけるサーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルが、該対象における治療的サーチュイン変調の指標である方法。

【請求項 3 8】

前記サーチュインモジュレーターを対象に時間をかけて少なくとも 2 回投与し、1 つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを、投与の経過中に 2 回またはそれより多い時点で決定する請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記サーチュインバイオマーカーが、表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーである請求項 3 7 に記載の方法。 30

【請求項 4 0】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：M C P - 1 、B M P 受容体 1 A 、S m p d 1 3 a 、C D 1 4 、A p o E 、F A S 、トランスサイレチン、F A B P 1 、アシル - C o A チオエステラーゼ 1 、アシル - C o A チオエステラーゼ 2 、アクアボリン 4 、R r a d 、C X C L 9 、C C L 8 、P p p 1 r 3 g 、A p o A - I 、A p o A - I I または A p o B のうちの少なくとも 1 つである請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1 である請求項 4 0 に記載の方法。 40

【請求項 4 2】

対照と比較して、前記M C P - 1 発現レベルの低下がサーチュイン活性化の指標である請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する方法であって、該対象からの生物学的試料における少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較して、該サーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルが、サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象の指標である方法。

【請求項 4 4】

10

20

30

40

50

前記サーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルが、サーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受する対象の指標である請求項43に記載の方法。

【請求項45】

前記サーチュインバイオマーカーが、表1に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーである請求項43に記載の方法。

【請求項46】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：MCP-1、BMP受容体1A、Smpd1
3a、CD14、Apoe、FAS、トランスサイレチン、FABP1、アシル-CoA
チオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rrad、
CXCL9、CCL8、Ppp1r3g、Apoa-I、Apoa-IIまたはApob
のうちの少なくとも1つである請求項45に記載の方法。 10

【請求項47】

前記サーチュインバイオマーカーが、MCP-1である請求項46に記載の方法。

【請求項48】

対照と比較して、MCP-1の発現レベルの増大が、サーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受する対象の指標である請求項47に記載の方法。

【請求項49】

サーチュイン媒介疾患または障害を発症する対象の危険性を評価する方法であって、該方法は、該対象からの生物学的試料における少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較して、該サーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルが、サーチュイン媒介疾患または障害を発症する危険性のある対象の指標である方法。 20

【請求項50】

前記サーチュインバイオマーカーが、表1に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーである請求項49に記載の方法。

【請求項51】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：MCP-1、BMP受容体1A、Smpd1
3a、CD14、Apoe、FAS、トランスサイレチン、FABP1、アシル-CoA
チオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rrad、
CXCL9、CCL8、Ppp1r3g、Apoa-I、Apoa-IIまたはApob
のうちの少なくとも1つである請求項50に記載の方法。 30

【請求項52】

前記サーチュインバイオマーカーが、MCP-1である請求項51に記載の方法。

【請求項53】

サーチュイン活性を変調する化合物を同定する方法であって、該方法は、

- a) サーチュインタンパク質を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程；および
- b) 該細胞における少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程；

を含み、対照と比較して、該被験化合物の存在下での該サーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化が、サーチュイン活性を変調する化合物の指標である方法。 40

【請求項54】

前記サーチュインバイオマーカーが、表1に列挙される少なくとも1つのバイオマーカーである請求項53に記載の方法。

【請求項55】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：MCP-1、BMP受容体1A、Smpd1
3a、CD14、Apoe、FAS、トランスサイレチン、FABP1、アシル-CoA
チオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rrad、
CXCL9、CCL8、Ppp1r3g、Apoa-I、Apoa-IIまたはApob
のうちの少なくとも1つである請求項54に記載の方法。

【請求項56】

10

20

30

40

50

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1である請求項 5 5に記載の方法。

【請求項 5 7】

対象におけるサーチュイン媒介疾患または障害を処置する方法であって、

a) サーチュイン変調化合物を該対象に投与する工程；および

b) 少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを時間をかけてモニタリングして該対象における処置の経過が改変されたかどうかを決定する工程；
を含む方法。

【請求項 5 8】

前記サーチュイン変調化合物の投与の前に、少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定してサーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する工程をさらに含む請求項 5 7 に記載の方法。 10

【請求項 5 9】

前記サーチュインバイオマーカーが、表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーである請求項 5 7 または 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：M C P - 1、B M P 受容体 1 A、S m p d 1 3 a、C D 1 4、A p o E、F A S、トランスサイレチン、F A B P 1、アシル - C o A チオエステラーゼ 1、アシル - C o A チオエステラーゼ 2、アクアポリン 4、R r a d、C X C L 9、C C L 8、P p p 1 r 3 g、A p o A - I、A p o A - I I または A p o B のうちの少なくとも 1 つである請求項 5 9 に記載の方法。 20

【請求項 6 1】

前記サーチュインバイオマーカーが、M C P - 1 である請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

サーチュインバイオマーカーの発現レベルを検出するためのキットであって、サーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定するための少なくとも 1 つの成分および少なくとも 1 つのサーチュイン変調化合物を含むキット。

【請求項 6 3】

前記サーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定するための成分が、以下：該サーチュインバイオマーカーに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント、サーチュインバイオマーカー-m R N A を特異的に増幅するP C R ブライマーのセットまたはポリヌクレオチド配列の少なくとも 1 つのフラグメントに結合したサーチュインバイオマーカーをコードする該少なくとも 1 つのフラグメントを含む固体支持体；のうちの少なくとも 1 つである請求項 6 2 に記載のキット。 30

【請求項 6 4】

以下：検出標識、バッファーまたは使用のための説明書；のうちの 1 つ以上をさらに含む請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 5】

サーチュインタンパク質を発現する細胞系をさらに含む請求項 6 2 に記載のキット。

【請求項 6 6】

生物学的試料中のサーチュイン活性のレベルを決定する方法であって、該生物学的試料中の少なくとも 1 つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する工程を含む方法。 40

【請求項 6 7】

対象におけるサーチュイン変調を検出する方法であって、該方法は、該対象からの生物学的試料におけるF G F 2 1 の発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較して、該F G F 2 1 の発現レベルの変化がサーチュイン変調の指標である方法。

【請求項 6 8】

サーチュインモジュレーターでの治療的処置をモニタリングするための方法であって、該方法は、サーチュインモジュレーターで処置されている対象からの生物学的試料におけるF G F 2 1 の発現レベルを決定する工程を含み、ここで該サーチュインモジュレーターで 50

の処置時の F G F 2 1 の発現レベルの変化が該対象における治療的サーチュイン変調の指標である方法。

【請求項 6 9】

サーチュインモジュレーターでの治療的処置の進展をモニタリングする方法であって、該方法は、

a) サーチュインモジュレーターを対象に投与する工程；

b) 該対象から生物学的試料を得る工程；および

c) 該生物学的試料における F G F 2 1 の発現レベルを決定する工程；

を含み、対照と比較して、該生物学的試料における F G F 2 1 の改変された発現レベルが、該対象における治療的サーチュイン変調の指標である方法。

10

【請求項 7 0】

サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する方法であって、該方法は、該対象からの生物学的試料における F G F 2 1 の発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較して、F G F 2 1 の改変された発現レベルが、サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象の指標である方法。

【請求項 7 1】

サーチュイン媒介疾患または障害を発症する対象の危険性を評価する方法であって、該方法は、該対象からの生物学的試料における F G F 2 1 の発現レベルを決定する工程を含み、対照と比較して、F G F 2 1 の改変された発現レベルが、サーチュイン媒介疾患または障害を発症する危険性のある対象の指標である方法。

20

【請求項 7 2】

サーチュイン活性を変調する化合物を同定する方法であって、該方法は、

a) サーチュインタンパク質を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程；および

b) 該細胞における F G F 2 1 の発現レベルを決定する工程；

を含み、対照と比較して、該被験化合物の存在下での F G F 2 1 の発現レベルの変化が、サーチュイン活性を変調する化合物の指標である方法。

【請求項 7 3】

対象におけるサーチュイン媒介疾患または障害を処置するための方法であって、

a) サーチュイン変調化合物を該対象に投与する工程；および

b) F G F 2 1 の発現レベルを経時的にモニタリングして該対象における処置の経過が改変されたかどうかを決定する工程；

を含む方法。

30

【請求項 7 4】

前記サーチュイン変調化合物の投与の前に F G F 2 1 の発現レベルを決定して、該サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する工程をさらに含む請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記細胞が、組織培養細胞である請求項 5 3 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記細胞が、サーチュインタンパク質を過剰発現する請求項 5 3 または 7 2 に記載の方法。

40

【請求項 7 7】

前記サーチュインタンパク質が、S I R T 1 である請求項 5 3 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 8】

少なくとも 1 つのさらなるサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定またはモニタリングする工程をさらに含む請求項 6 7 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 9】

前記サーチュインバイオマーカーが、表 1 に列挙される少なくとも 1 つのバイオマーカーである請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

50

前記サーチュインバイオマーカーが、以下：M C P - 1、B M P 受容体 1 A、S m p d 1 3 a、C D 1 4、A p o E、F A S、トランスサイレチン、F A B P 1、アシル - C o A チオエステラーゼ 1、アシル - C o A チオエステラーゼ 2、アクアポリン 4、R r a d、C X C L 9、C C L 8、P p p 1 r 3 g、A p o A - I、A p o A - I I または A p o B のうちの少なくとも 1 つである請求項 7 9 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記 F G F 2 1 の発現レベルにおける増大が、サーチュイン活性化の指標である請求項 6 7 ~ 6 9 または 7 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 2】

前記サーチュイン変調が、サーチュイン活性化である請求項 6 7 ~ 6 9 のいずれかに記載の方法。 10

【請求項 8 3】

前記サーチュインモジュレーターまたはサーチュイン変調化合物が、サーチュイン活性化化合物である請求項 6 8 ~ 7 0、7 2 または 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 4】

前記対象が、加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパチー、虚血イベントに関連するニューロパチー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、または潮紅に関する疾患または障害を患っている請求項 6 7 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8 5】

前記対象が、哺乳動物である請求項 6 7 ~ 7 3 のいずれかに記載の方法。 20

【請求項 8 6】

前記哺乳動物が、ヒトである請求項 8 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(関連出願)

本願は、2007年3月19日に出願された米国仮特許出願第 6 0 / 9 1 8 , 7 3 5 号への優先権の利益を主張し、この米国仮特許出願の全体は、本明細書中に参考として援用される。 30

【背景技術】

【0 0 0 2】

(背景)

加齢は、2型糖尿、癌、心血管性、代謝性および神経変性疾患を含む種々の主要な疾患に関する主要な危険性因子である。カロリー摂取の制限（カロリー制限）のような寿命を延ばす操作は、これらの代謝変化を防御または遅延させ、様々な生物における多くの疾患に対する抵抗性を付与することができる（非特許文献 1）。さらに最近では、無脊椎動物およびげっ歯類における加齢を変調させる具体的な遺伝的経路が同定されている（非特許文献 2）。これらの経路内の単一遺伝子における変化によって、劇的な寿命の増大が引き起こされることが可能となり、、これらの長期間生存生物は、加齢性疾患にかかりにくい。寿命を調節する多くの遺伝子は、進化的に保存されている。 40

【0 0 0 3】

遺伝子のサイレント情報調節因子（S I R）ファミリー（またはサーチュイン）は、古細菌から種々の真核生物におよぶ生物のゲノムに存在する遺伝子の高度に保存された群を表す。コードされた S I R タンパク質は、遺伝子サイレンシングの調節から D N A 修復までの多様な過程に関与する。S I R 遺伝子ファミリーのメンバーによりコードされるタンパク質は、250 アミノ酸コアドメインにおける高度な配列保存を示す。このファミリーにおける十分に特徴付けされた遺伝子は、出芽酵母（S . C e r e v i s i a e ）S I R 2 であり、これは酵母接合型、テロメア位置効果および細胞加齢を特定する情報を含有する H M 遺伝子座のサイレンシングに関与する。酵母 S i r 2 タンパク質は、ヒストンデア

セチラーゼのファミリーに属する。ネズミチフス菌 (*Salmonella typhi murium*) における Sir 2 相同体、Cob B は、NAD (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) 依存性 ADPリボシルトランスフェラーゼとして機能する。

【0004】

Sir 2タンパク質は、補助基質としてNADを用いるクラスI I I デアセチラーゼである。その他のデアセチラーゼとは異なり、その多くが遺伝子サイレンシングに関与する Sir 2 は、トリコスタチンA (TSA) のようにクラスIおよびI I ヒストンデアセチラーゼ阻害剤に対して感受性が低い。

【0005】

Sir 2によるアセチル-リジンの脱アセチル化は、ニコチンアミドおよび新規アセチルADPリボース化合物を生成するNAD加水分解に緊密に共役する。Sir 2のNAD依存性デアセチラーゼ活性は、酵母においてその生物学的役割を細胞代謝と結びつけることができる機能に必須である。哺乳動物 Sir 2 相同体は NAD 依存性ヒストンデアセチラーゼ活性を有する。Sir 2 媒介機能についてのほとんどの情報は、酵母における研究によってもたらされる。

【0006】

生化学的研究により、Sir 2 はヒストン H 3 および H 4 のアミノ末端尾部を容易に脱アセチル化することができ、その結果 1-O-アセチルADPリボースおよびニコチンアミドの形成に至る。SIR 2 のさらなるコピーを有する株は、rDNAサイレンシングの増大および 30 % の寿命延長を示す。最近では、線虫 (*C. elegans*) SIR 2 相同体、*sir-2.1* およびキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) dSir 2 遺伝子のさらなるコピーがこれらの生物における寿命を大きく延ばすことが示されている。これは加齢に関する SIR 2 依存性調節経路が進化の初期に生じ、よく保存されていることを意味する。今日では、Sir 2 遺伝子は、生物の健康およびストレス抵抗性を強化するように進化して、逆境を生き抜く機会を増やすと考えられている。

【0007】

70歳を超えてのカロリー制限は、哺乳動物の健康を改善し、寿命を延ばすことが分かっている。後生動物の寿命と同様、酵母の寿命もまた低グルコースのようなカロリー制限に類似する介入により延長される。SIR 2 遺伝子を欠如する酵母およびハエの双方は、カロリーを制限された場合に長くは生存しないという発見により、SIR 2 遺伝子がこの食事療法の有利な健康効果を媒介するという証拠が提供される。さらに、酵母グルコース応答性 cAMP (アデノシン 3' , 5' - リン酸) 依存性 (PKA) 経路の活性を低減させる変異は、野生型細胞において寿命を延ばすが、変異体 sir 2 株では、SIR 2 がカロリー制限経路の重要な下流構成成分である可能性があることを実証する。

【0008】

最近では、SIR タンパク質の多くの小型分子活性化因子および阻害剤が報告されており (例えば特許文献 1 および特許文献 2 、ならびに PCT 公開特許文献 3 および特許文献 4 参照) 、これらの化合物に関する多くの使用が同定されている。例えば SIR タンパク質の小型分子活性化因子は、酵母および培養ヒト細胞において寿命を延ばし、ヒト細胞における SIR タンパク質活性を活性化することが示された (前出) 。加えて、線虫 (*C. elegans*) およびキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において小型分子 SIR 活性化因子はカロリー制限を模倣し、寿命を延ばすことが示された (前出) 。したがって、SIR タンパク質の活性化因子は、真核細胞におけるカロリー制限の効果を擬似し、卒中発作、心血管疾患、関節炎、高血圧またはアルツハイマー病のような加齢性疾患を処置するのに有用であり得る (前出) 。加えて、SIR タンパク質の小型分子活性化因子、レスベラトロール、ブテイン、フィセチン、ピセアタンノールおよびクエルセチンは、線虫 (*C. elegans*) における脂肪動員を促進し、線虫 (*C. elegans*) における脂肪蓄積を防御し、哺乳動物細胞における脂肪動員を刺激し、哺乳動物細胞における脂質生成を阻害することが示されている (例えば特許文献 5 および PCT 公開特許文献 6 参照) 。同様に SIR

10

20

30

40

50

タンパク質の阻害剤、ニコチニアミドは脂肪蓄積を促進することが示された（前出）。加えて、レスベラトロールは、インスリン抵抗性細胞において少なくとも部分的にインスリン感受性を回復させることができた（前出）。したがって、SIRTタンパク質の活性化因子は、インスリン抵抗性障害を処置または防御するのにも有用であり得て、体重減少または体重増加の防御に関する使用が示唆されている（前出）。

【0009】

酵母Sir2のヒトオルソログ（サイレント接合型情報調節2）、SIRT1はNAD⁺依存性デアセチラーゼである。SIRT1タンパク質は、核に局在し、非常に多くのタンパク質と相互作用し、脱アセチル化する。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】米国特許出願公開第2005/0136537号明細書

【特許文献2】米国特許出願公開第2005/0096256号明細書

【特許文献3】国際公開第2005/002555号パンフレット

【特許文献4】国際公開第2005/002672号パンフレット

【特許文献5】米国特許公開第2005/0171027号明細書

【特許文献6】国際公開第2005/065667号パンフレット

【非特許文献】

【0011】

20

【非特許文献1】Curtisら、Nature Reviews Drug Discovery. 4:569-578 (2005)

【非特許文献2】Kenyon, C.、Cell. 120:449-460 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

運悪く、サーチュインタンパク質の活性を増大させる治療薬のインビオ効果をモニタリングするのは困難である。したがってインビオでサーチュイン活性を決定し、治療的介入時にサーチュイン変調をモニタリングするために使用できる新規サーチュインバイオマーカーが必要とされる。

30

【課題を解決するための手段】

【0013】

（要旨）

本明細書では、対象におけるサーチュイン活性を決定するための方法を提供する。かかる方法を診断および予後診断適用に使用できる。例えば、サーチュイン変調化合物での治療的処置中を含む、対象におけるサーチュイン変調をモニタリングするための方法もまた提供される。サーチュインタンパク質の活性を変調する化合物を同定するための方法もまた提供される。

【0014】

40

1つの態様では、本発明は、対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定する工程を含む、対象におけるサーチュインタンパク質の変調を検出するための方法を提供し、ここで対照と比較して1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は、対象におけるサーチュイン変調を示す。

【0015】

特定の実施態様では、サーチュイン変調は、サーチュイン活性化でよい。対象のサーチュイン活性のレベルが低い場合、またはサーチュイン活性における増大が対象に有利であろう場合に、サーチュイン活性化は有利であり得る。例えば、加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパシー、虚血イベントに関連するニューロパシー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、または潮紅に關

50

係する疾患または障害を患有対象はサーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受し得る。

【0016】

特定の実施態様では、サーチュイン変調は、サーチュイン阻害であり得る。対象のサーチュイン活性のレベルが高い場合、または対象がサーチュイン活性の低下を必要とする場合、サーチュイン阻害は、有利であり得る。例えば、食欲刺激または体重増加を必要とする対象は、サーチュイン阻害化合物での処置から利益を享受し得る。

【0017】

特定の実施態様では、表1にて示される少なくとも1、2、3、4、5、10またはそれより多いサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定できる。

10

【0018】

特定の実施態様では、以下のうちの少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する：MCP-1、BMP受容体1A、Smpd13a、CD14、Apoe、FAS、トランスサイレチン、FABP1（肝臓）、アシル-CoAチオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rrad、CXCL9、CCL8、Ppp1r3g、Apoa-I、Apoa-II、ApobまたはFGF21。特定の実施態様では、MCP-1の発現レベルを決定する。特定の実施態様では、FGF21の発現レベルを決定する。

【0019】

特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーのmRNAレベルを測定することにより、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する。特定の実施態様では、マイクロアレイチップを用いて1つ以上のサーチュインバイオマーカーのmRNAレベルを測定する。特定の実施態様では、PCR、例えば定量的リアルタイムPCRを用いて1つ以上のサーチュインバイオマーカーのmRNAレベルを測定する。

20

【0020】

特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルを測定することにより、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する。特定の実施態様では、抗体（例えばイムノプロッティング、ラジオイムノアッセイ、ELISA等）、質量分析またはゲル電気泳動を用いて1つ以上のサーチュインバイオマーカーのタンパク質レベルを決定する。

30

【0021】

特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの活性レベルを測定することにより、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する。

【0022】

特定の実施態様では、対照と比較して1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は、該対象における治療的サーチュイン変調の指標である。特定の実施態様では、対照と比較してMCP-1発現レベルの低下はサーチュイン活性化を示す。特定の実施態様では、対照と比較してFGF21発現レベルにおける増大はサーチュイン活性化を示す。

40

【0023】

特定の実施態様では、対照は未処置個体、処置前の対象、処置の間の初期の時点の対象、またはデータベース参照でよい。

【0024】

特定の実施態様では、生物学的試料は血液、尿、血清、唾液、細胞、組織および／または毛髪を含むことができる。

【0025】

特定の実施態様では、対象は、例えばヒトのような哺乳動物でよい。

【0026】

別の態様では、本発明は、サーチュインモジュレーターで処置されている対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベル

50

を決定する工程を含む、サーチュインモジュレーターでの治療的処置をモニタリングするための方法を提供し、ここで対照と比較して1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は対象における治療的サーチュイン変調を示す。

【0027】

特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターは、サーチュイン活性化化合物である。特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターは、サーチュイン阻害化合物である。

【0028】

特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターでの処置時のMCP-1の発現レベルにおける低下は、治療的サーチュイン活性化を示す。特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターでの処置時のFGF21の発現レベルにおける増大は、治療的サーチュイン活性化を示す。

10

【0029】

特定の実施態様では、その方法はさらに、例えばサーチュインモジュレーターの投与に応答した1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルに基づいて対象に投与されるサーチュインモジュレーターの用量を調整する工程を含むことができる。

【0030】

別の態様では、本発明は：(i)サーチュインモジュレーターを対象に投与する工程；(ii)該対象から生物学的試料入手する工程；および(iii)試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定する工程；を含む、サーチュインモジュレーターでの治療的処置の進展をモニタリングするための方法を提供し、ここで対照と比較して、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は、該対象における治療的サーチュイン変調を示す。

20

【0031】

特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターを対象に、経時的に少なくとも2回投与することができ、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを投与の経過中に2回またはそれより多い時点で決定する。

【0032】

別の態様では、本発明は、対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定する工程を含む、サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する方法を提供し、ここで対照と比較して、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルは対象がサーチュイン変調化合物での処置から利益を享受できることを示す。

30

【0033】

特定の実施態様では、対照と比較して、対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルは、治療的サーチュイン活性化を示す。特定の実施態様では、対照と比較してMCP-1の発現レベルにおける低下は治療的サーチュイン活性化を示す。特定の実施態様では、対照と比較してFGF21の発現レベルにおける増大は、治療的サーチュイン活性化を示す。

40

【0034】

別の態様では、本発明は、対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定する工程を含む、サーチュイン媒介疾患または障害を発症する対象の危険性を評価する方法を提供し、ここで対照と比較して、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの改変された発現レベルは、対象がサーチュイン媒介疾患または障害を発症する危険性のあることを示す。

【0035】

別の態様では、本発明は：(i)サーチュイン変調化合物を対象に投与する工程；および(ii)1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを経時にモニタリングして、対象における処置の経過が改変されたかどうかを決定する工程

50

;を含む、対象におけるサーチュイン媒介疾患または障害を処置するための方法を提供する。特定の実施態様では、その方法はさらにサーチュイン変調化合物の投与の前に1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定して、サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定する工程を含む。

【0036】

別の態様では、本発明は：(i) サーチュインタンパク質を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程；および(ii) 1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定する工程；を含む、サーチュインタンパク質を変調する化合物を同定するための方法を提供し、ここで対照と比較して、被験化合物の存在下で1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は、被験化合物がサーチュインタンパク質を変調することを示す。特定の実施態様では、細胞は、組織培養細胞でよい。特定の実施態様では、細胞は、SIRT1のようなサーチュインタンパク質を過剰発現できる。

10

【0037】

特定の実施態様では、サーチュインタンパク質を活性化する被験化合物を同定できる。その他の実施態様では、サーチュインタンパク質を阻害する被験化合物を同定できる。特定の実施態様では、被験化合物は小型分子である。

【0038】

特定の実施態様では、SIRT1のようなヒトサーチュインタンパク質のモジュレーターを同定できる。

20

【0039】

特定の実施態様では、表1にて示される少なくとも1、2、3、4、5、10またはそれより多いサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する。

【0040】

特定の実施態様では、以下のうち、少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定する：MCP-1、BMP受容体1A、Smad13a、CD14、APOE、FAS、トランスサイレチン、FABP1（肝臓）、アシル-CoAチオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rrad、CXCL9、CCL8、PPP1r3g、APOA-I、APOA-II、APOBまたはFGF21。特定の実施態様では、MCP-1の発現レベルを決定する。特定の実施態様では、FGF21の発現レベルを決定する。

30

【0041】

特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーのmRNA、タンパク質および/またはタンパク質活性レベルを測定することにより、1つ以上のバイオマーカーの発現レベルを決定する。

【0042】

特定の実施態様では、細胞は、ヒト細胞のような哺乳動物細胞である。細胞は、培養物中に懸濁された単離された細胞であるか、または非ヒト生物のような生物全体に存在し得る。

【0043】

特定の実施態様では、サーチュインタンパク質を変調する化合物を同定するための方法は、さらに以下のうちの1つ以上を含むことができる：(i) 多量の化合物もしくはその類似体の量を調製する工程；(ii) 動物における有効性および毒性に関して化合物もしくはその類似体の治療的プロファイリングを行う工程；(iii) 化合物もしくはその類似体を医薬用処方に処方する工程；(iv) 適当な動物毒性プロフィールを有する化合物もしくはその類似体の医薬製剤を製造する工程；または(v) 適当な動物毒性プロフィールを有する化合物もしくはその類似体の医薬製剤を医療機関に販売する工程。

40

【0044】

別の態様では、本発明は、1つ以上のサーチュインバイオマーカー（表1に例を示す）の発現レベルを決定するための少なくとも1つの構成成分および少なくとも1つのサーチュイン変調化合物を含む、サーチュインバイオマーカーの発現レベルを検出するためのキ

50

ットを提供する。

【0045】

特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベル決定するための構成成分は、サーチュインバイオマーカーに結合する抗体またはその抗原結合フラグメントである。特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベル決定するための構成成分は、サーチュインバイオマーカー-mRNAを特異的に増幅するPCRプライマーのセットである。特定の実施態様では、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベル決定するための構成成分は、そこに結合したサーチュインバイオマーカーをコードするポリヌクレオチド配列の少なくとも1つのフラグメントを含む固体支持体（例えばマイクロアレイチップ）である。

10

【0046】

特定の実施態様では、キットは、さらに以下のうちの1つ以上を含む：検出標識、バッファー、もしくは使用のための説明書、またはサーチュインタンパク質を発現する細胞系。

【0047】

別の態様では、本発明は、生物学的試料中の少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することを含む、生物学的試料中のサーチュイン活性のレベルを決定するための方法を提供する。

【0048】

本方法の実施には、特記しない場合、当業者の範囲内である細胞生物学、細胞培養、分子生物学、遺伝子導入生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学の従来技術を用いる。かかる技術は文献において十分に説明される。例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第2版、Sambrook、FritschおよびManiatis編(Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989)；DNA Cloning、IおよびII巻(D. N. Glover編、1985)；Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait編、1984)；Mullisら、米国特許第4683195号；Nucleic Acid Hybridization(B. D. HamesおよびS. J. Higgins編、1984)；Transcription And Translation(B. D. HamesおよびS. J. Higgins編、1984)；Culture Of Animal Cells(R. I. Freshney、Alan R. Liss, Inc.、1987)；Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press、1986)；B. Perbal、A Practical Guide To Molecular Cloning(1984)；論文、Methods In Enzymology(Academic Press, Inc.、ニューヨーク州)；Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J. H. MillerおよびM. P. Calos編、1987、Cold Spring Harbor Laboratory)；Methods In Enzymology、154および155巻(Wuら編)；Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(MayerおよびWalker編、Academic Press、ロンドン、1987)；Handbook Of Experimental Immunology、I - IV巻(D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、1986)；Manipulating the Mouse Embryo(Cold Spring Harbor Laboratory Press、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州、1986)を参照のこと。

20

30

40

【図面の簡単な説明】

【0049】

【図1-1】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビトロ研

50

究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-2】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-3】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-4】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

10

20

30

40

50

【図1-5】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。^{***}で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-6】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。^{***}で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-7】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。^{***}で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-8】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。^{***}で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが

10

20

30

40

50

増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-9】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図1-10】処置後に指示された時点で上方または下方のいずれかに2倍を超える発現の変化を実証するインビトロ研究（新たに単離されたヒトWBCを使用）およびインビボ研究（マウスモデルを使用）から同定されたサーチュインバイオマーカーの一覧を提供する表1を示す。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処置した。***で標識されたバイオマーカーは、その発現が双方の化合物での処置時に上方または下方に2倍を超えて変化したのみならず（すなわちマウス組織では化合物1およびレスベラトロール、またはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）、最も堅調な、または再現性のある応答を実証したものである。好みしいバイオマーカーはヒトWBC実験において実験の間中、低い変動性で最高の倍変化をしたか、またはマウスインビボ実験において目的の組織において最高の倍変化を実証したかのいずれかであった。「上方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが増大した；「下方」：処置時にバイオマーカーの発現レベルが低下した；「/」：変化はなかった；インビボマウス研究に関して2週の時点は実際にはの16日間であった。

【図2】1日あたりの指示された用量でレスベラトロールまたは化合物1で処置された動物の3日肝臓試料におけるFGF21発現を示す。y軸はFGF21 mRNAレベルを説明し、x軸は薬物なし（ベヒクル）、レスベラトロール（1000mg/kg）または化合物1（100mg/kg）で処置されたマウスに関する結果を表示する。

【図3】組織培養細胞におけるSIRT1の過剰発現に応答したFGF21遺伝子発現を描く。y軸は定量PCRにより決定されたFGF21 mRNAレベルを説明し、x軸はGFP発現対照プラスミド、SIRT1発現プラスミド1μgまたはSIRT1発現プラスミド5μgでトランスフェクトされた細胞に関する結果を表示する。

【発明を実施するための形態】

【0050】

1. 定義

本明細書で使用される際には、以下の用語および語句は以下に示す意味を有するものとする。特記しない場合、本明細書で使用される全ての技術的および科学的用語は、当業者に一般的に理解されるものと同一の意味を有する。

【0051】

単数形態「a」、「an」および「the」は、文脈が明らかに特に指図しない限り、複数の意味を含む。

【0052】

「含む（comprise）」および「含む（comprising）」なる用語はさらなる要素が含まれ得る、包括的な、開放的な感覚の意味で用いられる。

【0053】

「発現レベル」なる用語は、サーチュインバイオマーカーに関連して用いられる場合、

10

20

30

40

50

遺伝子転写物蓄積、タンパク質蓄積またはバイオマーカーの検出可能な生物学的活性のような、バイオマーカーの遺伝子またはタンパク質発現データに反映されるか、またはそれから導き出せる量を指す

「含む」なる用語は、「限定するものではないが含むこと」を意味するために用いられる。「含む」および「限定するものではないが含むこと」は互換的に用いられる。

【0054】

「哺乳動物」なる用語は当該分野において公知であり、代表的な哺乳動物には、ヒト、靈長類、家畜動物（ウシ、ブタ等を含む）、愛玩動物（例えばイヌ、ネコ等）およびげっ歯類（例えばマウスおよびラット）が含まれる。

【0055】

「変調する」または「変調」なる用語は、サーチュインタンパク質の活性に関連して用いられる場合、上方調節（例えば活性化または刺激）、下方調節（例えば阻害または抑制）またはサーチュインタンパク質の少なくとも1つの活性の質におけるその他の変化を指す。

【0056】

「サーチュイン活性化化合物」は、サーチュインタンパク質のレベルを増大させる、および／またはサーチュインタンパク質の少なくとも1つの活性を増大させる化合物を指す。サーチュイン活性化化合物は、サーチュインタンパク質のレベルを増大させる、および／またはサーチュインタンパク質の少なくとも1つの活性を増大させる化合物を指す。1つの代表的な実施態様では、サーチュイン活性化化合物は、少なくとも約10%、25%、50%、75%、100%以上のサーチュインタンパク質の少なくとも1つの生物学的活性を増大させることができる。代表的なサーチュインタンパク質の生物学的活性には、サーチュイン基質の脱アセチル化（例えばヒストンまたはp53のような、例えばアセチル化ポリペプチドの脱アセチル化）、寿命の延長、ゲノム安定性の増大、転写のサイレンシング、母細胞と娘細胞の間の酸化型タンパク質の分離の制御、または少なくとも1つのサーチュインバイオマーカー（例えばMCP-1のような、例えば表1に示される遺伝子）の発現レベルの変調が含まれる。サーチュイン活性化化合物の代表例には、フラボン系、スチルベン系、フラバノン系、イソフラバノン系、カテキン系、カルコン系、タンニン系およびアントシアニジン系が含まれる。スチルベン系の代表例には、トリヒドロキシスチルベン系のようなヒドロキシスチルベン系、例えば3',5',4'-トリヒドロキシスチルベン（「レスベラトロール」）が含まれる。レスベラトロールは3',4',5'-スチルベントリオールとしても公知である。テトラヒドロキシスチルベン系、例えばピセアタンノールもまた包含される。イソリキリチゲニンのようなトリヒドロキシカロンおよびブテンのようなテトラヒドロキシカロンを含むヒドロキシカロンを使用することもできる。フィセチンのようなテトラヒドロキシフラボン系およびクエルセチンのようなペンタヒドロキシフラボン系を含むヒドロキシフラボン系を使用することもできる。その他のサーチュイン活性化化合物は、米国特許出願公開第2005/0096256号およびPCT出願第PCT/US06/002092号、同第PCT/US06/007746号、同第PCT/US06/007744号、同第PCT/US06/007745号、同第PCT/US06/007778号、同第PCT/US06/007656号、同第PCT/US06/007655号および同第PCT/US06/007773号に記載される。

【0057】

「サーチュイン阻害化合物」は、サーチュインタンパク質のレベルを低下させる、および／またはサーチュインタンパク質の少なくとも1つの活性を低下させる化合物を指す。1つの代表的な実施態様では、サーチュイン阻害化合物は少なくとも約10%、25%、50%、75%、100%以上のサーチュインタンパク質の少なくとも1つの生物学的活性を低下させることができる。代表的なサーチュインタンパク質の生物学的活性には、サーチュイン基質の脱アセチル化（例えばヒストンまたはp53のような、例えばアセチル化ポリペプチドの脱アセチル化）、寿命の延長、ゲノム安定性の増大、転写サイレンシング、母細胞と娘細胞の間の酸化型タンパク質の分離の制御、または少なくとも1つのサー

10

20

30

40

50

チュインバイオマーカー（例えばM C P - 1のような、例えば表1に示される遺伝子）の発現レベルの変調が含まれる。サーチュイン阻害剤の代表例には、例えばシルチノールおよびその類似体（例えばNapperら、J. Med. Chem. 48 : 8045 - 54 (2005)）、ニコチンアミド（NAD⁺）ならびにスラミンおよびその類似体が含まれる。その他のサーチュイン阻害化合物は米国特許出願公開第2005/0096256号、PCT公開WO第2005/002527号およびPCT出願第PCT/US06/007746号、同第PCT/US06/007744号、同第PCT/US06/007745号、同第PCT/US06/007778号、同第PCT/US06/007655号、同第PCT/US06/007773号および同第PCT/US06/007742号に記載される。

10

【0058】

「サーチュイン変調化合物」は、サーチュインタンパク質の機能的特性または生物学的活性を上方調節する（例えば活性化または刺激する）、下方調節する（例えば阻害または抑制する）か、あるいは、変化させるかのいずれかができる化合物を指す。サーチュイン変調化合物は直接的または間接的のいずれかでサーチュインタンパク質を変調するように作用できる。特定の実施態様では、サーチュイン変調化合物はサーチュイン活性化合物またはサーチュイン阻害化合物でよい。

【0059】

2. 診断および治療方法

本明細書では、サーチュインバイオマーカーならびに例えば診断適用、治療的モニタリング適用および薬物スクリーニングアッセイを含む多岐にわたる適用に関するサーチュインバイオマーカーを使用する方法が提供される。本明細書に記載される方法は、生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカーのレベルを決定することを伴う。かかるバイオマーカーは、生物学的試料または生物学的試料が得られた対象におけるサーチュイン活性の指標である。特定の実施態様では、その方法は生物学的試料中の1つのサーチュインバイオマーカーのレベルを決定することを伴うことができる。その他の実施態様では、その方法は例えば試料中の2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50もしくは100以上のサーチュインバイオマーカーのレベルのような、試料中の2つまたはそれより多いサーチュインバイオマーカーのレベルを決定することを伴うことができる。

20

【0060】

サーチュインバイオマーカーは、サーチュイン活性のレベルに依存する発現レベルを有するため、サーチュイン活性の指標として提供できる遺伝子である。サーチュインバイオマーカーの発現レベルは、mRNA発現レベルおよび/またはタンパク質発現レベルでよい。代表的なサーチュインバイオマーカーを本明細書にて表1（図1）で提供する。

30

【0061】

特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、生物学的試料中の表1（図1）で示される1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの検出を伴う。代表的な実施態様では、本明細書に記載される方法は、1つ以上の以下のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの検出を伴う：MCP-1、BMP受容体1A、Sm pd 13a、CD14、APOE、FAS、トランスサイレチン、FABP1（肝臓）、アシル-CoAチオエステラーゼ1、アシル-CoAチオエステラーゼ2、アクアポリン4、Rr ad、CXCL9、CCL8、Ppp1r3g、APOA-I、APOA-II、APOBまたはFGF21。特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、MCP-1の発現レベルの検出を伴う。特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、FGF21の発現レベルの検出を伴う。

40

【0062】

特定の実施態様では、サーチュインモジュレーターでの処置から利益を享受する個体を同定するための方法が提供される。その方法は、例えば対照と比較して該対象から生物学的試料中の少なくとも1つのサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定し、それに

50

よりサーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定することを伴うことができる。代表的なサーチュインバイオマーカーをサーチュイン活性化化合物での処置時に観察される発現における変化の型と共に表1(図1)にて示す。例えば、MCP-1発現は、サーチュイン活性において増大を示すサーチュイン活性化化合物での処置時に低下する。したがって、対照と比較してMCP-1発現レベルが増大した対象は、サーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受する、サーチュイン活性が正常レベルよりも低い対象であり得る。同様に、対照と比較してMCP-1発現レベルが低下した対象は、サーチュイン阻害化合物での処置から利益を享受する、サーチュイン活性が正常レベルよりも高い対象であり得る。加えて、正常レベルのMCP-1発現レベルもまたサーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象の指標でもあり得る。特に、サーチュイン変調は、さらに本明細書にて記載されるような種々の疾患および障害を処置するために有利であることが示されている。したがって、例えば、正常レベルのサーチュイン活性を有する対象がそれでもなおサーチュイン活性の増大または低下から利益を享受し得る。

10

【0063】

サーチュイン変調化合物での処置から利益を享受する対象を同定するために、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの決定に基づくサーチュイン活性のレベルを場合によっては、サーチュイン媒介疾患または障害に関する1つ以上のその他の指標と組み合わせることができる。例えば、正常から高レベルのMCP-1発現(例えば正常から低レベルのサーチュイン活性)を有し、体重過多であるかまたは糖耐性不全である対象は、サーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受する対象の指標であり得る。同様に、正常から低レベルのMCP-1発現(例えば正常から高レベルのサーチュイン活性)を有し、体重過少または食欲不振である対象は、サーチュイン阻害化合物での処置から利益を享受する対象の指標である。

20

【0064】

MCP-1は、単なる一例として用いられているに過ぎず、本明細書に記載される方法は、MCP-1に限定されないことを理解すべきである。むしろ表1にて提供されるいづれかのサーチュインバイオマーカーを類似の様式で使用できる。例えば、A1k3はサーチュイン活性化因子での処置時にヒト白血球において上方調節される。したがって、正常から低レベルのA1k3を有するヒト対象は、サーチュイン活性化化合物での処置から利益を享受し得る対象を表すが、正常から高レベルのA1k3を有するヒト対象は、サーチュイン阻害化合物での処置から利益を享受し得る対象を表す。

30

【0065】

特定の実施態様では、サーチュイン媒介疾患または障害を患っているか、またそれを発症する危険性のある個体を同定するための方法が提供される。例えば、その方法は対照と比較して、表1(図1)に示される1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定し、それによりサーチュイン媒介疾患または障害を患っているか、またそれを発症する危険性のある対象を同定することを伴う。前記された方法に類似して、サーチュインバイオマーカーの発現レベルが増大または低下した対象は、改変されたレベルのサーチュイン活性を有するため、サーチュイン媒介疾患または障害を患っているか、またそれを発症する危険性のある対象の指標である。例えば、MCP-1発現のレベルが増大した対象は、例えば種々の神経変性疾患または糖尿病のような正常レベルよりも低いサーチュイン活性に関連するサーチュイン媒介疾患または障害を患っているか、またそれを発症する危険性のある対象の指標であり得る。これに代えて、MCP-1発現のレベルが低下した対象は、例えば、癌または食欲低下のような正常レベルよりも高いサーチュイン活性に関連する疾患または障害を患っている対象の指標である。かかる方法は場合によっては、体重、糖耐性、認知能力等のようなサーチュイン媒介疾患または障害のその他の指標の考慮を伴うことができる。サーチュインバイオマーカーを用いるサーチュイン媒介疾患の同定および予後診断により早期の診断および適切な予防医療を導くことができる。

40

【0066】

特定の実施態様では、本明細書に記載される診断および予後診断方法はさらに治療的処

50

置を対象に投与することを含むことができる。例えば1つ以上のサーチュインバイオマーカーのレベルを用いて、サーチュイン媒介疾患または障害を患っているかまたそれを発症する危険性のある対象を同定することができる。(複数の)サーチュインバイオマーカーから得られた情報を用いて、対象がサーチュイン変調化合物、例えばサーチュイン活性化化合物またはサーチュイン阻害化合物での処置から利益を享受するでかどうかを決定することができる。次いで適切なサーチュインモジュレーターでの治療計画を選択し、適切な投与スケジュールを用いて対象に投与することができる。かかるサーチュイン変調治療を場合によっては、対象がかかりやすいか、または患っている疾患または障害の少なくとも1つの病徴を処置するかまたは軽減する別の治療薬と組み合わせて投与することができる。サーチュインバイオマーカープロフィールを用いて治療計画、例えばサーチュインモジュレーターの選択および/または投与計画の設計を補助することができる。例えば対照と比較して改変された発現レベルを有する(複数の)サーチュインバイオマーカーの数および/または同一性、(複数の)発現レベルの変化の規模等を適切なサーチュイン変調化合物の選択容易にするために、および/または治療薬の用量および投与の頻度の決定において使用することができる。例えばMCP-1発現レベルが正常よりも有意に高い対象は、MCP-1発現レベルが正常よりもわずかしか高くない個体よりもより高用量またはより頻繁な投与スケジュールを必要とし得る。

10

【0067】

特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、対象におけるサーチュイン変調を検出またはモニタリングするために、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定することを伴うことができる。対照と比較して、サーチュインバイオマーカー(例えば表1(図1)に示される1つ以上のサーチュインバイオマーカー)の発現レベルの変化は、その対象におけるサーチュイン変調を示す。特定の実施態様では、対照と比較して、MCP-1の発現レベルにおける低下は、サーチュイン活性化を示す。

20

【0068】

別の実施態様では、サーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定することは、サーチュイン変調化合物での治療的処置をモニタリングするのに有用であり得る。例えば、サーチュイン治療薬での処置の経過中に、個体の生物学的試料からの1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを1つ以上の時点で決定することができる。サーチュインモジュレーターでの処置時の、サーチュインバイオマーカーの発現レベルの変化は、個体がその処置に応答することを示す。代表的な実施態様では、サーチュイン活性化因子の投与は、結果的にMCP-1の発現レベルにおける低下に至り得る。

30

【0069】

サーチュインバイオマーカーでの処置の経過中のサーチュイン活性のモニタリングは、治療用化合物の用量または投与スケジュールの調整にも有用であり得る。特定の実施態様では、対象にサーチュイン治療薬を経時的に、例えば少なくとも1日1回、週1回、月1回等、少なくとも1週間、2週間、1か月、2か月、6か月、1年または長期間投与する。処置の経過中に1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを定期的にまたは散発的にモニタリングすることができ、例えばサーチュインバイオマーカー発現レベルを毎日、毎週、隔週、毎月、もしくは隔月に、または6か月毎に1回、または1年に1回測定することができる。サーチュインバイオマーカー発現レベルモニタリングの頻度は時間によって異なってよく、例えば最適な処置計画(投薬量および/または投与の頻度を含む)が決定された後、モニタリングの頻度を減らすことができる。代表的な実施態様では、本明細書に記載される方法は、最適な投薬計画が決定されるまで少なくとも1日1回または少なくとも週1回1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルをモニタリングすることを伴うことができる。その後、1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルのモニタリングを週1回だけ、または毎月1回だけまで低減させる。

40

【0070】

特定の実施態様では、サーチュイン変調化合物で処置されている対象は、1つ以上の種々のサーチュイン媒介疾患または障害を患っていてよい。例えば、サーチュイン活性化化

50

合物で処置されている対象は、例えば、加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパチー、虚血イベントに関連するニューロパチー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、または潮紅に関係する疾患または障害のようなサーチュイン活性のレベルにおける増大から利益を享受する疾患または障害を患っていてよい。サーチュイン阻害化合物で処置されている対象は、例えば癌または食欲刺激もしくは体重増加の必要のある個体のようなサーチュイン活性における低下から利益を享受する疾患または障害を患っている可能性がある。

【0071】

対象からの生物学的試料中のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することができる。代表的な生物学的試料には、血液、尿、血清、唾液、細胞、組織および／または毛髪を含む試料が含まれる。標準的な技術を用いて対象から試料を入手することができる。好ましくは、組織試料等を入手するために針生検のような最小限の侵襲的、非外科的手順を用いて生物学的試料を入手する。種々の実施態様では、生物学的試料を健常な個体、サーチュイン変調から利益を享受する疾患もしくは障害を患っている個体、またはサーチュイン変調化合物で処置されている対象等から採取することができる。特定の実施態様では、対象は、例えばヒトを含む哺乳動物でよい。その他の実施態様では、対象は例えば加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパチー、虚血イベントに関連するニューロパチー、眼疾患もしくは障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症、潮紅または癌の動物モデル、または体重増加もしくは食欲刺激を研究するための動物モデルを含む動物モデルでよい。適当な動物モデルは本明細書に記載されるかまたは当該分野において公知である。

10

20

30

【0072】

特定の実施態様では、対象からの生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを対照と比較することが有用であり得る。対照は定量的形態（例えば数、比率、パーセンテージ、グラフ等）または定性的形態（例えばゲルまたはプロット上のバンド強度等）の1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの測定値でよい。種々の対照を用いることができる。例えば、サーチュインモジュレーターで処置されていない個体からの1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを用いることができる。健常な個体、例えば、サーチュイン変調化合物で処置されている個体に存在する疾患または障害を患っていない個体からの1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを対照として用いることもできる。これに代えて、対照は、サーチュインモジュレーターでの処置の前の時点の、またはサーチュインモジュレーターでの処置の経過中の初期の期間の処置されている個体からの1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルでよい。なお、その他の対照には、データベース（例えば表、電子データベース、スプレッドシート等）に存在する発現レベルが含まれ得る。

【0073】

3. サーチュインバイオマーカー発現レベルの決定

サーチュインバイオマーカーの発現レベルをバイオマーカーのmRNAレベル、タンパク質レベル、活性レベルまたはバイオマーカーの遺伝子もしくはタンパク質発現データに反映されるか、もしくは導き出せるその他の量により測定することができる。各々のサーチュインバイオマーカーの発現生成物にはRNAおよびタンパク質の双方が含まれる。サーチュインバイオマーカーのRNA生成物はサーチュインバイオマーカーの転写生成物であり、hnRNA、mRNAおよびmRNAの1つ以上のスプライシング変異体の集団を含む。サーチュインバイオマーカーのタンパク質生成物を本明細書に記載される方法にしたがって測定することもできる。サーチュインバイオマーカーのタンパク質生成物には、例えばタンパク質、スプライシングされたmRNA変異体から生じるタンパク質変異体、および翻訳後修飾されたタンパク質が含まれる。

40

【0074】

サーチュインバイオマーカーのRNA生成物の発現を測定する任意の適当な手段を本明細書に記載される方法にしたがって用いることができる。例えばその方法は例えばオリゴ

50

ヌクレオチド、cDNA、RNA、PCR生成物、合成DNA、合成RNAまたは、サーチュインバイオマーカーの1つ以上のRNA生成物に特異的にハイブリダイズする天然発生の修飾されたヌクレオチドのその他の組み合わせを含む、サーチュインバイオマーカーの1つ以上のRNA生成物に特異的にハイブリダイズする種々のポリヌクレオチドを利用することができる。かかるポリヌクレオチドを、例えばアレイハイブリダイゼーション、RT-PCR、ヌクレアーゼ保護およびノーザンプロットを含む本明細書でさらに記載されるRNA発現を測定するための方法と組み合わせて用いることができる。

【0075】

アレイハイブリダイゼーション

1つの実施態様では、RNA発現のレベルを評価するためにアレイハイブリダイゼーションを用いてサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することができる。アレイハイブリダイゼーションは、サーチュインバイオマーカー発現生成物とハイブリダイズできる、支持体に安定して随伴される核酸メンバーを利用する。アレイに結合した核酸メンバーの長さは、8～1000ヌクレオチド長にわたってよく、サーチュインバイオマーカーのRNA生成物に特異的になるように選択される。アレイは、例えば、表1(図1)に示される1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、25、50、100もしくは全てのサーチュインバイオマーカーのRNA生成物、またはその変異体(例えばスプライシング変異体)に特異的である1つ以上の核酸メンバーを含むことができる。核酸メンバーは、RNAもしくはDNA、一本鎖もしくは二本鎖でよいか、および/またはcDNAから増幅されるオリゴヌクレオチドもしくはPCRフラグメントでよい。好ましくは、オリゴヌクレオチドは、およそ10～100、10～50、20～50または20～30ヌクレオチド長である。サーチュインバイオマーカーの発現された領域の部分をアレイ上でプローブとして利用することができる。さらに、特にサーチュインバイオマーカー遺伝子に相補的なオリゴヌクレオチドおよび/またはサーチュインバイオマーカー遺伝子から誘導されるcDNAが有用である。オリゴヌクレオチド基盤のアレイに関してプローブとして有用である目的の遺伝子に相当するオリゴヌクレオチドの選択は、当該分野において十分に理解されている。さらに特に標的核酸へのハイブリダイゼーションを許容するであろう領域を選択することは重要である。オリゴヌクレオチドのTm、GC含量パーセント、二次構造の程度および核酸の長さのような因子は重要な因子である。例えば米国特許第6551784号を参照のこと。

【0076】

アレイを構築、特別注文または商業用製造供給元から購入することができる。アレイを構築するための種々の方法が当該分野において周知である。例えば、固体支持体上での、例えば、アレイ様式でのオリゴヌクレオチド合成に適用可能な方法および技術は、例えば、WO第00/58516号、

【0077】

【数1】

米国特許第5,143,854, 5,242,974, 5,252,743, 5,324,633, 5,384,261, 5,405,783, 5,424,186, 5,451,683, 5,482,867, 5,491,074, 5,527,681, 5,550,215, 5,571,639, 5,578,832, 5,593,839, 5,599,695, 5,624,711, 5,631,734, 5,795,716, 5,831,070, 5,837,832, 5,856,101, 5,858,659, 5,936,324, 5,968,740, 5,974,164, 5,981,185, 5,981,956, 6,025,601, 6,033,860, 6,040,193, 6,090,555, 6,136,269, 6,269,846および6,428,752

ならびにZhouら、Nucleic Acids Res. 32: 5409 - 5417 (2004)に記載されている。

【0078】

代表的な実施態様では、マスクレスアレイ合成装置(MAS)を用いて固体支持体上で構築および/または選択オリゴヌクレオチドを合成することができる。マスクレスアレイ

10

20

30

40

50

合成装置例えばPCT出願WO第99/42813号において、および対応する米国特許第6375903号に記載される。アレイを構築するためのその他の方法には、例えばマスクを利用する光指向法（例えばVLSIPS（商標）法、例えば米国特許第5143854号、第5510270号および第5527681号に記載される）、フローチャネル法（例えば米国特許第5384261号参照）、スポットティング法（例えば米国特許第5807522号参照）、ピン基盤の方法（例えば米国特許第5288514号参照）、および複数の支持体を利用する方法（例えば米国特許第5770358号、同第5639603号および同第5541061号参照）が含まれる。

【0079】

特定の実施態様では、アレイ上の独特な位置で1つ以上の相補的核酸メンバーが標的核酸に特異的にハイブリダイズする相補的核酸メンバー／標的複合体のハイブリダイゼーションパターンを生成するのに十分なハイブリダイゼーション条件下で、支持体の表面に安定して随伴される核酸メンバーのアレイを、標的核酸を含む試料と接触させる。アレイ上の核酸メンバーの位置を参照してハイブリダイズする標的核酸の同一性を決定することができる。

10

【0080】

対照核酸メンバーはゲノムDNA、ハウスキーピング遺伝子、ベクター配列、陰性および陽性対照遺伝子等に相当するオリゴヌクレオチドまたは核酸を含む核酸メンバーを含むアレイ上に存在し得る。対照核酸メンバーは、その機能が目的の特定の遺伝子が発現されるかどうかを見分けるためではなく、むしろ発現のバックグラウンドまたは基礎レベルのようなその他の有用な情報を提供するためである較正または対照遺伝子である。

20

【0081】

アレイ上のその他の対照核酸を標的発現対照核酸およびミスマッチ対照ヌクレオチドとして使用して、プローブが指向する標的以外の試料中の核酸に対する非特異的結合または交差ハイブリダイゼーションをモニタリングする。故に、ミスマッチプローブは、ハイブリダイゼーションが特異的であるかどうかを示す。例えば、標的が存在する場合、完全に対応するプローブは、ミスマッチプローブよりも一貫してより明るいはずである。加えて、全ての対照ミスマッチが存在する場合、ミスマッチプローブを用いて変異を検出する。

【0082】

本明細書にて提供されるアレイは、アレイを用いるアッセイ条件下、特にハイスループット取り扱い条件下で物理的な支持体を提供し、そこに存在する関連する核酸を構造化するのに十分な基質を含むことができる。

30

【0083】

基質は粒子、鎖、沈殿物、ゲル、シート、管、球、ビーズ、容器、毛細管、パッド、切片、フィルム、プレート、スライド、チップ等として存在する生物学的、非生物学的、有機、無機またはこれらのうちのいずれかの組み合わせでよい。基質は、円盤状、正方形、球形、円形等のような任意の都合のよい形状を有し得る。基質は、好ましくは平坦または平面であるが、種々の代替の表面立体配置をとり得る。基質は、重合ラングミュアーブロジェット膜、機能化ガラス、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO₂、SiN₄、修飾シリコンまたはガラス、または(ポリ)テトラフルオロエチレン、二フッ化(ポリ)ビニリデン、ポリスチレン、ポリカーボネートまたはその組み合わせのような多岐にわたるゲルもしくは重合体のいずれか1つでよい。その他の、基質材料は本開示を鑑みて当業者に容易に明白になろう。

40

【0084】

特定の実施態様では、標的核酸試料は、生物学的試料から単離された全mRNAまたはmRNAに相当する核酸試料（例えばcDNA）を含むことができる。例えば酸グアニジン-フェノール-クロロホルム抽出法を用いて全mRNAを所定の試料から単離でき、オリゴdTカラムクロマトグラフィーを用いて、または(dT)_n磁性ビーズを用いてポリア+mRNAを単離することができる（例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual（第2版）1-3巻、Co

50

ld Spring Harbor Laboratory (1989) または Current Protocols in Molecular Biology、F. Ausubelら編、Greene Publishing and Wiley-Interscience、ニューヨーク(1987)参照)。特定の実施態様では、TRIZOL(商標)試薬(GIBCO/BRL、Invitrogen Life Technologies、カタログ番号15596)を用いて全RNAを抽出することができる。260/280nmでの吸光度およびアガロースゲル電気泳動、続く紫外線下での検査によりRNAの純度および完全性を評価することができる。

【0085】

特定の実施態様では、ハイブリダイゼーションの前に標的核酸試料を増幅することが望ましい場合もある。定量的な結果が望ましい場合、どのような増幅方法を用いても、増幅された核酸の相対頻度を維持するかまたは制御する方法を使用するために注意を払わなければならないことは当業者には理解されよう。定量的増幅の方法は、当業者に周知である。例えば、定量PCRは同一プライマーを用いる公知の量の制御配列を同時に同時増幅することを伴う。これはPCR反応を較正するために用いることができる内部標準を提供する。次いで高密度アレイは増幅された核酸の定量に関する内部標準に特異的なプローブを含むことができる。定量PCRに関する詳細なプロトコールは、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、Innisら、Academic Press, Inc.、ニューヨーク州(1990)にて提供される。

【0086】

特定の実施態様では、逆転写酵素ならびにオリゴdTおよびファージT7プロモーターをコードする配列からなるプライマーを用いて標的核酸試料mRNAを逆転写して一本鎖DNA鑄型を提供する。DNAポリメラーゼを用いて第2のDNA鎖を重合化する。二本鎖cDNAの合成の後、T7 RNAポリメラーゼを添加し、RNAをcDNA鑄型から転写する。各一本鎖cDNA鑄型からの転写の連続ラウンドの結果、RNA増幅に至る。インビトロ転写の方法は、当業者に周知であり(例えばSambrook、前出参照)、この特定の方法はVan Gelderら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1663-1667(1990)にて詳細に記載され、この方法によるインビトロ増幅は種々のRNA転写物の相対頻度を維持することが実証される。さらにEberwineら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3010-3014により、生物学的試料が限定される場合でさえ、発現モニタリングを許容する、元来の出発材料の106倍大きい増幅を達成するためにインビトロ転写を介する2ラウンドの増幅を用いるプロトコールが提供される。

【0087】

本明細書に記載される方法による使用に適當な検出可能な標識には、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段により検出可能な任意の組成物が含まれる。有用な標識には、標識ストレプトアビシン抱合体で染色するためのビオチン、磁性ビーズ(例えばDynabeads(商標))、蛍光色素(例えばフルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質等)、放射標識(例えば³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴Cまたは³²P)、酵素(例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼおよびELISAにおいて一般的に用いられるその他のもの)、および金コロイドまたは着色ガラスもしくはプラスチック(例えばポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックス等)ビーズのような比色標識が含まれる。かかる標識の使用を教示する特許には、米国特許第3817837号；同第3850752号；同第3939350号；同第3996345号；同第4277437号；同第4275149号；および同第4366241号が含まれる。

【0088】

かかる標識を検出する手段は、当業者に周知である。故に、例えば写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを用いて放射標識を検出することができ、放射光を検出する

10

20

30

40

50

光検出器を用いて蛍光マーカーを検出することができる。酵素標識は、典型的には酵素を基質と共に提供し、基質上の酵素の作用により生成される反応生成物を検出することにより検出され、比色標識は着色された標識を単に可視化することにより検出される。

【0089】

当業者に周知である多くの手段のいずれかにより標識を組み込むことができる。例えば、標識を試料核酸の調製における増幅工程の間に標識を同時に組み込むことができる。故に、例えば、標識プライマーまたは標識ヌクレオチドを用いるポリメラーゼ連鎖反応（P C R）により標識増幅生成物が提供されるであろう。加えて、前記されたような標識ヌクレオチド（例えばフルオレセイン標識UTPおよび／またはCTP）を用いる転写増幅は、転写された核酸に標識を組み込む。

10

【0090】

これに代えて、元来の核酸試料（例えばmRNA、ポリアmRNA、cDNA等）に、または増幅が完了した後、増幅生成物に直接標識を加えることができる。標識を核酸に結合させる手段は、当業者に周知であり、例えば、ニックトランスレーションまたは、核酸のキナーゼ処理、および続いて試料核酸を標識（例えばフルオロフオア）に連結する核酸リンカーの結合（ライゲーション）による末端標識（例えば標識RNAを用いる）が含まれる。

【0091】

特定の実施態様では、蛍光修飾は、シアニン色素、例えばCy-3/Cy-5dUTP、Cy-3/Cy-5dCTP（Amersham Pharmacia）またはアレクサ色素（Khanna、Cancer Res. 58:5009-5013(1998)）による。

20

【0092】

特定の実施態様では、例えば、対象（例えばサーチュイン変調化合物で処置されている対象、またはサーチュイン媒介疾患または障害の危険性があると疑われるか、もしくはそれを患っている対象等）からの標的核酸試料および対照核酸試料（例えばサーチュイン変調化合物で処置されていない対象または健常個体からの核酸試料等）を含む2つの標的核酸試料をアレイに同時にハイブリダイズすることが望ましい場合もある。比較に用いられる2つの標的試料を、区別可能な検出シグナルを生成する異なる蛍光色素で標識し、例えば、対照試料からの標的をCy5で標識し、モニタリングまたは診断されるべき対象からの標的をCy3で標識する。異なって標識された標的試料を同一のマイクロアレイに同時にハイブリダイズする。当該分野において公知の方法を用いて、例えば、エタノール精製またはカラム精製により、標識された標的を精製することができる。

30

【0093】

特定の実施態様では、標的核酸試料は、マイクロアレイ上で対照プローブにハイブリダイズしてマイクロアレイから作成されるシグナルを正規化する1つ以上の対照分子を含むであろう。標識された正規化標的是、例えば、前記されたようなマイクロアレイにスポットされる対照オリゴヌクレオチドに完全に相補的である核酸配列でよい。ハイブリダイゼーションの後に正規化対照から得られたシグナルにより、ハイブリダイゼーション条件、標識強度、読み取り効率、および完全なハイブリダイゼーションのシグナルをアレイ間で変動させ得るその他の因子における変動に関する対照が提供される。アレイにおける全てのその他のプローブから読み取られるシグナル（例えば蛍光強度）を対照プローブからのシグナル（例えば蛍光強度）で除してそれにより測定値を正規化することができる。

40

【0094】

試料中に存在するその他の標的の平均の長さを反映するように、正規化標的を選択できるか、または様々な長さに及ぶようにそれらを選択できる。また、アレイのその他のプローブの（平均の）塩基組成を反映するように（複数の）正規化対照を選択することができる。特定の実施態様では、1つのみ、またはいくつかの正規化プローブを使用し、それらが十分にハイブリダイズし（すなわち二次構造を有さず、自己ハイブリダイズしない）、いずれの標的分子にも対応しないようにそれらを選択する。正規化プローブをアレイの任

50

意の位置で、またはアレイ全体の複数の位置で局在させて、ハイブリダイゼーション効率における空間的変動に関して制御することができる。例えば、正規化対照をアレイの隅、縁および中央に配置することができる。

【0095】

アレイに対する核酸ハイブリダイゼーションは、プローブまたは標的核酸メンバーおよびその相補的標的が相補的塩基対形成を介して安定したハイブリッド二重鎖を形成することができる条件下で、アレイ上の変性プローブまたは標的核酸メンバーおよび標的核酸試料をインキュベートすることを伴う。次いで、ハイブリッド二重鎖を形成しない核酸を洗い流して、典型的には結合した検出可能な標識の検出により検出されるべきハイブリダイズされた核酸を残す。温度を上げるか、または核酸を含有するバッファーの塩濃度を低下させることにより核酸を変性させることは一般的に認識される。低ストリンジエント条件下（例えば低温および／または高塩）では、アニーリングされた配列が完全に相補的ではない場合でさえもハイブリッド二重鎖（例えばDNA：DNA、RNA：RNAまたはRNA：DNA）を形成するであろう。故に、ハイブリダイゼーションの特異性は低ストリンジエンシーで低減される。反対に高ストリンジエンシー（例えば高温および／または低塩）では、成功したハイブリダイゼーションはミスマッチをほとんど必要としない。ハイブリダイゼーション条件を最適化する方法は当業者に周知である（例えばLaboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology、24巻：Hybridization With Nucleic acid Probes、P.Tijssen編、Elsevier、ニューヨーク州（1993）参照）。

10

20

30

【0096】

ハイブリダイゼーションの後、ハイブリダイズされない標識または未標識核酸は、洗浄により支持体表面から除去され、それにより基質表面上でハイブリダイズされた標的核酸のパターンを作成する。種々の洗浄溶液が当業者に公知であり、使用され得る。標的核酸試料の特定の標識に基づいて選択されている特定の検出の様式で、標識され、ハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドおよび／または核酸の得られたハイブリダイゼーションパターンを種々の方式で可視化または検出することができ、ここで代表的な検出手段にはシンチレーションカウンティング、オートラジオグラフィー、蛍光測定、熱量測定、発光測定等が含まれる。

【0097】

ハイブリダイゼーション、洗浄工程および／またはその後の処理に続いて、得られたハイブリダイゼーションパターンを検出する。ハイブリダイゼーションパターンの検出または可視化において、標識の強度またはシグナル値は検出されるのみならず、定量され、例えばハイブリダイズされたアレイ上の各スポットからのシグナルを測定し、公知の数の末端標識された標的核酸により放出されるシグナルに相当する単位値と比較して、ハイブリダイゼーションパターンにおけるアレイ上の特定のスポットにハイブリダイズする各末端標識された標的のコピー数の計数値または絶対値を得る。

【0098】

アレイハイブリダイゼーションから収集されたデータを分析するための方法は、当該分野において周知である。例えば、ハイブリダイゼーションの検出が蛍光標識を伴う場合、データ分析には収集されたデータからの基質位置の関数として蛍光強度を決定し、異常値、すなわち予め決定された統計分布から逸脱するデータを除去し、残りのデータからの被験核酸の相対結合親和性を計算する工程が含まれ得る。得られたデータを、関連するオリゴヌクレオチドおよび／または核酸と被験核酸との間の結合親和性にしたがって変動する各領域における強度を伴う画像として表示する。

40

【0099】

R T - P C R

特定の実施態様では、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）と組み合わせた逆転写（RT）を用いて、試料からのバイオマーカーのRNA生成物を増幅することにより、サーチュイ

50

ンバイオマーカーのRNA生成物の発現のレベルを測定することができる。特定の実施態様では、当業者に理解されるようにRTは定量的でよい。

【0100】

試料からの全RNAまたはmRNAを鑄型として使用し、サーチュインバイオマーカーの転写された部分に特異的なプライマーを使用して逆転写を開始する。RNAをcDNAに逆転写する方法は周知であり、例えば、Sambrookら(1989、前出)に記載される。市販により入手可能であるソフトウェア(例えばPrimer Designer 1.0、Scientific Software等)または標準的であり、当該分野において周知である方法を利用してプライマー設計を達成することができる。プライマーソフトウェアプログラムを用いてプライマーの設計および選択に役立てることができ、例えば、以下のウェブサイトリンク:biotools.idtdna.com/primerquest/を介して利用可能である、The Primer Questソフトウェアが含まれる。加えて、以下のウェブサイトリンク:1)NCBI LocusLink Homepage:ワールドワイドウェブncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/;および2)Ensemble Human Genome Browser:ワールドワイドウェブensembl.org/Homo_sapiensは、バイオマーカープライマー設計において使用するためのヒトゲノムデータベースからの配列情報を検索およびアップデートする場合に有用であり、好ましくは、遺伝子または配列情報、受け入れもしくは配列番号、遺伝子記号、RefSeq番号および/またはユニークコードのような関連バイオマーカー情報を用いる。

10

20

30

40

【0101】

本明細書に記載される方法にしたがって使用できるプライマーを設計するための一般的なガイドラインには、以下のものが含まれる:生成物またはアンプリコンの長さは~100-150塩基でよく、最適T_mは~60または約58-62でよく、GC含量は~50%または約45-55%でよい。加えて、1つ以上の以下のようないくつかの特定の配列を避けるのが望ましいことがある:(i)プライマー-二量体形成を低減させるために、同一のプライマーの別の部分もしくは別のプライマーに相補的である各プライマーの3'末端の3つ以上の塩基のストリング;(ii)別のプライマー配列に相補的であるプライマー内の配列;(iii)3'末端で3つ以上のG'もしくはC'の繋がり;(iv)単一の塩基が3塩基より多く繰り返される;(v)G/CおよびA/Tリッチドメインの不均衡な分布;ならびに/または(vi)3'末端でのT。

【0102】

続いて、逆転写の生成物をPCRの鑄型として使用する。目的の標的配列を増幅するために、熱安定性のDNA依存性DNAポリメラーゼにより触媒されるDNA複製の複数のサイクルを用いることにより、特定の核酸配列を迅速に増幅するための方法がPCRにより提供される。PCRは、増幅されるべき核酸、増幅されるべき配列をランキングする2つの一本鎖オリゴヌクレオチドプライマー、DNAポリメラーゼ、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、バッファーおよび塩の存在を必要とする。PCRの方法は、当該分野において周知である。MullisおよびFaloona、Methods Enzymol. 1155:335(1987)に記載されるようにPCRを実施する。

【0103】

本質的に定量的であるQRT-PCRを実施して、サーチュインバイオマーカー遺伝子発現レベルの定量的測定値を提供することもできる。QRT-PCRでは逆転写およびPCRを2工程で実施できるか、またはPCRと組み合わされた逆転写を同時に実施することができる。Taqman(Perkin Elmer、フォスター・シティ、カリフォルニア州)のような市販により入手可能であるキットがあるこれらの技術の1つを、転写物特異的アンチセンスプローブを用いて実施する。このプローブは、PCR生成物(例えば遺伝子から誘導される核酸フラグメント)に特異的であり、オリゴヌクレオチドの5'末端に複合化されるクエンチャーよび蛍光レポータープローブを用いて調製される。異なる蛍光マーカーを異なるレポーターに結合させて、1つの反応において2つの生成物を

50

測定することを可能にする。Taq DNAポリメラーゼが活性化される場合、それはその5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性により鋳型に結合したプローブの蛍光レポーターを切断する。クエンチャーフの不在下では、今度はレポーターが蛍光を発する。レポーターにおける色の変化は各特異的生成物の量に比例し、蛍光光度計により測定される；それ故に各色の量を測定し、PCR生成物を定量化する。多くの個体に由来する試料を処理し、同時に測定するようにPCR反応を96ウェルプレートで実施する。ゲル電気泳動を必要としないTaqman系はさらに有利であり、標準曲線と共に用いて定量を可能にする。

【0104】

PCR生成物を定量的に検出するために有用な第2の技術は、市販により入手可能であるQuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen、バレンシア、カリフォルニア州)のような挿入色素を使用することである。PCR段階の間にPCR生成物に組み込まれる蛍光標識としてSYBRグリーンを用いてRT-PCRが実施され、PCR生成物の量に比例した蛍光を生成する。加えて、mRNA発現生成物を定量的に測定するために、Molecular Beacons(商標)を含むその他の系が公知である。

10

【0105】

mRNA発現を定量的に測定するさらなる技術には、限定するものではないがポリメラーゼ連鎖反応、リガーゼ連鎖反応、Qbetaレプリカーゼ(例えば国際出願第PCT/US87/00880号を参照)、等温增幅法(例えばWalkerら、PNAS 89:382-396(1992)参照)、鎖置換増幅(SDA)、修復連鎖反応、非対称定量PCR(例えば米国特許公開第US200330134307(A1)号)およびFujら、Journal of Biotechnology 108:193-205(2004)に記載されるマルチプレックスミクロスフェアビーズアッセイが含まれる。

20

【0106】

核酸配列増幅(NASBA)および3SRを含む転写基盤の増幅系(TAS)を用いて試料からRNAを増幅することにより遺伝子発現のレベルを測定することができる。例えば、Kwohら、PNAS USA 86:1173(1989);国際公開WO第88/10315号;および米国特許第6329179号を参照のこと。NASBAでは、従来のフェノール/クロロホルム抽出、熱変性、DNAおよびRNAの単離のための溶解バッファーおよびミニスピンドラムでの処理、またはRNAの塩化グアニジン抽出を用いて増幅するために核酸を調製することができる。これらの増幅技術は、標的特異的配列を有するプライマーをアニーリングすることを伴う。重合化の後、DNA/RNAハイブリッドをRNase Hで消化するが、二本鎖DNA分子は再度熱変性する。いずれにしても、重合化に続いて第2の標的特異的プライマーの添加により一本鎖DNAを完全に二本鎖にする。次いで二本鎖DNA分子は、T7またはSP6のようなポリメラーゼにより複合的に転写される。等温サイクル反応では、RNAのものを二本鎖DNAに逆転写し、T7またはSP6のようなポリメラーゼで1回転写する。得られた生成物は、トランケートされても完全であっても、標的特異的配列を示す。

30

【0107】

いくつかの技術を用いて、増幅生成物を分離することができる。例えば、従来の方法を用いてアガロース、アガロース-アクリルアミドまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動により増幅生成物を分離することができる。Sambrookら、1989を参照のこと。電気泳動せずに、PCR生成物を定量的に検出するためのいくつか技術を用いることができる(例えば、PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications、Innisら、Academic Press, Inc.、ニューヨーク州(1990)参照)。例えば、クロマトグラフィー技術を用いて分離を行うことができる。用いることができる多くの種類のクロマトグラフィーがある:吸着、分配、イオン交換および分子ふるい、HPLC、ならびにカラム、ペーパー、薄層およびガスクロマトグラフィーを含むそれらを用いるための多くの特殊な技術(Freifelder、Physical Biochemistry Applications

40

50

ns to Biochemistry and Molecular Biology、第2版、Wm. Freeman and Co.、ニューヨーク、ニューヨーク州、1982)。

【0108】

目的の核酸配列の増幅を確認するために、増幅生成物を可視化しなければならない。1つの典型的な可視化方法は、臭化工チジウムでのゲルの染色およびUV光下での可視化を伴う。これに代えて、増幅生成物が放射または蛍光分析用に標識されたヌクレオチドで一體的に標識されている場合、次いで増幅生成物をX線フィルムに暴露するか、または適切なスペクトル刺激下で可視化し、続いて分離することができる。

【0109】

これに代えて、可視化を間接的に達成することができる。増幅生成物の分離に続いて、標識された核酸プローブを目的の増幅された核酸配列と接触させる。プローブは発色団に抱合されるか、放射標識されるか、または抗体もしくはビオチンのような結合パートナーに抱合されてよく、ここで結合対のその他のメンバーは検出可能な部分を担持する。

【0110】

加えて、サザンプロッティングおよび標識プローブとのハイブリダイゼーションを用いて検出を実施することができる。サザンプロッティングに関する技術は、当業者に周知であり、分子プロトコールに関する多くの標準的な書籍において見出され得る。Sambrookら、1989、前出を参照のこと。簡単には、増幅生成物をゲル電気泳動により分離する。次いで、ゲルをニトロセルロースのような膜と接触させ、核酸および非共有結合の移動を許容する。その後、膜を標的増幅生成物とハイブリダイズすることが可能である発色団抱合プローブと共にインキュベートする。検出は、膜をX線フィルムまたはイオン放出検出装置に暴露することによる。

【0111】

ヌクレアーゼ保護アッセイ

特定の実施態様では、ヌクレアーゼ保護アッセイ(リボヌクレアーゼ保護アッセイおよびS1ヌクレアーゼアッセイの双方を含む)を用いてサーチュインバイオマーカーのRNA生成物を検出および定量することができる。ヌクレアーゼ保護アッセイでは、アンチセンスプローブ(例えば放射標識された、または非同位体標識された)は溶液中でRNA試料にハイブリダイズする。ハイブリダイゼーションに続いて、一本鎖のハイブリダイズされていないプローブおよびRNAをヌクレアーゼにより分解する。アクリルアミドゲルを用いて、残りの保護されたフラグメントを分離する。典型的には溶液ハイブリダイゼーションは試料RNAを100μgまで収容できるが、プロットハイブリダイゼーションはRNA試料を~20-30μgまでしか収容できない。

【0112】

最も一般的な型のヌクレアーゼ保護アッセイであるリボヌクレアーゼ保護アッセイは、RNAプローブの使用を必要とする。オリゴヌクレオチドおよびその他の一本鎖DNAプローブは、S1ヌクレアーゼを含有するアッセイにおいてのみ使用することができる。一本鎖のアンチセンスプローブは、典型的にはヌクレアーゼによるプローブ：標的ハイブリッドの切断を防御するために標的RNAに完全に相同でなければならない。

【0113】

ノーザンプロット

当業者に公知である従来のノーザンハイブリダイゼーション技術にしたがって標準的なノーザンプロットアッセイを用いてRNA転写物の大きさを確認し、選択的スプライシングされたRNA転写物、およびサーチュインバイオマーカーのRNA生成物の相対量を同定することもできる。ノーザンプロットでは、最初に変性条件下でのアガロースゲルにおける電気泳動を介してRNA試料を大きさにより分離する。次いで、RNAを膜に移し、標識プローブで架橋およびハイブリダイズする。ランダムプライミング、ニックトランスレーションまたはPCR生成されたDNAプローブ、インピトロ転写されたDNAプローブおよびオリゴヌクレオチドを含む非同位体性または高特異活性放射標識されたプローブ

10

20

30

40

50

を使用することができる。加えて、部分的にのみ相同である配列（例えば、異なる種からのcDNAまたはエクソンを含有し得るゲノムDNAフラグメント）をプローブとして使用することができる。全長、一本鎖DNAまたはそのDNA配列のフラグメントのいずれか含有する標識プローブ、例えば放射標識cDNAは少なくとも20、少なくとも30、少なくとも50または少なくとも100の連続ヌクレオチド長までの任意の長さでよい。当該分野において公知の多くの異なる方法のいずれかによりプローブを標識することができる。これらの研究に最も一般的に用いられる標識は、放射活性エレメント、酵素、紫外光に暴露した場合に蛍光を発する化学物質等である。多くの蛍光材料が公知であり、標識として利用され得る。これらには、限定するものではないがフルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、AMCAブルーおよびルシファーイエローが含まれる。特定の検出材料は、ヤギで調製され、イソチオシアナートを介してフルオレセインで抱合された抗ウサギ抗体である。同位体の非限定例には、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁹⁰Y、¹²⁵I、¹³¹Iおよび¹⁸⁶Reが含まれる。酵素標識は、同様に有用であり、現在利用される比色分析、分光度、蛍光分光光度、電流測定または気体定量技術のいずれかにより検出され得る。カルボジイミド、ジイソシアナート、グルタルアルデヒド等のような架橋分子との反応により酵素を選択されたプローブに抱合させることができる。例えば、ペルオキシダーゼ、ベータ-D-ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ+ペルオキシダーゼおよびアルカリ性ホスファターゼを含む当業者に公知の任意の酵素を利用することができる。代替の標識材料および方法のその開示に関して、例として米国特許第3654090号、同第3850752号および同第4016043号が参照される。

10

20

30

40

50

【0114】

タンパク質生成物

任意の当該分野において公知の方法を用いて、バイオマーカーのタンパク質レベルによりサーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定することもできる。タンパク質定量に関する伝統的な方法論には、2-Dゲル電気泳動、質量分析および抗体結合が含まれる。生物学的試料中のバイオマーカータンパク質レベルを検定するための好ましい方法には、イムノプロッティング（ウェスタンプロッティング）、免疫組織化学的アッセイ、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）またはタンパク質チップのような抗体基盤の技術が含まれる。例えば、バイオマーカー特異的モノクローナル抗体を免疫吸着剤として、および酵素標識プローブとしての双方で使用して、バイオマーカーを検出し、定量することができる。直線回帰コンピューターアルゴリズムを用いて標準調製物に存在する量を参照して、試料中に存在するバイオマーカーの量を計算することができる。別の実施態様では、サーチュインバイオマーカーを生物学的試料から（例えば尿もしくは血清から、または細胞のライゼート等から直接的に）バイオマーカーに特異的な抗体を用いて免疫沈殿することができる。次いで、単離されたタンパク質をSDS-PAGEゲルに流し、標準的な手順を用いてプロッティング（例えばニトロセルロースまたはその他の適当な材料に）することができる。次いで、プロットを抗バイオマーカー特異的抗体でプローピングしてサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することができる。

【0115】

例えば、Molecular Cloning A Laboratory Manual、第2版、Sambrook、FritschおよびManiatis編（Cold Spring Harbor Laboratory Press：1989）、HarlowおよびLane、Antibodies：A Laboratory Manual（1988 Cold Spring Harbor Laboratory）、G. Suizdak、Mass Spectrometry for Biotechnology（Academic Press 1996）ならびにそこで引用されるその他の参考文献に記載されるもののような標準的な技術を用いて、ゲル電気泳動、免疫沈殿および質量分析を実施することができる。

【0116】

本明細書で使用される際には、「抗体」(Ab)または「モノクローナル抗体」(mAb)なる用語は、サーチュインバイオマーカーに特異的に結合することが可能であるインタクトな分子および抗体部分(例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、一本鎖FvまたはFdのような)を含むことを意味する。

【0117】

サーチュインバイオマーカー、例えば、表1に示されるバイオマーカーの単離および検出に適当な抗体を種々の供給源から商業的に購入することができる。例えば、ヒトMCP-1に特異的な抗体をAbcam Inc.(ケンブリッジ、マサチューセッツ州)またはBiologics(サンディエゴ、カリフォルニア州92121)から購入することができる。標準的な技術を用いて、サーチュインバイオマーカーに特異的な抗体を生成することができる。一般的に、抗体を生成するのに適用可能な方法は当該分野において周知であり、本明細書に引用される参考文献、例えばCurrent Protocols in Immunology and Using Antibodies: A Laboratory Manualに広く記載されている。全長ポリペプチド、部分的ポリペプチド、融合タンパク質またはペプチド(免疫原性を強化するために別の部分と抱合させることができる)のいずれかで動物(またはヒト)を免疫することにより抗体を作成できることが留意される。抗体の特異性は、動物を免疫するために用いられる特定の調製物および抗体がポリクローナルであるか、モノクローナルであるかに依存して変動するであろう。一般的には、好ましい抗体は特異的サーチュインバイオマーカーに関して高い親和性、例えば<200nM、および好ましくは<100nMのK_dを有するであろう。

10

20

30

【0118】

任意の当該分野において公知の方法を用いて、バイオマーカーの活性レベルによりサーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定することができる。例えば、サーチュインバイオマーカーの一例であるMCP-1はインビトロおよびインビボで単球に関する強力な化学誘引物質である。TUNEL(Nakazawa, T.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:2425-2430(2007))により定量されるように、網膜剥離(RD)誘起の光受容体アポトーシス率に基づいてMCP-1活性を決定した。サーチュインバイオマーカーの特定の代表的な活性についてのさらなる情報を以下に提供する。

【0119】

単球走化性タンパク質-1(MCP-1)

MCP-1は、CCケモカインファミリーのメンバーであり、インビトロおよびインビボで単球に関する強力な化学誘引物質である。アテローム性動脈硬化症の病因におけるMCP-1に関する重要な役割を支持する多くの証拠が存在する。心筋虚血およびうっ血性心不全のようなその他の心血管疾患において、MCP-1が重要な病的役割を果たし得るという証拠も増えつつある。最近では、網膜剥離およびいくつかのその他の視覚障害を有する患者の硝子体液試料中のMCP-1発現の増大が報告された。MCP-1の活性化はまた網膜剥離誘起の光受容体アポトーシスにも関係する。

40

【0120】

骨形態形成タンパク質受容体、IA型(BMP受容体1A)

骨形態形成タンパク質(BMP)に対する細胞応答は、I型およびII型セリン/スレオニンキナーゼ受容体のヘテロオリゴマー複合体の形成により媒介されることが示されている。アクチビン受容体様キナーゼ(ALK)-3としても公知のBMP受容体1A(BMPR-1A)は、TGF-βファミリーサイトカインのシグナル伝達に必要とされる7つの公知のI型セリン/スレオニンキナーゼのうちの1つである。I型受容体がII型受容体の不在下ではTGF-βに結合しないTGF-β受容体系とは対照的に、BMPシグナリングに関与するI型受容体(BMPR-IA、BMPR-IB/ALK-6およびAcTR-IA/ALK-2を含む)はII型受容体の不在下で種々のBMPファミリータンパク質に独立して結合することができる。組換え可溶性BMPR-IAは、溶液中で高い

50

親和性で B M P - 2 および - 4 に結合し、インビトロで強力な B M P - 2 / 4 アンタゴニストである。B M P R - I A は、胚形成の間に遍在滴に発現される。成体組織では、骨格筋において見出される最高の発現レベルで、B M P R - I A mRNA もまた広く分布する。B M P R - I A の細胞外ドメインは、その他の哺乳動物 A L K I 型受容体キナーゼとアミノ酸配列同一性をほとんど共有しないが、システイン残基は保存される。ヒトおよびマウス B M P R - I A は高度に保存され、98% 配列同一性を共有する。

【0121】

スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ、酸様 3 A (S m p d 1 3 a)
S m p d 1 3 a は、スフィンゴミエリン上で作用するホスホジエステラーゼ酵素である。
この酵素の欠損は、ニーマン・ピック病に関連する。S m p d 1 3 a タンパク質は対応する正常な尿路上皮組織に相対して、12の膀胱腫瘍のうちの8つにおいて差次的に発現されることが見出されている。膀胱腫瘍細胞系の一過性のトランスフェクションにより、ヒト膀胱腫瘍細胞における膀胱癌欠損 1 (D B C C R 1) 過剰発現が結果的に S m p d 1 3 a RNA およびタンパク質発現の上方調節に至ることが示された。

10

【0122】

C D 1 4 抗原

C D 1 4 は、細胞特にマクロファージの表面で発現される膜結合型グリコシルホスファチジルイノシトール連結タンパク質である。C D 1 4 は、細胞表面マーカータンパク質の分化群のクラスタにおけるその封入から命名された。C D 1 4 は、細菌性リポ多糖類の検出のための共受容体 (T o l 1 様受容体 T L R 4 および M D - 2 と共に) として作用する。C D 1 4 は、最初に記載されたパターン認識受容体であった。可溶性形態 s C D 1 4 は、肝臓および単球により分泌され、低濃度で、あるいは、C D 1 4 を発現しない細胞に L P S 応答性を付与するのに十分である。

20

【0123】

アポリポタンパク質 E (A p o E)

カイロミクロンの主要なアポタンパク質である A p o E は、肝臓細胞および末梢細胞上の特異的受容体に結合する。A p o E は、トリグリセリドリッヂリポタンパク質構成要素の正常な異化に必須である。A p o E は、リポタンパク質代謝および心血管疾患においてその重要性が最初に認識された。さらに最近では、アルツハイマー病、免疫調節および認知を含む、リポタンパク質輸送に直接関係しないいくつかの生物学的過程におけるその役割に関して研究されている。A p o E の欠損の結果、家族性異常 リポタンパク質血症または I I I 型高リポタンパク質血症 (H L P I I I) に至り、ここで血漿コレステロールおよびトリグリセリドの増大は、カイロミクロン、V L D L および L D L レムナントのクリアランス不全の結果である。A p o E タンパク質は 299 アミノ酸長であり、リポタンパク質、脂溶性ビタミンおよびコレステロールをリンパ系、次に血液に輸送する。それは、主として肝臓において合成されるが、脳、腎臓および脾臓のようなその他の組織においても見出されている。神経系では、非ニューロン細胞型、最も顕著にはアストログリアおよびミクログリアが A p o E の主要な生成体であるが、ニューロンは A p o E に関する受容体を選択的に発現する。

30

【0124】

脂肪酸シンテターゼ (F A S)

F A S は、アセチル - C o A 、マロニル - C o A およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、すなわち N A D P H から長鎖脂肪酸の還元的デノボ合成を可能にする唯一の酵素である。F A S は、長鎖脂肪酸の合成を触媒するが、ベータ酸化による脂肪酸の分解は、酸化のための脂肪酸のミトコンドリアへの移行に関する律速酵素であるカルニチンパルミトイльтランスフェラーゼ - 1 により調節される。2つの転写因子、上流刺激因子 (U S F) およびステロール調節エレメント結合タンパク質 - 1 c (S R E B P - 1 c) は F A S 転写の調節において優勢な、およびあるいは協同的な役割を果たすようである。セルレニンまたは C 7 5 のような合成 F A S 阻害剤を用いる F A S の阻害は食物摂取を低減させ、重大な可逆的な体重減少を誘起する。その後の研究により、C 7 5 はまた C P

40

50

T - 1 を刺激し、ベータ酸化を増大させることも表される。C 7 5 およびセルレニンがその効果を媒介するメカニズムに関する仮説が提示されている。中枢的には、これらの化合物は摂食関連神経ペプチドの発現プロフィールを改変し、しばしば食欲促進ペプチドの発現を阻害する。中枢媒介によっても、末梢メカニズムによっても、C 7 5 はまたエネルギー消費を増大させ、それは体重減少に寄与する。インビトロおよびインビボ研究により、C 7 5 の効果の少なくとも一部は公知の末梢エネルギーセンシングキナーゼであるAMP活性化タンパク質キナーゼ(AMPK)の変調により媒介されることが実証される。まとめると、これらのデータは、エネルギー収支の知覚および調節における脂肪酸代謝に関する役割を示唆する。加えて、FASはほとんど全ての非悪性成体組織において極めて低いが、多くの型の癌ではそれは有意に上方調節されるかまたは活性化され、癌治療のための興味深い標的となっている。

10

【0125】

トランスサイレチン(TTR)

トランスサイレチンは、甲状腺ホルモンチロキシン(T4)の血清および脳脊髄液キャリアである。それは、2つのその他の甲状腺ホルモン結合タンパク質、チロキシン結合グロブリン(TBG)およびアルブミンと呼応して機能する。トランスサイレチンは肝臓、脈絡叢および網膜色素上皮で合成される二量体立体配置の二量体を伴う55kDaのホモ四量体である。各単量体は、シート構造に富む127残基ポリペプチドである。2つの単量体の会合は、広げられたサンドイッチを形成する。別の同一の単量体のセットのさらなる会合により、ホモ四量体構造が生成される。四量体あたりの2つのチロキシン結合部位は、後者の二量体のセットの間の接触面にある。トランスサイレチンはアミロイド疾患老人性全身性アミロイドーシス(SSA)、家族性アミロイド多発ニューロパシー(FAP)および家族性アミロイド心筋症(FAC)に関連することが分かっている。多くの天然生成物(例えばレスベラトロール)、薬物(ジフルニサル、フルフェナム酸)および毒素PCBを含む非常に多くのその他の小型分子が、チロキシン結合部位で結合することが分かっている。

20

【0126】

脂肪酸結合タンパク質1、肝臓(FABP1)

肝臓脂肪酸結合タンパク質(FABP1)は、肝細胞細胞質に非常に豊富に見出されるが、特異的なリガンド依存的様式で肝細胞核にも随伴される。それは、脂肪酸の細胞取り込み、輸送および代謝を促進し、遺伝子発現および細胞分化の調節に関与する。FABP1は、2つの短い逆平行らせんによりゲート開閉される脂質結合腔を付与する10本鎖のクラム構造を有する細胞内脂質結合タンパク質のファミリーに属する；しかしながらFABP1は、リガンドポケットが異常に大きいため、2つの均等モル濃度の長鎖脂肪酸およびまたヘムのような大きなリガンドの結合を可能にする点でこのファミリーでは独特である。FABP1結合およびペルオキシソーム増殖剤、特にロイコトリエンD4アンタゴニストの輸送は抗炎症性喘息治療の副作用に関わる。

30

【0127】

アシル-CoAチオエステラーゼ1(Acot1)およびアシル-CoAチオエステラーゼ2(Acot2)

40

脂質代謝における不均衡は、ヒトの健康において重篤な結果を有するので、遊離脂肪酸および、遊離脂肪酸の活性化形態であるアシル-CoAの細胞レベルの維持は極めて重要である。アシル-CoエンザイムA(CoA)チオエステラーゼ(Acot)はアシル-CoAを遊離脂肪酸およびCoASHに加水分解し、それによりこれらの化合物の細胞内レベルを調節する潜在能力を有する。マウスおよびヒトの双方のAcot遺伝子クラスタが特徴付けられており、その各々が、ACOT1(細胞質内)、ACOT2(ミトコンドリア内)およびACOT3-6(ペルオキシソーム内)をコードする遺伝子複製を含む。

【0128】

アクアポリン4

アクアポリンは、膜内在性タンパク質のクラスであるか、またはさらに一般的には生物

50

学的細胞の膜においてポアを形成する主要な内因性タンパク質（MIP）のクラスとして称される。アクアポリンは、水分子を選択的に内外に導くが、イオンおよびその他の溶質の通過を防御する。アクアポリンは、哺乳動物では一般的に4つ（典型的には）の同一のサブユニットタンパク質から構成され、その各々の単量体は水チャネルとして作用する。アクアポリン遺伝子を伴う遺伝的欠損は、いくつかのヒト疾患に関連している。アクアポリン1は、広く発現される水チャネルである。アクアポリン2は、腎臓の集合管主細胞の頂端細胞膜において、および細胞全体に位置する細胞内小胞において見出される。アクアポリン3および4は、集合管主細胞の基底細胞膜において見出され、これらの細胞を出る水のための経路を提供する。腎臓では、アクアポリン4が構成的に発現される。アクアポリン4は、星状細胞において発現され、中枢神経系に直接的に侵襲することにより上方調節される。アクアポリン7は、脂肪細胞において発現されるグリセロールチャネルであり、脂肪分解において役割を果たすと報告された。

10

【0129】

糖尿病に関連するRas関連（Rrad）

Rradは、29-kDタンパク質およびRasゲアノシン三リン酸スーパーファミリーのメンバーである。RradのメッセンジャーRNAは、主に骨格および心筋において発現され、正常個体と比較してII型糖尿病の筋肉において平均8.6倍増大する。骨格筋におけるRrad mRNAのレベル上昇は、ヒト糖尿病患者におけるインスリン抵抗性に関連すると報告しているものもある。

20

【0130】

ケモカイン（C-X-Cモチーフ）リガンド9（CXCL9）

CXCL9は、ガンマインターフェロンにより誘導されるモノカイン（MIG）としても公知であるCXCKモチーフに属する小型サイトカインである。CXCL9は、IFN-γにより誘導されるT細胞化学誘引物質である。それは、CXCL10およびCXCL11と称される2つのその他のCXCKモチーフに密接に関係し、その遺伝子は、ヒト第4染色体上のCXCL9に関する遺伝子の近くに位置する。CXCL9、CXCL10およびCXCL11は、全てケモカイン受容体CCR3と相互作用することによりその走化性機能を誘発する。

【0131】

ケモカイン（C-Cモチーフ）リガンド8（CCL8）

30

CCL8は、かつて単球走化性タンパク質-2（MCP-2）と称されたCCケモカインファミリーに属する小型サイトカインである。CCL8タンパク質は、109個のアミノ酸を含有する前駆体として生成され、それは切断されて75個のアミノ酸を含有する成熟CCL8を生成する。CCL8に関する遺伝子は3個のエクソンによりコードされ、ヒトの第17q11.2染色体上のCCケモカインの大きなクラスタ内に位置する。MCP-2は、肥満細胞、好酸球および好塩基球（アレルギー応答に関する）ならびに炎症応答に関する単球、T細胞およびNK細胞を含む多くの様々な免疫細胞に関して走化性であり、それらを活性化する。CCL8は、ケモカイン受容体と称されるいくつかの異なる細胞表面受容体に結合することによりその効果を誘発する。これらの受容体には、CCR1、CCR2BおよびCCR5が含まれる。

40

【0132】

タンパク質ホスファターゼ1、調節（阻害剤）サブユニット3G（Ppp1r3g）

タンパク質ホスファターゼ1（PP1）は、その触媒性サブユニット（PP1c）と50を超える、異なる、確立されたまたは推定される調節サブユニットとの相互作用を介して非常に多様な細胞機能を調節する主要な真核生物タンパク質セリン／スレオニンホスファターゼである。Ppp1r3gは、PP1のグリコーゲン結合領域をターゲティングする新たに同定された調節サブユニットである。それはPP1との相互作用を媒介する正準-RVxF-モチーフ、およびグリコーゲンをターゲティングし、PP1基質との相互作用を促進するための推定モジュールを含有する。

【0133】

50

アポリポタンパク質 (A p o A - I、A p o A - I I および A p o B)

アポリポタンパク質は、血漿リポタンパク質の構成要素である脂質結合タンパク質であり、食事性脂質を、血流を介して腸から肝臓へ、および内因的に合成された脂質を、肝臓からそれらを貯蔵する（脂肪細胞）、それらを代謝する（筋肉、心臓、肺）、またはそれらを分泌する（乳房）ことができる組織に輸送する超顯微鏡的球形粒子ある。アポリポタンパク質の両親媒性特性は、リポタンパク質の疎水性脂質構成要素を可溶化するが、アポリポタンパク質はまた酵素補助因子、受容体リガンドならびにリポタンパク質の血管内代謝およびその最終的な組織取り込みを調節する脂質移動キャリアとしても提供される。

【 0 1 3 4 】

アポリポタンパク質の 5 つの主要なクラスおよびいくつかのサブクラスが存在する： A (a p o A - I、a p o A - I I、a p o A - I V および a p o A - V) ; B (a p o B 108 および a p o B 100) 、 C (a p o C - I、a p o C - I I、a p o C - I I I および a p o C - I V) ; D、E、H および J 。アポリポタンパク質の数百の遺伝子多型が記載されており、その多くはその構造および機能を改変する。

10

【 0 1 3 5 】

腸におけるアポリポタンパク質合成は、主に食事の脂肪含量により調節される。肝臓におけるアポリポタンパク質合成は、食事組成、ホルモン（インスリン、グルカゴン、チロキシン、エストロゲン、アンドロゲン）、アルコール摂取および種々の薬物（スタチン系、ニコチン酸およびフィブリシン酸）を含む多数の因子により制御される。

20

【 0 1 3 6 】

線維芽細胞成長因子 21 (F G F - 21 または F G F 21)

線維芽細胞成長因子 (F G F) タンパク質は、種々の細胞型の成長および分化を調節するシグナリング分子のファミリーに属する。 F G F - 21 は肝臓において選択的に発現されることが報告されている (N i s h i m u r a ら、 B i o c h i m i c a e t B i o p h y s i c a A c t a 1492 : 203 - 206 (2000) ; W O 第 01 / 36640 号 ; および同 W O 第 01 / 18172 号) 。ヒト F G F - 21 遺伝子および対応する遺伝子発現生成物は、米国特許出願第 20070238657 号に記載される。 F G F 21 は虚血性血管疾患、創傷治癒および肺、気管支または肺胞細胞機能の喪失に関する疾患、ならびに非常に多くのその他の障害のための処置として記載されている。さらに最近では、 F G F - 21 はインスリンの存在下および不在下での処置後のマウス 3 T 3 - L 1 脂肪細胞におけるグルコースの取り込みを刺激し、 o b / o b および d b / d b マウスならびに 8 週齢 Z D F ラットにおいて用量依存的な様式で食後および空腹時血中グルコース、トリグリセリドおよびグルカゴンレベルを低下させることができることが示されており、故に、糖尿病および肥満を処置するための治療としての F G F - 21 の使用に関する基礎が提供される (W O 第 03 / 011213 号) 。 F G F 21 を上方調節することの潜在的なその他の利点には、例えば、いくつかの栄養における相対的欠損を招き得る基質代謝における変化から生じる不安定な代謝亢進状態を経験するもののような重病患者における死亡率および罹患率を低減させることができる。一般的には、不安定な代謝亢進状態では脂肪および筋肉の双方の酸化が増大する。加えて F G F - 21 は例えば全身性炎症反応症候群または呼吸促迫を経験する患者における死亡および罹患の危険性を低減させてるので、重病患者は F G F - 21 の増大から利益を享受し得る。

30

【 0 1 3 7 】

4 . スクリーニングアッセイ

その他の態様では、本発明はサーチュイン活性を変調する化合物を同定するための方法を提供する。アッセイは、サーチュインタンパク質を発現する細胞を被験化合物と接触させること、および 1 つ以上のサーチュインバイオマーカー（例えば表 1 に示される 1 つ以上のバイオマーカー）の発現レベルを決定することを含むことができる。特定の実施態様では、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイは、表 1 にて示される 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 10 、 15 、 20 、 25 またはそれより多いサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することを伴うことができる。

40

50

【0138】

特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、表1(図1)に示される1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの検出を伴う。代表的な実施態様では、本明細書に記載される方法は1つ以上の以下のサーチュインバイオマーカーの発現レベルの検出を伴うことができる：M C P - 1、B M P 受容体 1 A、S m p d 1 3 a、C D 1 4、A p o E、F A S、トランスサイレチン、F A B P 1(肝臓)、アシル-C o Aチオエステラーゼ1、アシル-C o Aチオエステラーゼ2、アクアポリン4、R r a d、C X C L 9、C C L 8、P p p 1 r 3 g、A p o A - I、A p o A - I I、A p o B またはF G F 2 1。特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、M C P - 1の発現レベルの検出を伴う。特定の実施態様では、本明細書に記載される方法はF G F 2 1の発現レベルの検出を伴う。

【0139】

単に一例として、対照と比較して、被験化合物との接触時の細胞におけるM C P - 1 発現の増大は、サーチュイン活性を活性化する被験化合物の指標である。これに代えて、対照と比較して被験化合物との接触時の細胞におけるM C P - 1 発現の低下は、サーチュイン活性を阻害する被験化合物の指標である。表1(図1)に示されるその他のバイオマーカーまたはその組み合わせを用いて類似の方法を行うことができる。表1は、サーチュイン活性化化合物の存在下でバイオマーカー発現に及ぼす影響を示すため、被験化合物がサーチュイン活性化効果を有する本明細書に記載されるアッセイにおいて類似の効果が予期されるであろう。同様に、被験化合物がサーチュイン阻害効果を呈する場合、表1に示されるものに発現に及ぼす反対の効果が予期されるであろう。

【0140】

バイオマーカーのm R N A レベル、タンパク質レベル、活性レベルまたはバイオマーカーの遺伝子もしくはタンパク質発現データに反映されるかもしくはそこから誘導されるその他の量により、サーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定することができる。サーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定するための代表的な方法を本明細書の実施例の項にて提供する。サーチュインバイオマーカーのR N A またはタンパク質生成物の量を決定するための標準的な方法および組成物を利用することができる。かかる方法および組成物を前記で詳細に記載した。

【0141】

特定の実施態様では、本明細書に記載される細胞基盤のアッセイは、サーチュインタンパク質を内因的に発現する細胞を利用することができる。これに代えて、細胞がサーチュインを発現するように操作することができる（例えば宿主細胞のゲノムへのサーチュイン遺伝子の組み込み、サーチュイン配列を含有するプラスミドからの発現等）。特定の実施態様では、本明細書に記載されるアッセイにおいて有用な細胞は表1に列挙される少なくとも1つのサーチュインバイオマーカー（またはその相同体）を内因的に発現する。その他の実施態様では、表1に列挙される1つ以上のサーチュインバイオマーカーを発現するように細胞を操作することができる。当該分野において周知の技術を用いて細胞を操作して、サーチュイン、サーチュインバイオマーカーまたはその他の配列を発現させることができる。かかる技術の実例には、限定するものではないが、リン酸カルシウム沈殿（例えばG r a h a m およびV a n d e r E b、V i r o l . 5 2 : 5 4 6 (1 9 7 8)）、デキストラン媒介トランスフェクション、リン酸カルシウム媒介トランスフェクション、ポリブレン媒介トランスフェクション、プロトプラスト融合、エレクトロポレーション、リポソーム中の核酸の封入、および核酸の核への直接マイクロインジェクションが含まれる。

【0142】

サーチュインタンパク質は、サーチュインデアセチラーゼタンパク質ファミリー、または好ましくは酵母S i r 2 (ジエンバンク受け入れ番号P 5 3 6 8 5)、線虫(C . e l e g a n s) S i r - 2 . 1 (ジエンバンク受け入れ番号N P 5 0 1 9 1 2)、ならびにヒトS I R T 1 (ジエンバンク受け入れ番号N M 0 1 2 2 3 8 およびN P 0 3 6 3)

70 (またはAF083106)) およびSIRT2 (ジェンバンク受け入れ番号NM012237、NM030593、NP036369、NP085096 およびAF083107) タンパク質を含むSir2ファミリーのメンバーを指す。その他のファミリーメンバーには、「HST遺伝子」(Sir2の相同体(homologues of Sir two))、HST1、HST2、HST3 およびHST4と称される4つのさらなる酵母Sir2様遺伝子、ならびに5つのその他のヒト相同体hSIRT3、hSIRT4、hSIRT5、hSIRT6 およびhSIRT7 (Brachmannら、Genes Dev. 9: 2888 (1995) およびFryeら、BBRC 260: 273 (1999)) が含まれる。相同体、例えば、前記のもののオルソログおよびパラログ、ドメイン、フラグメント、変異体ならびに誘導体を本明細書に記載される方法にしたがって使用することもできる。
10

【0143】

代表的な実施態様では、本明細書に記載される方法を用いてSIRT1タンパク質の活性を決定することができる。SIRT1タンパク質はサーチュインデアセチラーゼのSir2ファミリーのメンバーを指す。1つの実施態様では、SIRT1タンパク質には酵母Sir2 (ジェンバンク受け入れ番号P53685)、線虫(C. elegans)Sir-2.1 (ジェンバンク受け入れ番号NP501912)、ヒトSIRT1 (ジェンバンク受け入れ番号NM012238またはNP036370 (またはAF083106))、およびヒトSIRT2 (ジェンバンク受け入れ番号NM012237、NM030593、NP036369、NP085096 またはAF083107) タンパク質、ならびにその等価物およびフラグメントが含まれる。別の実施態様では、SIRT1タンパク質にはジェンバンク受け入れ番号NP036370、NP501912、NP085096、NP036369またはP53685に示されるアミノ酸配列からなるか、または本質的にそれらからなる配列を含むポリペプチドが含まれる。SIRT1タンパク質にはジェンバンク受け入れ番号NP036370、NP501912、NP085096、NP036369またはP53685に示されるアミノ酸配列；1～約2、3、5、7、10、15、20、30、50、75以上の保存アミノ酸置換を有するジェンバンク受け入れ番号NP036370、NP501912、NP085096、NP036369またはP53685に示されるアミノ酸配列；ジェンバンク受け入れ番号NP036370、NP501912、NP085096、NP036369またはP53685に少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列およびその機能的フラグメントの全てまたは一部を含むポリペプチドが含まれる。SIRT1タンパク質にはジェンバンク受け入れ番号NP036370、NP501912、NP085096、NP036369またはP53685の相同体 (例えばオルソログおよびパラログ)、変異体またはフラグメントもまた含まれる。
20
30

【0144】

1つの実施態様では、本明細書に記載される方法を用いて、SIRT3タンパク質の活性を決定することができる。SIRT3タンパク質は、サーチュインデアセチラーゼタンパク質ファミリーのメンバーおよび/またはSIRT1タンパク質の相同体を指す。1つの実施態様では、SIRT3タンパク質にはヒトSIRT3 (ジェンバンク受け入れ番号AAH01042、NP036371またはNP001017524) およびマウスSIRT3 (ジェンバンク受け入れ番号NP071878) タンパク質、ならびにその等価物およびフラグメントが含まれる。別の実施態様では、SIRT3タンパク質には、ジェンバンク受け入れ番号AAH01042、NP036371、NP001017524またはNP071878に示されるアミノ酸配列からなるか、または本質的にそれらからなる配列を含むポリペプチドが含まれる。SIRT3タンパク質には、ジェンバンク受け入れAAH01042、NP036371、NP001017524またはNP071878に示されるアミノ酸配列；1～約2、3、5、7、10、15、20、30、50、75以上の保存アミノ酸置換を有するジェンバンク受け入れ番号AAH0
40
50

1042、NP 036371、NP 001017524またはNP 071878に示されるアミノ酸配列；ジェンバンク受け入れ番号AAH01042、NP 036371、NP 001017524またはNP 071878に少なくとも60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列およびその機能的フラグメントの全てまたは一部を含むポリペプチドが含まれる。SIRT3タンパク質には、ジェンバンク受け入れ番号AAH01042、NP 036371、NP 001017524、またはNP 071878の相同体（例えばオルソログおよびパラログ）、変異体またはフラグメントも含まれる。

【0145】

別の実施態様では、サーチュインの生物学的に活性な部分を本明細書に記載される方法にしたがって使用することができる。サーチュインの生物学的に活性な部分は、脱アセチル化する能力のような生物学的活性を有するサーチュインタンパク質の一部を指す。サーチュインの生物学的に活性な部分は、サーチュインのコアドメインを含むことができる。NAD⁺結合ドメインおよび基質結合ドメインを包含するジェンバンク受け入れ番号NP

036370を有するSIRT1の生物学的に活性な部分は、例えば、限定するものではないが、ジェンバンク受け入れ番号NP 036370のアミノ酸62～293を含むことができ、それはジェンバンク受け入れ番号NM 012238のヌクレオチド237～932によりコードされる。したがって、この領域は、コアドメインと称されることもある。SIRT1のその他の生物学的に活性な部分もまた時にコアドメインと称され、ジェンバンク受け入れ番号NP 036370の約アミノ酸261～447（それはジェンバンク受け入れ番号NM 012238のヌクレオチド834～1394によりコードされる）；ジェンバンク受け入れ番号NP 036370の約アミノ酸242～493（それはジェンバンク受け入れ番号NM 012238のヌクレオチド777～1532によりコードされる）；またはジェンバンク受け入れ番号NP 036370の約アミノ酸254～495（それはジェンバンク受け入れ番号NM 012238のヌクレオチド813～1538によりコードされる）を含む。別の実施態様では、サーチュインの生物学的に活性な部分は、ミトコンドリアマトリックスプロセシングペプチダーゼ（MPP）および/またはミトコンドリアインターメディエートペプチダーゼ（MIP）での切断により生成されるSIRT3タンパク質のフラグメントでよい。

【0146】

本明細書で提供されるアッセイにしたがって有用な細胞は、原核細胞または真核細胞のいずれかでよい。代表的な実施態様では、宿主細胞は、サーチュインタンパク質および表1に列挙される1つ以上のサーチュインバイオマーカーを内因的に発現する培養された哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞である。特定の実施態様では、細胞は、培養物中に懸濁され得るか、または非ヒト動物内に含有され得る。例えば、推定サーチュイン変調化合物を非ヒト動物に投与すること、該動物から生物学的試料入手すること、および生物学的試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することによりアッセイを実施することができる。非ヒト動物は、例えば、サーチュイン媒介疾患もしくは障害の動物モデルまたは正常な動物でよい。加えて、ヒト対象を含む哺乳動物のような対象からの生物学的試料中に含有される細胞を用いてアッセイを実施することができる。例えば、生物学的試料をサーチュイン変調化合物で処置された対象から取り出すことができ、次に試料中の1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定することができる。対象は、例えば、サーチュイン媒介疾患もしくは障害を患っているヒト対象、またはサーチュイン媒介疾患もしくは障害の動物モデルでよい。

【0147】

その他の実施態様では、核酸の翻訳および場合によっては転写を許容する任意の細胞不含抽出物を本明細書に記載される方法にしたがって使用することができる。細胞不含抽出物を任意の起源の細胞から単離することができる。細胞不含翻訳抽出物をヒト細胞、培養マウス細胞、培養ラット細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、アフリカツメガエル卵母細胞、ウサギ網状赤血球、コムギ胚芽またはライムギ胚（例えば、Krie

10

20

30

40

50

g および Melton、Nature 308: 203 (1984) および Dignamら、Methods Enzymol. 182: 194 - 203 (1990) 参照) から単離することができる。これに代えて、細胞不含翻訳抽出物、例えばウサギ網状赤血球ライゼートおよびコムギ胚芽抽出物を例えば Promega (マジソン、ウィスコンシン州) から商業的に購入することができる。代表的な実施態様では、細胞不含抽出物は例えば HeLa 細胞またはリンパ球のようなヒト細胞から単離された抽出物である。

【0148】

特定の実施態様では、サーチュイン変調化合物を同定するために本明細書に記載される方法はサーチュイン活性化可能な細胞系を利用することができる。サーチュイン活性化可能な細胞系は、相対的に低い内因性レベルの 1 つ以上のサーチュインタンパク質 (例えば細胞におけるサーチュイン活性の量が飽和しておらず、活性の増大を観察できる) ならびに相対的に低いレベルのミトコンドリアおよび / または酸化的リン酸化能力 (例えば細胞におけるミトコンドリアおよび / または酸化的リン酸化の量が飽和しておらず、ATP レベルの増大を観察できる) を含む。サーチュイン活性化可能な細胞系の実例には例えばNCI-H358 および MCS7 が含まれる。

10

【0149】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるスクリーニング方法は被験化合物の存在下での 1 つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを対照と比較することを伴う。種々の実施態様では、対照は、被験化合物の不在下で行われる重複アッセイ、または公知のサーチュイン変調活性を有する被験化合物 (例えば活性化因子、阻害剤またはサーチュイン変調活性を有さない化合物) の存在下で行われる重複アッセイでよい。なおその他の実施態様では、対照はデータベースにおける参照番号でよい。

20

【0150】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるスクリーニングアッセイは、レポーター遺伝子基盤のアッセイを用いてサーチュイン変調化合物を同定することができる。例えばサーチュインバイオマーカーの上流調節配列の制御下でレポーター遺伝子を用いてサーチュインバイオマーカーの発現に及ぼす被験化合物の効果を決定し、それよりサーチュイン活性に及ぼす被験化合物の影響を反映することができる。特に、方法は、例えば (a) サーチュインバイオマーカーの調節エレメント (例えばプロモーター / エンハンサー要素) に作動可能なように連結されたレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構築物を発現する細胞を被験化合物と接触させる工程 ; (b) 該レポーター遺伝子の発現を測定する工程 ; および (c) (a) における量を被験化合物と接触させていない対応する対照細胞において存在する量と比較して、発現されたレポーター遺伝子の量が対照細胞における量と相対して改変される場合、サーチュイン活性を変調する化合物を同定する工程 ; を含むことができる。別の実施態様では、サーチュイン変調を同定するための方法は : (a) 細胞不含抽出物およびサーチュインバイオマーカーの調節エレメント (例えばプロモーター / エンハンサー要素) に作動可能なように連結されたレポーター遺伝子を含むレポーター遺伝子構築物を被験化合物と接触させる工程 ; (b) 該レポーター遺伝子の発現を測定する工程 ; および (c) (a) における量を被験化合物と接触させていない対応する対照において存在する量と比較して、発現されたレポーター遺伝子の量が対照における量と相対して改変される場合、サーチュイン変調化合物を同定する工程 ; を含むことができる。

30

【0151】

当業者に周知の任意のレポーター遺伝子を本明細書に記載される方法にしたがって使用することができる。レポーター遺伝子は、その存在 (例えば RT - PCR 、ノーザンプロット、ウェスタンプロット、ELISA 等) または活性のいずれかにより容易に検出可能である RNA 転写物またはタンパク質をコードするヌクレオチド配列を指す。レポーター遺伝子の非限定例には、例えば、クロラムフェニコールアセチルトランスクレオチド (CAT ; 放射活性アセチル基をクロラムフェニコールに移行させる、または薄層クロマトグラフィーおよびオートラジオグラフィーによる検出) 、ベータガラクトシダーゼ (GAL 50

40

50

; 無色ガラクトシドを加水分解して着色生成物を生じる)、ベータグルクロニダーゼ (GUS; 無色グルクロニドを加水分解して着色生成物を生じる)、ルシフェラーゼ (LUC; ルシフェリンを酸化してフォトンを放出する)、緑色蛍光タンパク質 (GFP; 基質を伴わない蛍光タンパク質)、分泌型アルカリ性ホスファターゼ (SEAP; 適当な基質との、または発色団を作成する基質との発光反応)、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP; 酸化水素の存在下、3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジンを酸化して着色複合体を形成する) およびアルカリ性ホスファターゼ (AP; 適当な基質との、または発色団を作成する基質との発光反応) が含まれる。適当なレポーター遺伝子に関するヌクレオチド配列を、例えば、文献またはジェンバンクのようなデータベースから入手することができる。本明細書に記載される方法にしたがって使用するのに適当なレポーター遺伝子を作成するために、ヌクレオチド配列の操作に関して当該分野において周知の方法、例えば組換えDNA技術、部位特異的変異誘発、PCR等 (例えばSambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク州(1990) およびAusubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、ニューヨーク州(1998) に記載される技術を参照のこと) を用いてレポーター遺伝子のヌクレオチド配列をサーチュインバイオマーカーに関する調節配列に連結させることができる。

10

20

30

40

50

【0152】

特定の実施態様では、本発明は1つ以上のサーチュインバイオマーカーの発現レベルを変調する化合物をスクリーニングするための方法を提供する。特定の実施態様では、本明細書に記載される方法を用いて、被験化合物の不在下でのバイオマーカー発現レベルに相対して少なくとも約2倍、3倍、5倍、10倍、15倍、20倍、25倍またはそれより多くまでサーチュインバイオマーカー発現を低下または増大させる被験化合物を同定することができる。

【0153】

本明細書に記載されるアッセイにおいて活性に関して試験されるべき被験化合物は、タンパク質 (翻訳後に修飾されたタンパク質を含む)、ペプチド (化学的または酵素的に修飾されたペプチドを含む)、または化合物のライブラリーを含む小型分子 (炭水化物、ステロイド、脂質、陰イオンまたは陽イオン、薬物、小型有機分子、オリゴヌクレオチド、抗体、および薬剤またはアンチセンス分子の遺伝子コード化タンパク質を含む) を含むことができる。被験化合物は、天然発生 (例えば天然に見出されるかまたは天然から単離される) でよいか、または非天然発生 (例えば合成、化学合成または人工) でよい。

【0154】

所望により、限定するものではないが、生物学的ライブラリー、空間的にアドレス可能な並列固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「1ビーズ1化合物」ライブラリー法、およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む、当該分野において公知の非常に多くのコンビナトリアル法のいずれかを用いて被験化合物を入手することができる。生物学的ライブラリー研究法は、ポリペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つの研究法はポリペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の小型分子ライブラリーに適用可能である。Lam、Anticancer Drug Des. 12: 145 (1997) を参照のこと。

【0155】

分子ライブラリーを合成するための方法は、当該分野において周知である (例えば、Dewittら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90: 6909 (1993); Erbら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91: 11422 (1994); Zuckermannら、J. Med. Chem. 37: 2678 (1994); Choら、Science 261: 1303 (1993); Care

11ら、*Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 33: 2059 (1994) ; Carellら、*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061 ; Gallopら、*J. Med. Chem.* 37: 1233 (1994) を参照のこと)。化合物のライブラリーを溶液中(例えば Houghten、*Biotechniques* 13: 412 - 421 (1992))、またはビーズ(Lam、*Nature* 354: 82 - 84 (1991))、チップ(Fodor、*Nature* 364: 555 - 556 (1993))、細菌もしくは胞子(Ladner、米国特許第5223409号)、プラスミド(Cullら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 1865 - 1869 (1992))、またはファージ(ScottおよびSmith、*Science* 249: 386 - 390 (1990); Devlin、*Science* 249: 404 - 406 (1990)) ; Cwirlaら、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 6378 - 6382 (1990) ; Felici、*J. Mol. Biol.* 222: 301 - 310 (1991) ; およびLadner、米国特許第5223409号)上に提示することができる。
10

【0156】

ハイスループットスクリーニングを用いて、サーチュインバイオマーカー発現またはサーチュインデアセチラーゼ活性を変調する能力に関して被験化合物をスクリーニングすることができる。多数の被験化合物を迅速にスクリーニングできるように、ハイスループットスクリーニングを用いて多くの別個の化合物を並行して試験することができる。最も広く確立された技術は、96ウェルマイクロタイタープレートを利用する。プレートに加えて、96ウェル様式に適合させるための多くの装置、材料、分注器、ロボット工学、プレート洗浄機、およびプレートリーダーが市販により入手可能である。
20

【0157】

これに代えて、フリーフォーマットアッセイまたは試料間に物理的障壁を有さないアッセイを用いることができる。フリーフォーマットを伴うアッセイは、例えば、Jayawickremel、*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 19: 1614 - 18 (1994) ; 生体分子スクリーニング(The Society for Biomolecular Screening)学会第1回年次大会(フィラデルフィア、ペンシルバニア州、1995年11月7 - 10日)で報告されたChelsky、「Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches」；およびSalmonら、*Molecular Diversity* 2: 57 - 63 (1996) に記載される。別のハイスループットスクリーニング法は、Beutelら、米国特許第5976813号に記載される。
30

【0158】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるバイオマーカーアッセイを一次アッセイとして用いて推定サーチュイン変調化合物を同定することができる。かかるアッセイは、さらに推定サーチュイン変調化合物の存在下で、サーチュインデアセチラーゼ活性に及ぼす効果を直接的に測定するさらなるインピトロアッセイをさらに含むことができる。サーチュインデアセチラーゼ活性を決定するための任意の適当なアッセイを本明細書に記載される方法にしたがって使用することができる。デアセチラーゼアッセイを用いて、サーチュインデアセチラーゼ活性を活性化する化合物、またはサーチュインデアセチラーゼ活性を阻害する化合物のいずれかを同定することができる。デアセチラーゼアッセイを細胞基盤または細胞不含様式で行うことができる。サーチュイン変異体による基質の脱アセチル化を許容する条件下でアッセイを行うことができる。特定の実施態様では、アッセイをNAD⁺の存在下で行う。
40

【0159】

脱アセチル化アッセイ法は、例えば推定サーチュイン変調化合物の存在下で少なくとも1つのアセチル化サーチュイン基質をサーチュインポリペプチドと接触させること、およびサーチュイン基質のアセチル化のレベルを決定することを伴うことができる。対照(例
50

えば被験薬剤を伴わないアッセイ、公知のサーチュイン変調活性を有する薬剤の存在下のアッセイ、サーチュイン変調活性を有さない薬剤の存在下のアッセイまたはデータベースにおける値)と比較して、推定サーチュインモジュレーターの存在下でのサーチュインによる基質の脱アセチル化のレベルの変化は、サーチュインデアセチラーゼ活性を変調する化合物の指標である。

【0160】

本明細書に記載されるバイオマーカー基盤のアッセイを用いて同定された推定サーチュイン変調化合物を任意の型の脱アセチル化と組み合わせて用いることができ、そのアッセイは、サーチュイン活性の試験を許容する。例えば推定サーチュインモジュレーターを Biomol から市販により入手可能であるアッセイ、例えば SIRT1 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-555)、SIRT2 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-556) または SIRT3 Fluorimetric Drug Discovery Kit (AK-557) (Biomol International、プリマスミーティング、ペンシルバニア州) のような蛍光基盤のアッセイと関連して用いることができる。本明細書に記載される方法に関連して用いることができるその他のアッセイ様式には、ニコチンアミド放出アッセイ (Kaeberleinら、J. Biol. Chem. 280 (17) : 17038 (2005))、FRETアッセイ (Marcotteら、Anal. Biochem. 332: 90 (2004)) および C¹⁴-NADホウ素樹脂結合アッセイ (McDonaghら、Methods 36: 346 (2005)) が含まれる。本明細書に記載されるサーチュイン変異体と併用して用いることができるなおその他のアッセイ様式には、ラジオイムノアッセイ (RIA)、シンチレーション近接アッセイ、HPLC 基盤のアッセイおよびレポーター遺伝子アッセイ (例えば転写因子標的に関する) が含まれる。その他の実施態様では、推定サーチュイン変調化合物を蛍光偏光アッセイに関連して使用することができる。蛍光偏光アッセイの実例は、本明細書に記載され、また PCT 公開 WO 第 2006 / 094239 号においても記載される。その他の実施態様では、推定サーチュイン変調化合物を質量分析基盤のアッセイに関連して使用することができる。質量分析基盤のアッセイの例は、本明細書に記載され、また PCT 出願第 PCT / US 06 / 046021 号においても記載される。

【0161】

種々の実施態様では、本明細書に記載される脱アセチル化アッセイは 1 つ以上のサーチュイン基質ポリペプチドの複数のコピーを含むサーチュイン基質プールを利用する。代表的な実施態様では、サーチュイン基質プールは同一のポリペプチド基質の複数のコピーを含む。かかるサーチュイン基質プールは溶液中で浮遊するか、またはプレート、ビーズ、フィルター等に結合したサーチュイン基質を含むことができる。浮遊するかまたは繋留されたサーチュイン基質分子の組み合わせを本明細書に記載される方法にしたがって使用することもできる。本明細書に記載される方法にしたがって使用するのに適当な基質は、例えば p53 またはヒストンのようなサーチュインタンパク質により脱アセチル化することができる任意のポリペプチドに基づいてよい。代表的な基質には、例えば BIOMOL (プリマスミーティング、ペンシルバニア州) の Fluor de Lys-SIRT1 基質が含まれる。FP および質量分析基盤のアッセイに含まれるその他の適当な基質には、例えば Ac-EE-K (ビオチン) - GQSTSSHSK (Ac) Nle STEG - K (MR121) - EE-NH₂ (配列番号: 7) および Ac-EE-K (ビオチン) - GQSTSSHSK (Ac) Nle STEG - K (5TMR) - EE-NH₂ (配列番号: 8) が含まれ、ここで K (ビオチン) はビオチン化リジン残基であり、K (Ac) はアセチル化リジン残基であり、Nle はノルロイシンであり、K (MR121) は MR121 フルオロフォアにより修飾されたリジン残基であり (励起 635 nm / 発光 680 nm)、K (5TMR) は 5TMR フルオロフォアにより修飾されたリジン残基である (励起 540 nm / 発光 580 nm)。ペプチド基質の配列は、いくつかの修飾を有する p53 に基づく。特に、アセチル化リジン残基以外の全てのアルギニンおよびロイシン残基をセリン

10

20

30

40

50

で置き換えて、脱アセチル化の不在下でペプチドをトリプシン切断され難くする。加えて、メチオニンは合成および精製の間に酸化されやすい可能性があるので、配列に天然に存在するメチオニン残基をノルロイシンで置き換える。

【0162】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるサーチュインバイオマーカー基盤のスクリーニングアッセイを二次的スクリーニングとして用いて、例えば、サーチュイン脱アセチル化アッセイを用いて同定された推定サーチュイン変調化合物をさらに特徴付けすることができる。例えば、バイオマーカーアッセイを用いて、インビトロで同定されたサーチュイン変調化合物が細胞環境でサーチュイン変調活性を有することを確認し、細胞膜透過性および／または細胞毒性についての情報を提供することができる。インビトロアッセイと比較して、バイオマーカーアッセイにおいて低レベルのサーチュイン変調活性を示す化合物は、細胞膜透過性が低い化合物または細胞膜不透過性である化合物の指標であり得る。加えて、インビトロアッセイにおいて低いサーチュイン活性化活性を示すが、細胞基盤アッセイでは、サーチュイン阻害活性を示す化合物は、細胞毒性である化合物の指標であり得る。したがって、かかる細胞基盤アッセイは治療薬の開発に有用な情報を提供するであろう。

10

【0163】

本明細書に記載される方法にしたがって選択され得るサーチュインバイオマーカー発現を変調する化合物は、抗菌物質、抗癌剤、および種々のその他の使用のための候補化合物として有用である。例えば、サーチュイン活性化化合物の様式でサーチュインバイオマーカー発現を変調する化合物は、細胞の寿命の増大、ならびに例えば加齢もしくはストレス、糖尿病、肥満、神経変性疾患、化学療法誘発性ニューロパシー、虚血イベントに関連するニューロパシー、眼疾患および／または障害、心血管疾患、血液凝固障害、炎症および／または潮紅等に関する疾患または障害を含む多様な疾患および障害の処置および／または防御に有用であり得る。その他の実施態様では、サーチュイン阻害化合物に類似する様式でサーチュインバイオマーカーを変調する化合物は、例えばストレスに対する細胞感受性の増大、アポトーシスの増大、癌の処置、食欲の刺激および／または体重増加の刺激等を含む種々の治療適用に有用であり得る。

20

【0164】

30

5. キット

別の態様では、本発明はサーチュインバイオマーカーの発現レベルを測定し、前記されたようなサーチュイン活性を阻害または強化する化合物に関してスクリーニングするためのキットを提供する。かかるキットは、調査目的、創薬、診断目的、治療の進展のモニタリング、投薬量の最適化等に有用であり得る。

【0165】

40

特定の実施態様では、キットは、サーチュインバイオマーカー（前記されたような）の発現レベルを決定するための少なくとも1つの構成成分および少なくとも1つのサーチュイン変調化合物（前記されたような）を含むことができる。バイオマーカー検出構成成分は、サーチュインバイオマーカーに結合する抗体もしくはその抗原結合フラグメント、サーチュインバイオマーカーmRNAを特異的に增幅するPCRプライマーのセット、または結合したサーチュインバイオマーカーをコードするポリヌクレオチド配列の少なくともフラグメントを含む固体支持体（例えばマイクロアレイチップ）でよい。キットはさらに以下のうちの1つ以上を含有できる：検出標識、陽性対照、陰性対照、サーチュインタンパク質、使用説明書、反応容器、バッファー等。

【0166】

特定の実施態様では、キットは、少なくとも1つのサーチュインタンパク質および少なくとも1つのサーチュインバイオマーカー（前記されたような）を発現する細胞ならびに以下のうちの1つ以上のくを含むことができる：検出標識、陽性対照、陰性対照、使用説明書、反応容器、バッファー等。

【0167】

50

キットの各々の構成成分を組み合わせて反応に適当である最終濃度を知ることができる。さらにこれらの構成成分に加えて、キットは、反応に適当な条件を与えるバッファーを含むことができる。サーチュインバイオマーカーおよびサーチュインタンパク質を、タンパク質を安定させるその他の構成成分と組み合わせることができる。例えば、凍結乾燥後のタンパク質変性を防御するために、キット構成成分を約1% BSAおよび約1% ポリオール（例えばスクロースまたはフルクトース）の存在下で貯蔵および／または輸送することができる。

【0168】

サーチュインバイオマーカーの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも35、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50の、全てのまたは任意の組み合わせのタンパク質およびRNA生成物の発現を測定するためのキットもまた本明細書で提供される。かかるキットは、かかるタンパク質およびRNA生成物の発現を測定するために必要とされる材料および試薬を含む。具体的な実施態様では、キットはさらに：（1）生物学的試料からRNAを精製するための試薬；（2）被験核酸を作成するためのプライマー；（3）dNTPおよび／またはrNTP（予め混合されているか、または分離されているかのいずれか）、場合によっては1つ以上の独特に標識されたdNTPおよび／またはrNTP（例えばビオチン化またはCyt3もしくはCyt5ターゲティングされたdNTP）を伴う；（4）蛍光色素の化学的に活性な誘導体のような合成後標識試薬；（5）逆転写酵素、DNAポリメラーゼ等のような酵素；（6）種々のバッファー培地、例えばハイブリダイゼーションおよび洗浄バッファー；（7）スピンドカラムのような標識プローブ精製試薬および構成成分等；（8）タンパク質精製試薬；ならびに（9）シグナル作成および検出試薬、例えばストレプトアビジン-アルカリ性ホスファターゼ抱合体、化学蛍光または化学発光基質等；のような種々の方法において用いられる1つ以上のさらなる試薬を含むことができる。特別な実施態様では、キットは対照として使用するための、生物学的試料から単離された予め標識された品質管理されたタンパク質および／またはRNAを含む。

【0169】

いくつかの実施態様では、キットは、RT-PCRキットである。他の実施態様では、キットは核酸アレイおよびタンパク質アレイである。かかるキットは、少なくともサーチュインバイオマーカーの発現レベルを決定するために使用できる関連タンパク質または核酸メンバーを有するアレイおよびそのための包装手段を含むであろう。これに代えて、サーチュインバイオマーカーの発現レベルを検出するために用いられるタンパク質または核酸生成物をアレイに予め包装することができる。

【0170】

キットの各構成成分を液体形態または乾燥形態で提供することができる。サーチュインデアセチラーゼ活性の測定を阻害しない限り、当該分野において一般的に用いられるデータージェント、保存剤、バッファー等を構成成分に添加することができる。

【0171】

6. 医薬組成物

特定の実施態様では、本明細書に記載される方法は、1つ以上のサーチュイン変調化合物の対象への投与を伴うことができる。かかるサーチュイン変調化合物は、公知のサーチュイン変調化合物または本明細書に記載される方法を用いて同定されるサーチュイン変調化合物でよい。1つ以上の生理学的に許容される担体または賦形剤を用いて従来の様式でサーチュイン変調化合物を処方することができる。例えば、サーチュイン変調化合物ならびにその生理学的に許容される塩および溶媒和物を例えれば注射（例えば皮下、筋肉内、腹腔内）、吸入もしくは吹送（口または鼻のいずれかを介する）または経口、口腔内、舌下、経皮、鼻内、非経口もしくは直腸投与による投与のために処方することができる。1つの実施態様では、サーチュイン変調化合物を限局的に、標的細胞が存在する部位に、すな

10

20

30

40

50

わち具体的な組織、器官または液体（例えば血液、脳脊髄液等）に投与することができる。

【0172】

サーチュイン変調化合物を全身および局所または限局された投与を含む種々の様式の投与ために処方することができる。技術および処方を一般的には Remington's Pharmaceutical Sciences、Meade Publishing Co.、イーストン、ペンシルバニア州に見出すことができる。非経口投与用には、筋肉内、静脈内、腹腔内および皮下を含む注射が好ましい。注射用には化合物を液体溶液中、好ましくはハンクス液またはリンガー液のような生理学的に許容されるバッファー中で処方することができる。加えて、化合物を固体形態に処方し、使用の直前に再溶解または懸濁することができる。凍結乾燥形態も含まれる。

10

【0173】

経口投与用には、医薬組成物は、例えば結合剤（例えば、予めゼラチン化されたトウモロコシデンプン、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）；充填剤（例えば、ラクトース、微結晶性セルロースまたはリン酸水素カルシウム）；潤滑剤（例えばステアリン酸マグネシウム、タルクまたはシリカ）；崩壊剤（例えばジャガイモデンプンまたはデンブングリコール酸ナトリウム）；または湿潤剤（例えばラルリル硫酸ナトリウム）のような薬学的に許容される賦形剤を用いて従来の手段により調製される錠剤、ロゼンジまたはカプセルの形態を取ることができる。錠剤を当該分野において周知の方法によりコーティングすることができる。経口投与用の液体調製物は、例えば、溶液、シロップもしくは懸濁液の形態を取ることができるか、またはそれらを使用の前に水もしくはその他の適当なベヒクルで構築するための乾燥生成物として提示することができる。かかる液体調製物を懸濁化剤（例えばソルビトールシロップ、セルロース誘導体または硬化食用脂）；乳化剤（例えばレシチンまたはアラビアゴム）；非水性ベヒクル（例えばアチオンド油（*a t i o n d o i l*）、油状エステル、エチルアルコールまたは分別植物油（*f r a c t i o n a t e d v e g e t a b l e o i l s*））；および保存剤（例えばメチルもしくはプロピル-p-ヒドロキシ安息香酸またはソルビン酸）のような薬学的に許容される添加剤を用いて従来の手段により調製することができる。調製物はまた、必要に応じてバッファー塩、着香剤、着色剤、および甘味剤を含有することもできる。経口投与のための調製物を適当に処方して活性化合物の放出制御を付与することができる。

20

【0174】

吸入による投与のために（例えば肺送達）、適当な噴霧剤、例えば、ジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、二酸化炭素またはその他の適当なガスを使用して、加圧パックまたはネプライザーからのエアロゾルスプレイ提示の形態でサーチュイン変調化合物を都合良く送達することができる。加圧エアロゾルの場合、定量を送達するためのバルブを提供することにより投薬単位を決定することができる。吸入器または注入器（*i n s u f f l a t o r*）で使用するために、化合物およびラクトースまたはデンプンのような適当な粉末の粉末混合物を含有する、例えば、ゼラチンのカプセルおよびカートリッジを処方することができる。

30

【0175】

注射による、例えば、ボーラス注射または連続注入による非経口投与のためにサーチュイン変調化合物を処方することができる。注射用処方を単位投薬形態で、例えば、アンプルまたは多回投与用容器中で保存剤を添加して提示することができる。組成物は、油性または水性ベヒクル中、懸濁液、溶液またはエマルジョンのような形態を取ることができ、懸濁化剤、安定剤および/または分散剤のような処方用薬剤を含有することができる。これに代えて、使用の前に適当なベヒクル、例えば滅菌バイロジエン不含水で構築するため活性成分を粉末形態にできる。

40

【0176】

加えて、サーチュイン変調化合物をデポー調製物として処方することもできる。かかる

50

長時間作用性処方を植込み（例えば皮下または筋肉内に）または筋肉内注射により投与することができる。故に例えばサーチュイン変調化合物を適当な重合性もしくは疎水性材料（例えば許容される油中のエマルジョンとして）またはイオン交換樹脂を用いて、または難溶性誘導体として、例えば難溶性塩として処方することができる。放出制御処方にはパッチも含まれる。

【0177】

特定の実施態様では、本明細書に記載される化合物を中枢神経系（CNS）への送達用に処方することができる（Begley, Pharmacology & Therapeutics 104: 29 - 45 (2004) にて概説される）。CNSへの薬物送達のための従来の研究法には：脳神経外科的計画（例えば脳内注射または脳室内注入）；血液脳関門の内因性輸送経路の1つを開発する試みの薬剤の分子操作（例えば内皮細胞表面分子に関して親和性を有する輸送ペプチドを、それ自体血液脳関門を通過することができない薬剤と組み合わせて含むキメラ融合タンパク質の生成）；薬剤の脂質溶解性を増大させるために設計された薬理学的計画（例えば水溶性薬剤の脂質またはコレステロールキャリアへの抱合）；および高浸透圧性崩壊による血液脳関門の完全性の一過性の崩壊（マンニトール溶液の頸動脈への注入またはアンギオテンシンペプチドのような生物学的に活性な薬剤の使用の結果として）；が含まれる。

10

【0178】

1つの実施態様では、本明細書に記載されるサーチュイン変調化合物を、一般的に局所薬物投与に適している局所用担体を含有し、当該分野において公知の任意のかかる材料を含む局所用処方に組み込む。局所用担体は望ましい形態で、例えば軟膏、ローション、クリーム、マイクロエマルジョン、ゲル、油、溶液等として組成物を提供するために選択され、天然発生または合成起源のいずれかの材料からなってよい。選択された担体は活性薬剤または局所用処方のその他の構成成分に有害な影響を及ぼさないことが好ましい。本明細書での使用に適当な局所用担体の実例には、水、アルコールおよびその他の無毒性有機溶媒、グリセリン、鉱物油、シリコン、黄色ワセリン、ラノリン、脂肪酸、植物油、パラベン、ワックス等が含まれる。

20

【0179】

医薬組成物（化粧用調製物を含む）は重量で約0.00001~100%、例えば、0.001~10%または0.1%~5%の本明細書に記載される1つ以上のサーチュイン変調化合物を含むことができる。特定の局所用処方では、活性薬剤は、処方のおよそ0.25重量%~7.5重量%の範囲の、好ましくは、処方のおよそ0.25重量%~3.0重量%の範囲の、さらに好ましくは、処方のおよそ0.5重量%~1.5重量%の範囲の、最も好ましくは、処方のおよそ1.0重量%~10重量%の範囲の量で存在する。

30

【0180】

眼の症状を、例えば、サーチュイン変調化合物の全身、局所、眼内注射により、またはサーチュイン変調化合物を放出する徐放装置の挿入により処置または防御することができる。化合物が十分な時間、眼球表面との接触を維持して、化合物が眼の角膜および内部領域、例えば前眼房、後眼房、硝子体、眼房水、硝子体液、角膜、虹彩／毛様体、水晶体、脈絡膜／網膜および強膜に浸透することを可能にするように、サーチュイン変調化合物を薬学的に許容される眼科用ベヒクル中で分配することができる。薬学的に許容される眼科用ベヒクルは、例えば、軟膏、植物油またはカプセル化材料でよい。これに代えて、化合物を硝子体液および眼房水に直接注射することができる。さらなる代替では、眼の処置のために静脈内注入または注射によるよう、化合物を全身的に投与することができる。

40

【0181】

本明細書に記載されるサーチュイン変調化合物を当該分野における公知の方法にしたがって酸素不含の環境で貯蔵することができる。例えばレスベラトロールまたはその類似体を経口投与用に Pfizer, Inc. の Capsule 形態のような気密カプセルで調製することができる。

【0182】

50

サーチュイン変調化合物の毒性および治療効果を、細胞培養および実験動物における標準的な薬学的手順により決定することができる。LD₅₀は集団の50%致死用量である。ED₅₀は集団の50%で治療的に有効な用量である。毒性および治療効果の間の用量比(LD₅₀/ED₅₀)は、治療指数である。大きな治療指数を呈するサーチュイン変調化合物が好ましい。毒性副作用を呈するサーチュイン変調化合物を使用することはできるが、非感染細胞に対する損傷の可能性を最小にし、それにより副作用を低減させるために、影響を受ける組織の部位にかかる化合物をターゲティングする送達系を設計するのに注意を払わなければならない。

【0183】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータを、ヒトにおける使用のための範囲の投薬量を処方するのに使用することができる。かかる化合物の投薬量は毒性をわずかしか、または全く有さないED₅₀を含む循環濃度の範囲内にあってよい。用いられる投薬形態および利用され投与経路に依存して、この範囲内で投薬量を変えることができる。任意の化合物に関して、最初に細胞培養アッセイから治療上有効な用量を推定することができる。用量を動物モデルにおいて処方して、細胞培養において決定されるようなIC₅₀(すなわち病徵の最大半量の阻害を達成する被験化合物の濃度)を含む循環血漿濃度範囲を達成することができる。かかる情報を用いてさらに正確にヒトにおける有用な用量を決定することができる。例えば高速液体クロマトグラフィーにより血漿中のレベルを測定することができる。

【0184】

ここで本発明を一般的に記載しているが、本発明の特定の態様および実施態様の説明の目的のためだけに含まれ、いかなるようにも本発明を限定すると意図されるものではない以下の実施例を参照することにより、それはさらに容易に理解されるであろう。

【実施例】

【0185】

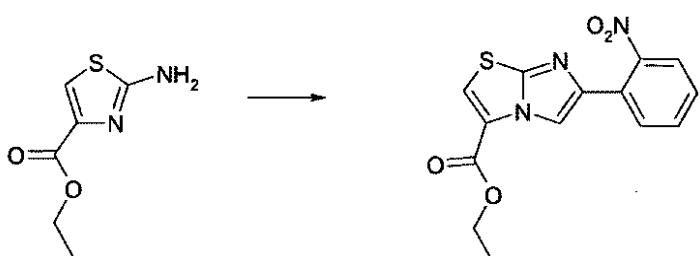
実施例1

サーチュインモジュレーターの調製

1. a 6-(2-ニトロ-フェニル)-イミダゾ[2,1-b]チアゾール-3-カルボン酸エチルエステルの調製

【0186】

【化1】



典型的な調製では、2-アミノチアゾール-4-カルボン酸エチル(2.1g、0.0123モル)を2-ブロモ-2'-ニトロアセトフェノン(3.0g、0.0123モル)と共にメチルエチルケトン(25ml)中に取った。反応混合物を還流下18時間攪拌した。次いでそれを室温まで冷却し、ろ過していくらかの固体を除去した。ろ液を濃縮して6-(2-ニトロ-フェニル)-イミダゾ[2,1-b]チアゾール-3-カルボン酸エチルエステル3.10gを得た(C₁₄H₁₂N₃O₄Sに関する計算値:318.3、[M+H]⁺実測値:319)。

【0187】

1. b [6-(2-ニトロ-フェニル)-イミダゾ[2,1-b]チアゾール-3-イル]-メタノールの調製

【0188】

10

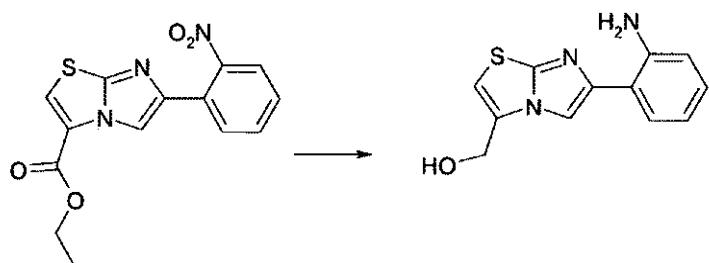
20

30

40

50

【化2】



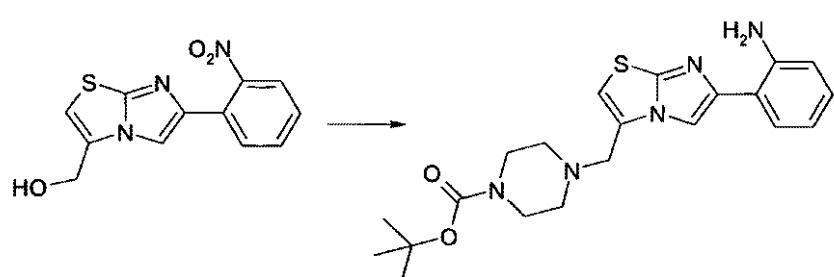
6 - (2 - ニトロ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - カルボン酸エチルエステル (1 4 . 5 0 g 、 0 . 0 4 5 8 モル) を、 N a O H (7 . 3 g 、 4 当量) を含有する T H F (1 0 0 m l) および水 (1 0 0 m l) 中に取った。反応混合物を室温で 1 8 時間攪拌した。次に、それを濃縮した。水層を C H ₂ C l ₂ で 1 回洗浄し、次に 6 N H C l で酸性にした。ろ過により固体を収集し、乾燥させて酸中間体 7 . 4 g を提供した。この材料 (7 . 4 g 、 0 . 0 2 5 6 モル) を N - メチルモルホリン (2 . 8 m l 、 0 . 0 2 5 6 モル) と共に無水 T H F (2 0 0 m l) 中に取り、 0 ℃ まで冷却した。クロロギ酸イソブチル (3 . 3 5 m l 、 0 . 0 2 5 6 モル) を添加し、反応混合物を氷浴中で 3 時間攪拌した。 N a B H ₄ (0 . 9 7 g 、 0 . 0 2 5 6 モル) を水 (3 0 m l) 中の溶液として添加した。反応混合物を 0 ℃ で 4 5 分間攪拌した。それを次いで室温まで加温し、濃縮した。水層を C H ₂ C l ₂ で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ (N a ₂ S O ₄) 、濃縮して粗製生成物を得た。クロマトグラフィーによる精製 (I s c o 、ペンタン / 酢酸エチルの混合物を使用) により [6 - (2 - ニトロ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - イル] - メタノール 5 . 2 0 g を得た (収率 7 4 %) (C ₁ H ₁ N ₃ O S に関する計算値 : 2 4 5 . 3 、 [M + H] + 実測値 : 2 4 6)。

【0189】

1 . c 4 - [6 - (2 - アミノ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - イルメチル] - ピペラジン - 1 - カルボン酸 t e r t - プチルエステルの調製

【0190】

【化3】



[6 - (2 - ニトロ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - イル] - メタノール (1 . 0 g 、 3 . 6 4 ミリモル) をトリエチルアミン (0 . 5 1 m l 、 3 . 6 4 ミリモル) と共に C H ₂ C l ₂ (1 0 0 m l) に溶解した。塩化メタンスルホニル (1 当量、 0 . 2 8 m l) を添加し、反応混合物を室温まで加温し、 1 5 分間攪拌した。それを次いでブラインでクエンチし、 C H ₂ C l ₂ で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ (N a ₂ S O ₄) 、濃縮してメシリ酸中間体を得た。この材料をトリエチルアミン (0 . 5 1 m l 、 3 . 6 4 ミリモル) および B o c - ピペラジン (6 8 0 m g 、 3 . 6 4 ミリモル) と共に C H ₃ C N (4 m l) 中に取り、室温で 1 日間攪拌した。反応混合物を濃縮し、得られた残留物を C H ₂ C l ₂ と水との間で分配した。有機層を乾燥させ (N a ₂ S O ₄) 、濃縮して生成物の実質的な定量的収率が得られた。この材料を水硫化ナトリウム水和物 (2 0 0 m g) と共にメタノール (6 m l) および水 (1 m l) 中に取った。得られた反応混合物を還流下 2 4 時間攪拌した。それを次いで室温まで冷却し、濃縮した。得られた残留物を水 (2 m l) で希釈し、 C H ₂ C l ₂ で抽出した。合わせた有機層を乾燥させ

10

20

30

40

50

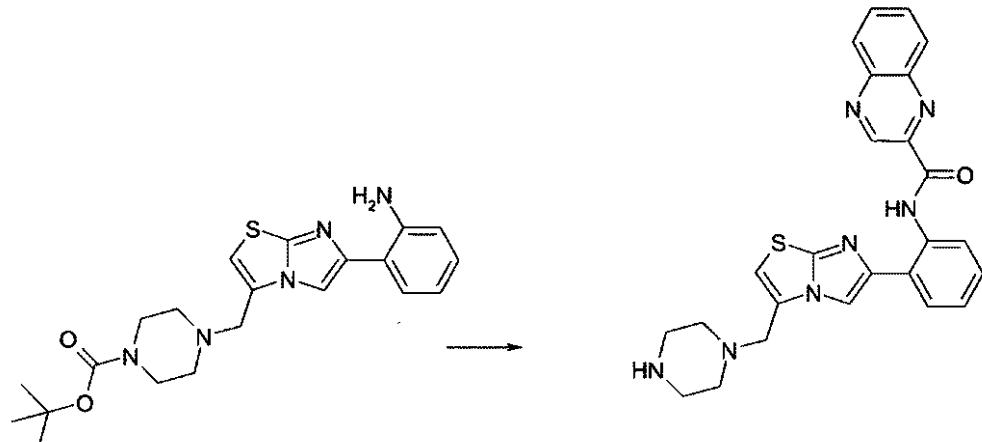
(Na₂SO₄)、濃縮して4-[6-(2-アミノフェニル)-イミダゾ[2,1-b]チアゾール-3-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル0.90gを得た(C₂₁H₂₇N₅O₂Sに関する計算値:413.5、[M+H]⁺実測値:414)。

【0191】

1.d 化合物1の調製

【0192】

【化4】



10

20

30

4-[6-(2-アミノフェニル)-イミダゾ[2,1-b]チアゾール-3-イルメチル]-ピペラジン-1-カルボン酸tert-ブチルエステル(0.25ミリモル)を塩化2-キノキサロイル1当量(50mg)と共にピリジン1ml中に取った。反応混合物をBiologeマイクロ波リアクター中で加熱した(160で10分間)。それを次いで室温まで冷却し、濃縮した。得られた粗製生成物をクロマトグラフィー(Isco、グラジエント溶出、CH₂Cl₂から95%CH₂Cl₂、4%メタノールおよび1%トリエチルアミンまで)。次いで精製された生成物をCH₂Cl₂(2ml)中25%トリフルオロ酢酸(TFA)を含有する溶液と2時間処理した。それを次いで濃縮し、得られた残留物をエチルエーテルで粉碎して望ましい生成物をTFA塩として得た(C₂₅H₂₃N₇O₅Sに関する計算値:469.5、[M+H]⁺実測値:470)。¹H-NMR(300MHz、DMSO-d₆): 13.9(br s, 1H), 9.8(br s, 1H), 9.6(br s, 1H) 8.9-7.2(m, 11H), 4.8(br s, 2H)。分析用HPLCを3.5um Eclipse XDB-C18(4.6mm×100mm)カラムを装着したAgilent 1100シリーズHPLCにおいて以下の条件で実施した:アセトニトリル/H₂O、0.1%ギ酸移動相で修飾。グラジエント溶出は5%維持(2分)、5%から95%グラジエント(11分)、95%から5%グラジエント(0.3分)、および5%維持(2.7分)、全実行時間は15分間、流速0.8ml/分であった。保持時間は3.04分であった。

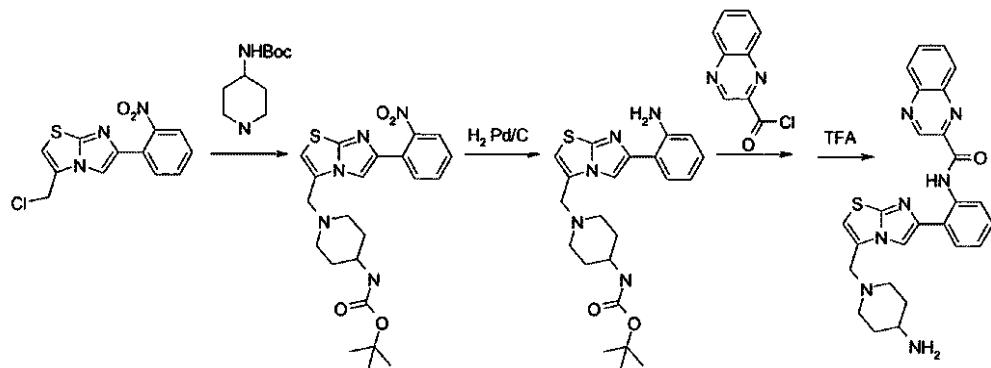
【0193】

1.e 化合物2の調製

【0194】

40

【化5】



3 ml のアセトニトリル中、3 - クロロメチル - 6 - (2 - ニトロ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール (0 . 200 ミリモル) をトリエチルアミン (140 μ l 、 1 ミリモル) で中和し、 t e r t - ブチルピペリジン - 4 - イル - カルバマート (44 mg 、 1 . 1 当量) を添加した。反応物を 110 °C で 30 分間マイクロ波加熱し、濃縮乾固した。残留物を酢酸エチル中に取り、飽和 NaHCO₃ 、水で洗浄し、 Na₂SO₄ 上で乾燥させ、濃縮乾固して { 1 - [6 - (2 - ニトロ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - イルメチル] - ピペリジン - 4 - イル } - カルバミン酸 t e r t - ブチルエステルを得た。

20

【0195】

上記の生成物をエタノール : テトラヒドロフラン 2 : 1 に溶解し、水素 (1 気圧) 下炭素 (15 mg 、触媒) 上 10 % パラジウムと共に 48 時間攪拌した。溶液を C e l i t e (商標) に通してろ過し、濃縮乾固し、 CH₂Cl₂ およびペンタンで追跡して { 1 - [6 - (2 - アミノ - フェニル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 3 - イルメチル] - ピペリジン - 4 - イル } - カルバミン酸 t e r t - ブチルエステルを赤色油状物として得た。

20

【0196】

前記のアニリンをピリジン (4 ml) に溶解し、塩化 2 - キノキサロイル (46 mg 、 1 . 2 当量) と共に室温で 18 時間攪拌した。メタノール (1 ml) を入れ、反応混合物を濃縮乾固した。 B o c 保護された生成物をシリカゲル (CH₂Cl₂ 中 0 から 5 % メタノールグラジェント) で精製し、 CH₂Cl₂ 中 25 % T F A で 1 時間処理し、濃縮乾固し、 CH₂Cl₂ / ペンタンで追跡し (3 回) 、調製用 H P L C で精製した。純粋な分画を 4 N HCl (5 滴) の存在下で凍結乾燥してキノキサリン - 2 - カルボン酸 { 2 - [3 - (4 - アミノ - ピペリジン - 1 - イルメチル) - イミダゾ [2 , 1 - b] チアゾール - 6 - イル] - フェニル } - アミドを黄色固体として得た (36 . 2 mg) 。 (M S 、 [M⁺ + H] = 484 . 2) 。

30

【0197】

実施例 2

食餌誘発肥満モデルを用いたサーチュインバイオマーカーの同定

40

2 . a 食餌誘発肥満モデル

食餌誘発肥満のマウスモデルを用いて、 2 つの化学的に関連性のないサーチュイン活性化因子での投与後のマウスにおけるサーチュインバイオマーカーを同定した。肥満および I I 型糖尿病は動物モデル、特にマウスにおいて集中的に研究されている。かかるモデルの 1 つは一般的に食餌誘発肥満 (D I O) モデルと称される。典型的には、 C 57 B L / 6 の雄に高脂肪食を 8 ~ 12 週間与えることで、結果的に肥満の軽度から中度の高血糖および糖不耐性になる。次いで、これらのマウスを用いて肥満および I I 型糖尿病の遺伝的および生理学的メカニズムを研究する。

【0198】

C 57 B L / 6 マウス 51 匹を 60 % k c a l 高脂肪食で開始する。 D I O マウスの平

50

均体重が40gになるまで、高脂肪食でおよそ7週間、週1回マウスの体重を測定する。研究を平均体重/ケージを有する群あたり18匹のマウスの3群に分ける。動物を以下のように1日1回経口投与する：レスベラトロールを2%HPMC/0.2%DOS中1000mg/kg、化合物1を2%HPMC/0.2%DOS中100mg/kgおよびベヒクル対照動物に2%HPMC/0.2%DOS。各群に関して毎週平均体重にしたがって化合物の濃度を適切な用量に調整する。典型的には、マウスに午前に投与し、16時間絶食の後には午後のみに投与する。各群を3、16および42日収集時点に関して3つの亜群に分ける。

【0199】

一旦投与を開始すると、データ収集は以下のとおりである。第3日：投与後1時間に各群からの6匹のマウスからの組織、血液およびグルコースを収集する。また残りの群から食後グルコースを取る。第13日：腹腔内糖耐性試験（IPGTT）。第16日：投与後1時間に各群からの6匹のマウスからの組織、血液およびグルコースを収集する。また残りの群から食後グルコースを取る。第28日：空腹時グルコース。第42日：投与後1時間に各群からの6匹のマウスからの組織、血液およびグルコースを収集する。

10

【0200】

2.b エンドポイント収集

白血球（WBC）収集のための最終採血ならびに肝臓、腓腹筋および精巣上体白色脂肪組織の切開。WBC試料および組織試料からの全RNAを標準的な技術で抽出する（例えばPureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System、Invitrogenカタログ番号12183-018）。

20

【0201】

2.c マウスWBCの単離

血液をクエン酸ナトリウムが入ったBD（登録商標）Vacutainer CPT（商標）細胞調製チューブ（BD REF362760）内に置く。試料を1700gで20分間遠心して赤血球（RBC）をペレット化する。WBC、血小板および血漿を含有する上澄を取り出し、氷上で保存する。次いで試料をPBSで希釈し、300g、4で15分間遠心してWBCをペレット化する。ペレットをPBSで1回洗浄し、次にWBCペレットを凍結培地（L-グルタミン含有およびフェノールレッド不含 RPMI 1640+10%（最終）DMSO）500μlに再懸濁し、用時まで凍結保存する。

30

【0202】

実施例3

Sirt1エキソビオ活性化後の遺伝子発現レベルの分析

新たに単離されたヒト白血球を2つの化学的に関連性のないSirt1活性化因子と共にエキソビオでインキュベートし、遺伝子発現における変化を決定した。

【0203】

3.a ヒトWBCの単離

全血およそ6mlを入手し（ヘパリンナトリウム含有BD（登録商標）Vacutainer CPT（商標）細胞調製チューブ（BD REF362753））、反転させて混合し、1700RCF（3100RPM）、室温で（18-25）で20分間遠心する。

40

【0204】

血漿を除去し、WBC、血小板およびいくらかの血漿を含有する細胞相を新たな管に移し、PBSで希釈し、300RCF（1200RPM）で室温で（18-25）15分間遠心する。細胞ペレットをPBSで少なくとも2回洗浄し、次に凍結培地（FBS不含）1mlに再懸濁し、用時まで-80で保存する。血液6mlは、WBC約100万~1000万個を生じ、全RNA約0.4から4μg、全細胞タンパク質4から40μgおよびSIRT1タンパク質0.015から0.15ngを含有する。

【0205】

50

3. b WBCのエキソビボインキュベーション

新たに単離されたWBCをHBSSバッファー（カルシウムおよびマグネシウムを含有するがフェノールレッド不含のハンクス平衡塩溶液、*In vitro*カタログ番号14025076）に再懸濁する。血液6～8mlから単離されたWBC、すなわちWBC約100万から1000万個にHBSS3mlを用いる。WBC懸濁液1mlを1400gで5分間遠心して細胞をペレット化する。上澄を捨て、WBCペレットを凍結し、さらなる分析まで-80℃を維持する。

【0206】

SIRT1活性化因子（Sirtuins化合物、例えば50μMレスベラトロールまたは2μM化合物2）またはベヒクル（例えばDMSO最終濃度0.25%）の入った24ウェル細胞培養プレートの1つのウェルにWBC懸濁液1mlを添加する。細胞培養プレートを穏やかにかき混ぜながら37℃および5%CO₂で2時間から20時間インキュベートする。次いで細胞懸濁液をウェルから取り出し（各ウェル/試料別個に）、1400gで5分間の遠心によりペレット化する。ペレットを凍結し、さらなる分析まで-80℃を維持する。

10

【0207】

WBC試料から全RNAを標準的な技術（例えばPureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System、*In vitro*カタログ番号12183-018）を用いて抽出する。精製されたRNAを用いてSIRT1活性化因子（またはベヒクル）に暴露されたWBC中のMCP-1（单球走化性タンパク質-1）mRNAレベルを逆転写、リアルタイムPCRで決定する。

20

【0208】

実施例4

アレイを用いる遺伝子発現分析

前記の実施例2（化合物1またはレスベラトロールのいずれかでのインビボ処理後のマウス組織）または前記の実施例3（化合物2またはレスベラトロールのいずれかでのエキソビボ処理後のヒトWBC）のいずれかから単離された全RNAを、マウスまたはヒトゲノムのいずれかに特異的なAffymetrix GeneChipを用いて分析した。具体的にはマウスゲノム分析をExpression Analysis Inc.（ダラム、ノースカロライナ州）でその全転写物基盤RNA発現プロファイリングサービスを用いて行った。ヒトゲノム分析はBeth Israel Deaconess Medical Center Genomics Center（カタログ番号900470、Human Genome U133 Plus）を用いて行った。

30

【0209】

ヒトおよびマウス遺伝子チップ分析の結果は、表1（図1）に示され、それは新たに単離されたヒトWBCを用いるインビトロ研究およびマウスモデルを用いるインビボ研究からの結果をまとめた。ヒトWBCをレスベラトロールまたは化合物2で処理した；マウスモデルをレスベラトロールまたは化合物1で処理した。表1は、化合物1または化合物2およびレスベラトロールでの処理時に2倍以上大きく上方または下方に変化した発現レベルを示す43のバイオマーカーを列挙する。具体的には、その発現が双方の化合物（すなわちマウス組織で化合物1およびレスベラトロールまたはヒトWBCに関して化合物2およびレスベラトロール）での処置時に2倍を超えて上方または下方に変化したのみならず、最も堅調なまたは再現性のある応答を実証した好ましいバイオマーカー（「***」で標識）を示す。好ましいバイオマーカーはヒトWBC実験の実験全体にわたって変動性が低く最も高く倍変化したか、またはマウスインビボ実験で目的の組織における最も高い倍変化を実証したかのいずれかであった。MCP-1発現は一貫してヒトおよびマウス試料の双方において全被験化合物で少なくとも2から14倍の下方調節を示した。

40

【0210】

レスベラトロールで処置された3日肝臓における遺伝子発現の変化の全体的なパターンの分析により、1)インスリン抵抗性の低下を示唆し得る炎症性シグナリングの低下；2)

50

) グルコース恒常性およびストレス応答経路に関する肝性転写因子の活性増大；ならびに 3) 脂質代謝およびミトコンドリアバイオジェネシスを制御する P G C 1 a および P P A R ファミリーメンバーの活性増大；が実証された。3日間で肝臓に及ぼすレスベラトロールの効果は、大部分はレスベラトロールおよびカロリー制限の効果についての文献において公知のものと合致する。レスベラトロールまたは化合物 1 の後に 3 日肝臓における遺伝子発現における変化の全体的なパターンの直接比較により 1) レスベラトロールおよび化合物 1 は 3 日間の処置の後、肝臓において類似の結果を有する傾向がある；ならびに 2) これらの結果はレスベラトロールおよびカロリー制限の効果に合致することが示唆される。

【0 2 1 1】

10

実施例 5

P C R を用いる遺伝子発現分析

前記の実施例 3 (化合物 2 またはレスベラトロールのいずれかでのエキソビオ処置後のヒト W B C) から単離された全 R N A を、 M C P - 1 遺伝子および 1 8 S r R N A に特異的なオリゴプライマー対および T a q M a n プローブで逆転写、リアルタイム P C R を用いて分析した。 M C P - 1 m R N A のレベルは 1 8 S r R N A のレベルに相対して表された。ベヒクルと共にインキュベートされた W B C (2 0 時間) と比較してレスベラトロール (5 0 μ M) に暴露された W B C は M C P - 1 m R N A レベルを 5 から 6 5 7 2 倍まで低下させた。

【0 2 1 2】

20

5 . a ヒト M C P 1 オリゴ対 :

【0 2 1 3】

【数 2】

MCP1 H BP184F CAG CAG CAA GTG TCC CAA AG (配列番号 1) および

MCP1 H BP278R TGG AAT CCT GAA CCC ACT TCT G (配列番号 2).

以下のオリゴを用いてヒト M C P 1 メッセージに相当する P C R シグナルの定量化を行った：

【0 2 1 4】

【数 3】

30

MCP1 H プローブ F A M B H Q CCACTCACCTGCTGCTACTCATTACCA (配列番号

3).

5 . b マウス M C P 1 オリゴ

【0 2 1 5】

【数 4】

MCP1 M BP85F GGC TCA GCC AGA TGC AGT TAA C (配列番号 4)

および

MCP1 M BP161R GCC TAC TCA TTG GGA TCA TCT TG (配列番号 5);

40

以下のオリゴを用いてマウス M C P 1 メッセージに相当する P C R シグナルの定量化を行った：

【0 2 1 6】

【数 5】

MCP1 M プローブ F A M B H Q CCAAGGAGATCTGTGCTGACCCCAA (配列番号

6).

実施例 6

P C R を用いる F G F 2 1 発現分析

50

6. a 食餌誘発肥満モデル

実施例2で用いたような食餌誘発肥満(DIO)モデルを使用した。

【0217】

C57BL/6マウス51匹を60% kcal高脂肪食で開始する。DIOマウスの平均体重が40gになるまで、高脂肪食でおよそ7週間、週1回マウスの体重を測定する。研究を平均体重/ケージを有する群あたり18匹のマウスの3群に分ける。動物を以下のように1日1回経口投与する：レスベラトロールを2% HPMC/0.2% DOSS中1000mg/kg、化合物1を2% HPMC/0.2% DOSS中1000mg/kgおよびベヒクル対照動物に2% HPMC/0.2% DOSS。各群に関して毎週平均体重にしたがって化合物の濃度を適切な用量に調整する。典型的にはマウスに午前に投与し、16時間絶食の後の日には午後のみに投与する。投与の第3日に、投与後1時間にマウスから肝臓組織を収集する。10

【0218】

6. b エンドポイント収集

肝臓を実施例2におけるように単離する。肝臓試料からの全RNAを標準的な技術で抽出する(例えばPureLink Micro-to-Midi Total RNA Purification System, Invitrogenカタログ番号12183-018)。

【0219】

6. c FGF21発現の分析

複数の遺伝子の発現を実施例におけるマイクロアレイにより決定した。この実験で決定されたFGF21遺伝子発現を図2に示す。図2で説明されるように、FGF21 mRNAレベルはレスベラトロール処置および化合物1処置マウスにおいて対照マウスよりも著明に高い。これによりFGF21がSIRT1活性のバイオマーカーであり、FGF21 mRNAレベルの上昇がSIRT1活性の上昇を示すことが示される。20

【0220】

実施例7

SIRT1過剰発現はFGF21上方調節に至る

7. a 細胞培養

Rat H4IE肝臓の肝細胞腫細胞をATCC(#CRL-1548)から購入した。10%ウシ胎仔血清(低エンドトキシン；ベンチマーク；Gemini #100-106)を伴うDMEM(Invitrogen #11995)で補充されたDMEM中で細胞を維持した。30

【0221】

7. b H4IE細胞におけるSIRT1の過剰発現

キットVを伴うAmplaxa Nucleofector Systemを用いて、製造者のプロトコールを用いてラットH4IE細胞をトランスフェクトした。プラスミドトランスクレプションには1μg/ウェルpCMV-GFP、1μg/ウェルpCMV-SIRT1または5μg/ウェルSIRT1が含まれた。細胞をウェルあたり 2×10^6 の密度で6ウェル皿に蒔いた。トランスクレプション後24時間に細胞を収集し、タンパク質発現をイムノプロッティングにより分析した。FGF21遺伝子発現レベルをリアルタイムPCRにより測定した。40

【0222】

7. c リアルタイムPCR分析

Pure Link Micro to Midi Total RNA Purification System(Invitrogen、カタログ番号12183-018)を用いて細胞ペレットからRNAを単離した。High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems、カタログ番号4368813)を用いて精製されたRNAをcDNAに逆転写した。リアルタイムPCR反応を実施し、Applied Biosystems

10

20

30

40

50

7300 Fast Real - Time PCR Systemを用いて分析した。

【0223】

FGF21発現を各試料からの対応する18S RNA発現値に正規化した。各々の独特な処置に関して2検体ずつの試料を作成し、各試料を2検体ずつでRT-PCR用に処理した。

【0224】

RT-PCRプライマーおよびプローブをIntegrated DNA Technologiesにより合成した。ラットFGF21プローブを5'末端で6-FAM(商標)色素(6-カルボキシフルオレセイン)を用いて、3'末端でBHQ-1(Black Hole Quencher-1(商標))を用いて標識した。ラット18S RNAプローブを5'末端でJOE(6-カルボキシ-4', 5'-ジクロロ-2', 7'-ジメトキシフルオレセイン)を用いて、3'末端でBHQ-1を用いて標識した。

【0225】

図3で示されるように、FGF21遺伝子発現は対照細胞においてよりもSIRT1を過剰発現する細胞においてより高い。このデータにより、FGF21はSIRT1活性のバイオマーカーであり、FGF21レベルの上昇はSIRT1活性の上昇を示すことが確認される。

【0226】

7.d プライマーおよびプローブ配列：

ラットFGF21に関して：

20

【0227】

【数6】

プローブ: CCTGCCCTGCGTCTGCC (配列番号9)

順方向プライマー: TCAGAGAGCTGCTGCTTAAGGA (配列番号10)

逆方向プライマー: CCCC GGTTGCTGGAT (配列番号11)

ラット18S RNAに関して：

【0228】

【数7】

30

順方向: CGGCTACCACATCCAAGGAA (配列番号12)

逆方向: GAGCTGGAATTACCGCGGCT (配列番号13)

プローブ: TGCTGGCACCAAGACTTGCCCTC (配列番号14)

参考による援用

各個々の出版物または特許は参考により援用されることが具体的に、および別個に示されるかのように、以下に列挙される項目を含む本明細書にて言及される全ての出版物および特許はその全てにおいて参考により援用される。矛盾する場合、本明細書における任意の定義を含む本出願が制御するであろう。

【0229】

Institute for Genomic Research (TIGR) (www.tigr.org)および/またはNational Center for Biotechnology Information (NCBI) (www.ncbi.nlm.nih.gov)により維持されるもののような、公開データベースにおけるエンタリーに対応する受け入れ番号を参照する任意のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列もまたその全てにおいて参考により援用される。

40

【図 1 - 1】

	番号	遺伝子	受け入れ番号	Hwbc	mWBC	白色脂肪組織 (精巢上体)	筋肉 (解剖筋)	肝臓
		*** MCP-1	S69738,	下方	下方-3日-2週 (501のみ)	下方-3日-2週 (501のみ)	下方-3日-2週 (501のみ)	/
20	シンクインガーダン- バク質53-[マウス では見出されない]	BF038484	上方	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない
21	カテシソル-	NM001912	下方	/	/	/	/	/
22	カテシソル- [マウスでは見出され ない]	1.25629	下方	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない
23	Z25422 - Sce20- 様キナーゼ,MST2, STK3	Z25422	上方	/	/	/	/	/
24	カルグランュリジ- シンクインガーダン- バク質40.7- (マウス)	NM002965	下方	/	下方-3日- 2週間(3日 (cont.)まで)	上方-3日- 2週間(3日 (cont.)まで)	上方-3日- 2週間(3日 (cont.)まで)	/
25	Z25422 - Sce20- 様キナーゼ,MST2, STK3	NM017757	下方	/	/	/	/	/
26	MNDA- [マウス]	NM001033450	NM001033432	下方	/	/	/	/
9	TLR4				U93091 /上方-1720- 3日のみ)	U93091 /上方-1720- 3日のみ)	U93091 /上方-1720- 3日のみ)	/
					AP017765	AP017765	AP017765	/

FIGURE 1 (パート 1)

【図 1 - 3】

27	インターベロン誘発 性タンパク質44-[マウス では見出され ない]	NM006820	下方	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない
28	Hs.131334	B1458360	上方	/	/	/	/	/
29	非機能的葉酸BP	NM0013307	上方	/	/	/	/	/
30	MALAT1	AF001540	上方	/	/	/	/	/
31	MEF2C	BR514659	上方	/	(上方)-3日 (1, 6)	/	/	/
32	***トランサレーティ- ン-Tr-Mm.2108	Mm.2108	/	上方-3日-2週 (17.0-3日 (501)	/	/	/	下方-3日 (501のみ)
33	FABP1 - 脂肪 結合タンパク 質、肝臓-	Mm.22126	/	上方-3日-2週 (501に隣して +3日)	/	/	/	/
34	***アシル-CoA チオエステラーゼ1 (Acot1)	Mm.1978		下方-3日	/	上方-3日	/	/
35	***アシル-CoA (Acot2)	Mm.371675		下方-3日	/	上方-3日	/	/

FIGURE 1 (パート 3)

【図 1 - 4】

10	IKKb	Hs.355753	/	/	/	/	/	/
11	JNK1	Hs.138211	/	/	/	/	/	/
12	TNFa	Mm.1293	/	/	/	/	/	下方-3日 (501のみ)
13	MIF	Hs.407995	/	/	/	/	/	/
14	*** FASN	Mm.2326	/	/	/	/	/	下方-3日
15	バーシカル	NM004385	/	/	/	/	/	/
16	ApoB mRNA- エーディング3A	U03891	下方	/	/	/	/	/
17	ApoB mRNA- エーディング3B	NM004900	下方	/	/	/	/	/
18	***アシル-CoA チオエステラーゼ1 (Acot1)	BC032490	上方	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない
19	***アシル-CoA (Acot2)	NM152475	上方	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない	マウスでは 見出されない

FIGURE 1 (パート 4)

【図 1 - 2】

1	*** MCP-1 (CCL2)	Hs.303649	下方	下方-3日-2週 (501のみ)	下方-2週 (17.20のみ)	下方-2週 (501のみ)	下方-3日-2週 (501のみ)	下方-3日-2週 (501のみ)
2	*** BMP受容体 1A - Alk3	Hs.524477	上方	上方-3日	/	/	/	/
3	*** Smnpd13a - PDE 1A	AA873600	下方	上方-3日	(上方)-3日 (1,8)	/	/	/
4	*** CD14抗原	NM000591	下方	上方-3日	/	/	/	上方-3日(501 なし)、2週
5	*** ApoE	AL353867	下方	上方-3日	/	/	/	/
6	ApoC-I	NM001645	下方	(上方)1720- 3日のみ)	/	/	/	/
7	ABCA1	NM005502 AF285167	下方	(上方)1720- 3日のみ)	/	/	/	/
8	ABCG1	NM004915	下方	(上方)1720- 3日のみ)	(上方)-3日 (1,7)	/	/	/
9	TLR4	U93091 AP017765	下方	(上方)1720- 3日のみ)	(上方)-3日 (1,7)	/	/	/

FIGURE 1 (パート 2)

【図 1 - 5】

54	***アクラボリン4 (AqPn4)	Mm.250786		下方-3日 下方-2週	/	/	/	上方-3日
55	BMT受容体1B Mm.39089	Mm.39089		下方-3H	/	/	/	上方-3H 下方-2週
56	Cd21b // Cd21a /// Cd21c (ケモカイン-C-C ^E チーフリ分子-2)	Mm.220853		下方-3H	下方-3H	/	/	上方-3H 下方-2週
57	CCL28 CX3CL1	Mm.143745 Mm.163711		下方-3H	/	/	/	上方-3H 下方-3H
58	クローディン2 (Cldn2)	Mm.117068		下方-3H	/	/	/	上方-2週
59	クローディン3 (Cldn3)	Mm.158662		下方-3H	/	/	/	下方-2週
60	クローディン7 (Cldn7)	Mm.261896		下方-3H	/	/	/	下方-2週
61	Ras (糖尿病-腫瘍連する Ras関連)	Mm.29467		/	下方-3H	/	/	/
62	*** CXCL9 (ケモカイン-C-X-C モチーフ)リンド9	Mm.766		/	下方-3H	/	/	/
63								

FIGURE 1 (八→ト5)

【図 1 - 7】

64	*** CCL8 (モチーフ)リンド8	Mm.42029		/	下方-3H	/	/	/
66	リンパ球抗原86 (Lv86)	Mm.2639		/	下方-3H	/	/	/
67	CD55抗原 (C53)	Mm.316861		/	下方-3H	/	/	/
68	CD52抗原 (C52)	Mm.24130		/	下方-3H	/	/	/
69	カテプシンH (CtsH)	Mm.2277		/	下方-3H	/	/	/
70	グリムリン(Gremlin) 2相同体(Grem2)	Mm.25760		/	上方-2週	/	/	/
71	IGFBP5	Mm.309617		/	上方-2週	/	/	/
72	カドヘリック(Cdh4)	Mm.184711		/	上方-2週	/	/	/
73	ニコチンアミド- ヌクレオチド-ラーンス (Nnt)	Mm.370069		/	下方-2週	/	/	/
74	RAB GTPase 1様(Rabgap1)	Mm.25833		/	下方-2週	/	/	/

FIGURE 1 (八→ト7)

【図 1 - 6】

36	アシル-CoA チオエスチラーゼ3 (Aco3)	Mm.202331						
37	アシル-CoA チオエステラーゼ4 (Aco14)	Mm.219001						上方-3H 下方-2週
38	アブジシン (Adn)	Mm.4407						
39	ニユーロビリノ1 (Nrp1)	Mm.271145						下方-3H
40	アスベギン シブターゼ(Ans)	Mm.2942						上方-2週
41	ミドライン2(Mil2)	Mm.131097						上方-3H 下方-2週
42	硫酸脱水群素3 (Car3)	Mm.300						下方-2週
43	CPT1a	Mm.18522						上方-3H 下方-3H
44	MER2A	Mm.152788						上方-3H 下方-3H

FIGURE 1 (八→ト5)

【図 1 - 8】

45	二重特異性 ホスファターゼ9 (Disp9)	Mm.16479						
46	リバインメラーゼ (Top2b)	Mm.130362						上方-3日 下方-2週
47	CCR2 (=MCP-1 受容体)	Mm.6272						上方-3日 下方-3日
48	CXCL2 (ケモカイン-C-X-C モチーフ)リンド2	Mm.4979						上方-3H 下方-3日
49	ApoD (アポドタクシル質D)	Mm.2082						下方-3日 上方-3日
50	ERRガンマ	Mm.89989						下方-3日 上方-3日
51	エヌクリゲン受容体1 (Egr1)	Mm.9213						下方-3日 下方-3日
52	HNF4アルファ	Mm.202383						下方-3日 下方-3日
53	アシル-CoA バブリルジエ ₁ (Asbg1)	Mm.20592						下方-3日 下方-3日

FIGURE 1 (八→ト6)

【図 1 - 9】

75	副甲状腺ホルモン 受容体1 (Pthr1)	Mm_3542		/	下方-2週	/
76	クリツツル様因子2 (Kif2)	Mm_26938		/	上方-3日	/
77	IL-1α	Mm_15534		/	/	/
78	IL-6	Mm_10119		/	/	/
79	IL-12a			/	/	/
80	*** Tpp1 (r.g. (ランバク質ホスファ ターゼ、調節子、阻害 剤サブユニット 3CL Mm_44745, Q9CW07)	Mm_44745, Q9CW07		/	上方-3日、 2週	
81	*** ApoA-I	Mm_26743		上方-3日、2週	/	/
82	*** ApoA-II	Mm_258374		上方-3日、2週	/	/
83	ApoC-III	Mm_178973		上方-2週	/	/
84	*** ApoB	Mm_221239		上方-3日、2週	/	/
85	ApoH	Mm_2266		上方-2週	/	/
86	主要タンパク質1 (Mup1)	Mm_237772		上方-3日、2週	/	/

FIGURE 1 (パート9)

【図 1 - 10】

87	主要尿タンパク質2 (Mup2)	NM_031188		上方-3日、2週	/	/
88	主要尿タンパク質3 (Mup3)	Mm_250267		上方-3日、2週	/	上方-3日、 下方-2週
89	アルブミン1 (Alb1)	Mm_16773		上方-3日、2週	/	/
90	血管アロイドA1 (Saa1)	Mm_148800		上方-3日、2週	/	/
91	*** FGF21	NM_019113.2		上方-3日		

FIGURE 1 (パート10)

【図 2】

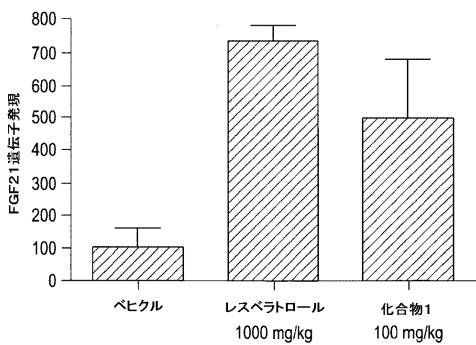


FIGURE 2

【図 3】

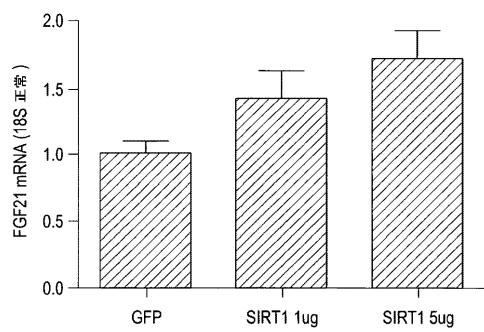


FIGURE 3

【配列表】

2010524432000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT			International application No PCT/US2008/003605												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12Q1/34 G01N33/68 C12Q1/68 G01N33/573															
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC															
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q . 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE															
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">CULLEN JOHN P ET AL: "Resveratrol, a polyphenolic phytostilbene, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion." JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH 2007, vol. 44, no. 1, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 75-84, XP002493805 ISSN: 1018-1172 abstract</td> <td style="padding: 2px;">1-3, 6-17, 53-56, 62-66, 75-80</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">Y</td> <td style="padding: 2px;">---</td> <td style="padding: 2px;">1-66, 75-80</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;"></td> <td style="padding: 2px;">-</td> <td style="padding: 2px;">--</td> </tr> </tbody> </table>				Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	CULLEN JOHN P ET AL: "Resveratrol, a polyphenolic phytostilbene, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion." JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH 2007, vol. 44, no. 1, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 75-84, XP002493805 ISSN: 1018-1172 abstract	1-3, 6-17, 53-56, 62-66, 75-80	Y	---	1-66, 75-80		-	--
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.													
X	CULLEN JOHN P ET AL: "Resveratrol, a polyphenolic phytostilbene, inhibits endothelial monocyte chemotactic protein-1 synthesis and secretion." JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH 2007, vol. 44, no. 1, 21 December 2006 (2006-12-21), pages 75-84, XP002493805 ISSN: 1018-1172 abstract	1-3, 6-17, 53-56, 62-66, 75-80													
Y	---	1-66, 75-80													
	-	--													
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.													
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the International filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed															
Date of the actual completion of the International search		Date of mailing of the International search report													
1 September 2008		12/11/2008													
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 Rosin, Oliver													

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2008/003605

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEIRO J ET AL: "Effect of cis-resveratrol on genes involved in nuclear factor kappa B signaling" INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 5, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 393-406, XP004713758 ISSN: 1567-5769 abstract	1-3, 6-17, 53-56, 62-66, 75-80
Y	PORCU M ET AL: "The emerging therapeutic potential of sirtuin-interacting drugs: from cell death to lifespan extension" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER, HAYWARTH, GB, vol. 26, no. 2, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 94-103, XP004727629 ISSN: 0165-6147 figure 4	1-66, 75-80
A	ALCENDOR RALPH R ET AL: "Silent information regulator 2alpha, a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes" CIRCULATION RESEARCH, vol. 95, no. 10, 12 November 2004 (2004-11-12), pages 971-980, XP002493806 ISSN: 0009-7330 figure 3	1-56, 62-68, 70-72, 75-81
A	DENU ET AL: "The Sir2 family of protein deacetylases" CURRENT OPINION IN CHEMICAL BIOLOGY, CURRENT BIOLOGY LTD, LONDON, GB, vol. 9, no. 5, 1 October 2005 (2005-10-01), pages 431-440, XP005086074 ISSN: 1367-5931 page 436	1
E	WO 2008/060400 A (SIRTRIS PHARMACEUTICALS INC [US]; LAAKSO MARKKU [FI]; KUULASMAA TEEMU) 22 May 2008 (2008-05-22) example 6	1-56, 62-66, 75-80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2008/003605

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.: 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:

see additional sheet

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 an 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.:

see annex

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.

International Application No. PCT/US2008/003605

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1:Claims 1-11 (in part),12 (fully),13-28 (in part),29 (fully),30-32 (in part),33-34 (fully),35-40 (in part),41-42 (fully),43-46 (in part),47-48 (fully),49-51 (in part),52 (fully),53-55 (in part),56 (fully),57-60 (in part),61 (fully),62-66 (in part),75-80 (in part)

Methods and kits for the detection of sirtuin modulation via the provision of changes in the expression levels of biomarkers specific for sirtuin modulation, wherein the biomarker is MCP-1.

Inventions 2-5,14,32-35,54,62-64,80-82,84:Claims 1-7,9-11,14-28,30-32,35-40,43-46,49-51,53-55,57-60,62-66,75-80 (all in part)

Methods and kits for the detection of sirtuin modulation via the provision of changes in the expression levels of biomarkers specific for sirtuin modulation, wherein the biomarker is BMP Receptor 1A (invention2), Smpd13a (invention 3), CD14 (invention4), ... ApoB (invention 84). (according to the numbering in table 1).

Inventions 6-13,15-31,36-53,55-61,66-79,83,85-90:Claims 1-6,9-11,14-27,30-32,35-39,43-45,49-50,53-54,57-59,62-65, 75-79,83, 85-90 (all in part)

Methods and kits for the detection of sirtuin modulation via the provision of changes in the expression levels of biomarkers specific for sirtuin modulation, wherein the biomarker is ApoC-I (invention 6), ABCA1 (invention 7), ABCG1 (invention 8), ... Serum amyloid A1 (invention 90). (according to the numbering in table 1).

Invention 91: Claims 1-6,9-11,14-27,30-32,35-39,43-45,49-50,53-54,57-59,62-66, 75-79,83, 85-90 (all in part),67-74 and 81(fully)

Methods and kits for the detection of sirtuin modulation via the provision of changes in the expression levels of biomarkers specific for sirtuin modulation, wherein the biomarker is FGF21.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2008/003605

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008060400 A	22-05-2008 US	2008249103 A1	09-10-2008

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 25/28	(2006.01)	A 6 1 P 25/28
A 6 1 P 25/00	(2006.01)	A 6 1 P 25/00
A 6 1 P 27/02	(2006.01)	A 6 1 P 27/02
A 6 1 P 9/00	(2006.01)	A 6 1 P 9/00
A 6 1 P 7/02	(2006.01)	A 6 1 P 7/02
A 6 1 P 29/00	(2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 17/00	(2006.01)	A 6 1 P 17/00
G 0 1 N 33/15	(2006.01)	G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50 Z
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72) 発明者 ボス , オリビエ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02199 , ボストン , ボイルストン ストリート 7
70 , ナンバー 26 ジー

(72) 発明者 ラブ , シバ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01605 , ウースター , スノーウィー オール レーン 13

(72) 発明者 イフラント , アンドレ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02145 , サマービル , サーストン ストリート 8
7

(72) 発明者 スミス , ジェシー ジェイ .

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02453 , ウォルサム , ビール ロード 226

(72) 発明者 ミルン , ジル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02446 - 2768 , ブルックライン , メイソン テラス 169

(72) 発明者 ジローセク , マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142 , ケンブリッジ , サード ストリート 35
0 ナンバー 2204

F ターム(参考) 2G045 BB20 CA25 CA26 CB01 CB03 CB07 CB16 DA14 DA20 DA36
DA66 FB02 FB03 FB07
4B024 AA11 CA01 CA05 CA09 CA12 CA20 HA11
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ42 QQ53 QR32 QR35
QR55 QR62 QS25 QS32 QS39 QX02
4C084 AA17 NA14 ZA022 ZA162 ZA542 ZA702 ZA892 ZB112