

(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2005-508302

(P2005-508302A)

(43) 公表日 平成17年3月31日(2005.3.31)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 7/06</b>	C O 7 K 7/06 Z N A	2 G O 4 5
<b>A61K 38/00</b>	A 6 1 K 39/395 D	2 G O 5 4
<b>A61K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 2 4
<b>A61P 37/02</b>	A 6 1 P 37/02	4 B O 6 3
<b>C07K 16/18</b>	C O 7 K 16/18	4 C O 8 4
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 81 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-510060 (P2003-510060)	(71) 出願人	501149684
(86) (22) 出願日	平成14年7月2日 (2002.7.2)		ユニバーシティ オブ バージニア パテ
(85) 翻訳文提出日	平成16年1月5日 (2004.1.5)		ント ファウンデーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/020906		アメリカ合衆国, バージニア 22903
(87) 国際公開番号	W02003/004050		-2442, シャルロットビル, スイート
(87) 国際公開日	平成15年1月16日 (2003.1.16)		1-110, ウエスト メイン ストリ
(31) 優先権主張番号	60/302, 811		ート 1224
(32) 優先日	平成13年7月3日 (2001.7.3)	(74) 代理人	100062144
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青山 稔
		(74) 代理人	100067035
			弁理士 岩崎 光隆
		(74) 代理人	100064610
			弁理士 中嶋 正二
		(74) 代理人	100072730
			弁理士 小島 一晃
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アルギニン3でのヒストンH4のメチル化

## (57) 【要約】

本発明は、ヒストンH3およびH2Aペプチドのアミノ末端の特定修飾に結合する抗体の作成に関する。より好ましくは、本発明は、ヒストン修飾カセットSGRGK(配列番号1)の種々の翻訳後修飾を認識する一群の抗体の作成を目的とし、ここで、当該修飾は、リン酸化セリン、メチル化アルギニンおよびアセチル化リシンからなる群から選択される。これらの抗体を含む組成物は、診断およびスクリーニングツールとして使用される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

5 から 20 アミノ酸のアミノ酸配列を含む抗原ペプチドであって、当該アミノ酸配列が、以下からなる群から選択される当該ペプチド：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号3)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)。

10

## 【請求項2】

抗原ペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号9)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号11)、  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号13)、および  
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号14)

からなる、請求項1の抗原性ペプチド。

20

## 【請求項3】

抗原ペプチドは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、および  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)

からなる、請求項1の抗原性ペプチド。

## 【請求項4】

請求項1のペプチドおよび医薬的に許容される担体を含む組成物。

## 【請求項5】

アジュバントを更に含む、請求項4の組成物。

30

## 【請求項6】

以下からなる群から選択されたアミノ酸配列：

Ser Gly Arg Gly Lys、(配列番号1)  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号3)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)

を含むポリペプチドに特異的に結合する精製抗体。

40

## 【請求項7】

当該抗体が、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号9)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号11)、  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号13)、および  
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号14)

を含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項6の抗体。

50

## 【請求項 8】

当該抗体が、以下からなる群から選択されるポリペプチド：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、および

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)

に特異的に結合する、請求項 7 の抗体。

## 【請求項 9】

当該抗体がモノクローナル抗体である、請求項 8 の抗体。

## 【請求項 10】

当該抗体が、配列 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu (配列番号8) に特異的に結合する、請求項 9 の抗体。 10

## 【請求項 11】

請求項 6 の当該抗体および希釈剤または医薬的に許容される担体を含む組成物。

## 【請求項 12】

当該抗体が、薬物、毒素、免疫モジュレーター、ペプチドエフェクターおよび同位元素からなる群から選択される生体活性物質に結合する、請求項 6 の抗体。

## 【請求項 13】

ユークロマチンおよびヘテロクロマチンを検出するための診断試験キットであって、以下からなる群から選択されるペプチド：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、 20

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、および

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)

に特異的に結合する抗体を含む当該キット。

## 【請求項 14】

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10) に特異的に結合する第一抗体、および Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12) に特異的に結合する第二抗体を含む請求項 13 のキット。

## 【請求項 15】

転写活性的に活性なクロマチンの領域を検出する方法であって、  
 サンプルを含むクロマチンを配列 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12) に特異的に結合する抗体と接触させること、  
 非結合および非特異的結合抗体を当該サンプルから除去すること、および  
 転写的に活性なクロマチンの領域を、それらに結合する抗体を有するクロマチンの領域を同定することにより検出すること、  
 のステップを含む当該方法。 30

## 【請求項 16】

当該抗体が標識されている、請求項 15 の方法。

## 【請求項 17】

当該抗体が蛍光マーカーで標識されている、請求項 16 の方法。

## 【請求項 18】

当該検出ステップは、当該抗体を標識二次抗体と接触させることを含み、この場合、当該二次抗体は抗免疫グロブリン抗体である、請求項 15 の方法。 40

## 【請求項 19】

有糸分裂的に活性な細胞を検出する方法であって、  
 細胞群を、配列 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10) に特異的に結合する抗体と接触させること；  
 非結合および非特異的結合抗体を細胞群から取り除くこと；および  
 有糸分裂的に活性な細胞を、当該細胞をそれに結合する抗体で同定することにより検出すること；  
 のステップを含む当該方法。 50

## 【請求項 20】

当該抗体が標識されている、請求項 19 の方法。

## 【請求項 21】

当該抗体が蛍光マーカーで標識されている、請求項 20 の方法。

## 【請求項 22】

当該検出ステップが、当該抗体を標識二次抗体と接触させることを含み、この場合、当該二次抗体は、抗免疫グロブリン抗体である、請求項 19 の方法。

## 【請求項 23】

サンプル中のメチラーゼ活性を検出する方法であって、  
メチラーゼ活性を含む可能性あるサンプルを提供すること；  
事前に決定した長さの時間、当該サンプルを、配列 Arg Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号2)を含むポリペプチドと接触させること；  
当該事前に決定した長さの時間後、当該サンプルを、請求項 6 の抗体と接触させること；  
当該サンプルに結合した当該抗体を、当該メチラーゼのレベル活性の指標として定量すること；  
のステップを含む当該方法。

10

## 【請求項 24】

当該メチラーゼが PRMT 1 である、請求項 18 の方法。

## 【請求項 25】

疾患状態と関連するクロマチン変化を検出する方法であって、  
正常および疾患組織からクロマチンを単離し、第一および第二のプールのクロマチンを作成すること；  
第一および第二のプールのクロマチンを、Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)からなる群から選択されるポリペプチドに特異的に結合する抗体と接触させること；および  
正常組織から単離した抗体結合クロマチンの染色パターンを、疾患組織から単離した抗体結合クロマチンの染色パターンと比較すること  
のステップを含む当該方法。

20

## 【請求項 26】

免疫沈降ステップ前に単離クロマチンをフラグメント化するステップを含む、請求項 25 の方法。

30

## 【請求項 27】

DNA を比較するステップが、  
第一のプールのクロマチンから単離した DNA を第一の固体表面に固定化すること；  
第二のプールのクロマチンから回収した DNA を第二の固体表面に固定化すること；  
第一および第二の固体表面を同一標識核酸配列でプローブ化すること；および  
第一のプールのクロマチンを形成する単離された固定化 DNA にのみ結合する当該配列を同定すること  
を含む、請求項 25 の方法。

## 【発明の詳細な説明】

40

## 【0001】

本願は、35U.S.C. § 119(e)の下、2001年7月3日付け米国仮特許出願番号60/302,811に基づく優先権を主張する(その開示は、本願に引用によりすべて組み込む)

## 【0002】

米国政府の権利

本発明は、National Institutes of Healthにより付与された、助成金番号GM53512、GM20039、GM37537-14 および DK55274の下、米国政府の助成により行われた。

## 【0003】

本発明の分野

本発明は、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾により作成されるヒストンエピトープに結合

50

する抗体、その抗体を含む組成物、および診断およびスクリーニングツールとしてのその組成物の使用を目的とする。

#### 【0004】

本発明の背景

真核では、DNAは、ヒストンタンパク質と複合体となり、ヌクレオソーム、クロマチンの繰り返しサブユニットを形成する。DNAのこのパッケージングは、転写または複製のようなDNAを鋳型とするプロセスでDNAへとアクセスするタンパク質探索にとって、非常に制限となる。ヒストンアミノ末端の翻訳後修飾が、真核細胞ゲノムのクロマチン構造の決定および細胞性遺伝子の発現の調節において重要な役割をすることが徐々にわかってきている。

10

#### 【0005】

ヒストンアミノ末端の翻訳後修飾は、長い間、クロマチン構造および機能の調節において中心的な役割をされると考えられてきた。ヒストンの、多くの共有結合的修飾が、報告されており、その中には、ヒストンのアミノ末端「テイル」ドメインで生ずる、アセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化(ubiquitination)、およびADPリボシル化が含まれる。修飾型の多様性およびこれらの修飾を行う残基の顕著な特異性は、不明なままである、複雑な階層の順番および組み合わせ機能を示唆する。ヒストンアミノ末端で生ずることが知られる共有結合的修飾のアセチル化は、恐らく最も研究されており、評価される。最近の研究は、クロマチン中のプロモーターを標的とするヒストンの補充に応答する該ヒストン中の特定のリシン残基をそれぞれアセチル化または脱アセチル化する、先に特性解析されたコアクチベーターおよびコリプレッサーを同定した(Berger (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11,336-341参照)。これらの研究は、クロマチンリモデリングが、ヌクレオソーム鋳型からの転写の調節において、基本的な役割をするという強力な証明を提供する。

20

#### 【0006】

高等真核生物中のクロモソームは、凝縮の程度および基礎となるDNA配列の転写活性のレベルにより識別される、ユーロマチンおよびヘテロクロマチンの領域からなると歴史的には考えられている。構造ヘテロクロマチンの特定領域は、セントロメアのような特定構造でおよびその近辺で見つかっており、殆どの遺伝学的に不活発な繰り返し配列を含んでいる。対照的に、同一の一次DNA配列を有する他の領域は、いずれかの型のクロマチンの特徴を示し得、それは、タンパク質と結合するヒストンおよびクロマチンによるDNA

30

#### 【0007】

遺伝子発現の調節は、恐らくは、近年の分子生物学の中でより集中的に研究された分野の1つであるが、すべての増殖細胞にとっての根本となるもの、その細胞が有糸分裂または減数分裂の何れにより分裂するのかは、凝縮クロモソームの正確な分離である。1997年には、ヒストンH3は、生体の広い範囲で、有糸分裂および減数分裂の間に、唯一、セリン10でリン酸化されていることが報告された(Hendzel et al., 1997; Wei and Allis, 1998; Wei et al., 1998)。セリン10(Ser10)でのH3リン酸化が有糸分裂性クロモソーム凝縮にインピボで重要な役割をするという仮説と一致して、テトラヒメナ

40

#### 【0008】

翻訳後修飾を生ずるヒストンを特異的に認識する抗体の使用により、出願人は、「ヒストンコード」を解明した。特に、証明は、ヒストンタンパク質、その伴う共有結合性修飾は、クロマチン構造を変え得る機構に寄与し、それによって、転写の「オン-オフ」の状態

50

## 【0009】

先に記載されたヒストンコードに加えて、新しいテーマは、当該分野で、ヒストン修飾が単離では殆ど機能しないようであることを証明することである。例えば、Ser10でのH3のリン酸化は、有糸分裂性クロマチンおよび転写的に活性化クロマチンに明らかに連結することを示す、「スピリットパーソナリティー」を有することが明らかである。これらの結果は、直観に反しているように思われるが、それらは、他の近辺の修飾がSer10 Phos H3と同時に作用するかどうか探索し、これらの応答を区別する動機(impetus)を提供する。酵母および哺乳類の細胞で回収された最近のデータでは、Phos(Ser10)H3は、アセチル化部位(Lys9および/またはLys4)に隣接、またはその近辺の幾らかの環境下で機能し得ることが報告されている。これらの事象の正確なオーダーの付加または非ランダム化の程度は論争中である。にもかかわらず、H3のPhos/Acetylジ修飾は、高度に保存された遺伝子誘導性応答の一部であると思われる。

10

## 【0010】

隣接アミノ酸残基の翻訳後修飾が相互作用し効果を生じ得るという事実は、特定の「ヒストン修飾カセット」が存在し、転写および複製のような基本的な遺伝的機能を調節するという観念を生ずる。ヒストン修飾カセットは、特定環境下で天然に修飾され、この場合、翻訳後修飾は、相互作用し特定の応答を与える、2つまたはそれよりも多い部位を含む一次ヒストンアミノ酸修飾を含む。本発明の1つの観点は、ヒストン4のArg3でのメチル化部位あたりを中心とする「ヒストン修飾カセット」を目的とする。

## 【0011】

ヒストンメチル化は、ヒストンに影響する、最低限理解された(least-understood)翻訳後修飾の1つである。初期の研究(work)は、H3およびH4は、メチル化により修飾された一次ヒストンであることを示唆し、バルクヒストンを用いる配列決定の研究は、幾つかのリシン(例えば、H3の9および27およびH4の20)はしばしばメチル化の好ましい部位であるが、種特異的な相違があると思われることを示している。興味深いことに、各々修飾されたリシンは、モノ-、ジ-、またはトリメチル化される能力を有し、また更なるレベルの変化をこの翻訳後修飾の「印し」に付加する。ヒストンメチル化の機能を理解する1つの主な障害は、要因である酵素についての情報の欠如である。SUUV39H1、シヨウジョウバエヘテロクロマチンタンパク質Su(var)3-9のヒト相同体は、H3-特異的メチルトランスフェラーゼであり、そして、ヒストンH3におけるリシン9(Lys9)のメチル化はヘテロクロマチンタンパク質1(HP1)の結合部位としての役割をするという証明は、ヘテロクロマチン機能においてヒストンリシンメチル化の重要性を強調する。リシン残基に加えて、ヒストンのメチル化はまた、アルギニン残基でも生じ得る。核レセプターコアクチベーター結合タンパク質、CARM1は、H3-特異的アルギニンメチルトランスフェラーゼであるという最近の証明は、ヒストンアルギニンメチル化が転写活性化に含まれ得ることを示唆する。本発明の1つの観点は、転写または有糸分裂性活性に関連する、ヒストンおよび他のDNA結合タンパク質の特定の翻訳後修飾パターンを認識する抗体を目的とする。より好ましくは、本発明は、アミノ末端のアルギニン(アミノ酸位番号3に位置する)でメチル化されたH2AおよびH4ヒストンに特異的である抗体を目的とする。

20

30

40

## 【0012】

本発明の要約

本発明は、ヒストンH3およびH2Aペプチドのアミノ末端の特定修飾物(specific modifications)に結合する抗体を目的とする。より好ましくは、本発明は、ヒストン修飾カセットの種々の翻訳後修飾を認識する一群の抗体の産生を目的とする。これらの抗体は、アミノ酸配列SGRGK(配列番号1)の種々の修飾を認識し、当該修飾は、リン酸化セリン、メチル化アルギニンおよびアセチル化リシンからなる群から選択される。さらにこれらの抗体は、ヒトの生物学および疾患と結びつき得る非ヒストンタンパク質上のエピトープを認識する。これらの抗体を含む組成物は、診断およびスクリーニングのツールとして使用される。

50

## 【0013】

本発明の詳細な説明

定義

本発明の説明および請求の範囲では、以下の用語は、以下に開示の定義に従って使用する。

## 【0014】

本明細書で用いるとき、用語「核酸」は、RNAおよび一本および二本鎖DNAおよびcDNAを含む。さらに、用語「核酸」、「DNA」、「RNA」および同様の用語はまた、核酸類似体、すなわち、別のホスホジエステルバックボーンを有する類似体を含む。例えば、当分野で既知であり、バックボーンにホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する、いわゆる「ペプチド核酸」は、本発明の範囲内であるとみなす。

10

## 【0015】

用語「ペプチド」は、3またはそれよりも多いアミノ酸の配列を含み、この場合、当該アミノ酸は、天然に生じるかまたは合成(非天然で生ずる)のアミノ酸である。ペプチド擬態物は、1つまたはそれよりも多い、以下の修飾を有するペプチドを含む：

1. 1つまたはそれよりも多いペプチジル-C(O)NR--連結(結合)が、--CH<sub>2</sub>-カルバメート連結(--CH<sub>2</sub>O-C(O)NR-)、ホスホネート連結、-CH<sub>2</sub>-スルホンアミド(-CH<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>NR--)連結、尿素(--NHC(O)NH-)連結、--CH<sub>2</sub>-二次アミン連結のような非ペプチジル連結により置換されるか、またはアルキル化ペプチジル連結(--C(O)NR-)[式中、Rは、C1-C4アルキルである]に置換されている、ペプチド、

20

2. N-末端が、--NRR<sub>1</sub>基、--NRC(O)R基、--NRC(O)OR基、--NRS(O)<sub>2</sub>R基、-NHC(O)NHR基[式中、RおよびR<sub>1</sub>は水素またはC1-C4アルキルであり、ただし、RおよびR<sub>1</sub>は両方とも水素ではない]に誘導される、ペプチド、

3. C末端が、--C(O)R<sub>2</sub>[式中、R<sub>2</sub>は、C1-C4アルコキシからなる群から選択される]、および--NR<sub>3</sub>R<sub>4</sub>[式中、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、水素およびC1-C4アルキルからなる群から独立して選択される]に誘導される、ペプチド。

## 【0016】

ペプチド中、天然に生ずるアミノ酸残基は、以下のように、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨されるように略される：フェニルアラニンはPheまたはFである；ロイシンはLeuまたはLである；イソロイシンはIleまたはIである；メチオニンはMetまたはMである；ノルロイシン(Norleucine)はNleである；バリンはValまたはVである；セリンはSerまたはSである；プロリンはProまたはPである；スレオニンはThrまたはTである；アラニンはAlaまたはAである；チロシンはTyrまたはYである；ヒスチジンはHisまたはHである；グルタミンはGlnまたはQである；アスパラギンはAsnまたはNである；リシンはLysまたはKである；アスパラギン酸はAspまたはDである；グルタミン酸はGluまたはEである；システインはCysまたはCである；トリプトファンはTrpまたはWである；アルギニンはArgまたはRである；グリシンはGlyまたはGである、およびXは任意のアミノ酸である。他の天然に生ずるアミノ酸は、例えば4-ヒドロキシプロリン、5-ヒドロキシリシンなどを經由して含まれる。

30

## 【0017】

本明細書で用いるとき、用語「保存アミノ酸置換」は、以下の5群のうちの1つの中での交換として本明細書では定義する：

40

I. 小脂肪族(small aliphatic)、非極性またはわずかに極性の残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II. 極性、陰性荷電残基およびそのアミド：

Asp、Asn、Glu、Gln；

III. 極性、陽性荷電残基：

His、Arg、Lys；

IV. 大(large)、脂肪族、非極性残基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys；

50

## V. 大、芳香族残基：

Phe、Tyr、Trp。

## 【0018】

本明細書で使用されるとき、用語「精製した」およびそのような用語は、天然では付随している他のコンポーネントから実質的にフリー(free)(すなわち、少なくとも60%フリー、好ましくは75%フリー、および最も好ましくは90%フリー)である形態の分子または化合物の単離に関する。

## 【0019】

本明細書で使用されるとき、用語「固体支持体」は、可溶性分子で連結(好ましくは共有結合)を形成することができる溶媒不溶性サブストレートに関する。当該支持体は、細胞またはバクテリオファージの粒子のような(これらに制限されず)天然の生物学的なもの、またはアクリルアミド誘導体、ガラス、プラスチック、アガロース、セルロース、ナイロン、シリカまたは磁性粒子のような(これらに制限されず)合成性のもの、何れかであり得る。その支持体の表面は、固体または多孔性であり、任意の通常の形であり得る。

10

## 【0020】

用語「連結した」などの用語は、2つの群の間での連結をいう。当該連結は、共有結合、イオン結合、または水素結合または2つの化合物またはお互いの物質に結合する他の相互作用を含み得る。

## 【0021】

「作動可能なように連結した」とは、並置をいい、この場合、当該コンポーネントは、その有用な機能を行えるように配置される。例えば、コーディング配列に作動可能なように連結した調節配列またはプロモーターは、コーディング配列の発現を行い得る。

20

## 【0022】

本明細書で使用するように、用語「相補的」または「相補性」は、塩基対形成ルールにより関連するポリヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチドの配列)に関して使用される。例えば、配列「A-G-T」の場合、配列「T-C-A」に相補的である。

## 【0023】

本明細書で使用するように、用語「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸の対形成に関して使用される。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強度(すなわち、核酸間の結合の強度)は、核酸間の相補性の程度、含まれる条件のストリンジエンシー、形成されたハイブリッドの長さ、および核酸内のG:C比のような因子により、影響される。

30

## 【0024】

「治療剤」、「薬剤」または「薬物」は、患者の疾病(malady)、苦痛、疾患または創傷の処置(予防、診断、緩和または治療を含む)で使用され得る任意の治療または予防剤をいう。

## 【0025】

本明細書で使用するときに、用語「処置する」は、特定の異常または病状に関連する徴候を緩和すること、および/または当該徴候を予防または排除することを含む。例えば、癌の処置は、癌細胞の増殖および/または分裂を防止または遅くすること、ならびに癌細胞を死滅することを含む。

40

## 【0026】

本明細書で使用するように、用語「医薬的に許容される担体」は、リン酸緩衝性生理食塩水溶液、水および油/水または水/油のエマルジョンのようなエマルジョン、および種々の型の湿潤剤のような任意の標準的な医薬の担体を含み、US連邦政府の管理機関により認可され、またはヒトを含む動物での使用用のUS Pharmacopeiaに列挙された薬剤を含む。用語「担体」は、作用剤の投与に用いられる希釈剤、アジュバント、補形剤(excipient)または賦形剤(vehicle)をいう。

## 【0027】

本明細書で使用するときに、用語「ヒストン修飾カセット」は、特定の生物学的応答と組み

50

合わせて関連するヒストンのテイルの連続アミノ酸配列内の2つまたはそれより多いヒストン修飾の任意の群(grouping)を含むことを意図する。特定の生物学的応答の例には、限定されるものでないが、転写活性および有糸分裂または減数分裂の開始を含む。

## 【0028】

本明細書で使用する時、用語「翻訳後修飾カセット」は、特定の生物学的応答と組み合わせて関連する連続アミノ酸配列の、2つまたはそれより多い翻訳後修飾の任意の群(grouping)を含むことを意図する。

## 【0029】

本明細書で使用する時、用語「抗体」は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体またはFab、F(ab')<sub>2</sub>およびFvフラグメントのような結合フラグメントをいう。

10

## 【0030】

本明細書で使用する時、本明細書に記載する抗体の、用語「生物学的活性フラグメント」は、標的エピトープへの特異的結合能を保持する、各々の全長の抗体の天然または合成の一部を含む。

## 【0031】

本明細書で使用する時、用語「非経口的」は、皮下注射、静脈注射、または筋肉注射での投与を含む。

## 【0032】

本明細書で使用する時、アミノ酸配列の関連で使用する際の表記Ser(P)は、リン酸化されたセリンアミノ酸を示す。

20

## 【0033】

本明細書で使用する時、アミノ酸配列の関連で使用する際の表記Lys(A)は、アセチル化されたリシンアミノ酸を示す。

## 【0034】

本明細書で使用する時、アミノ酸配列の関連で使用する際の表記Arg(M)は、メチル化されたアルギニンアミノ酸を示す。

## 【0035】

本発明

本発明は、クロマチンの転写活性および不活性領域を同定するための組成物および方法および診断および治療目的のためのような情報の使用を目的とする。当該組成物は、生物学的状態と関連したヒストンタンパク質の特定の翻訳後修飾に特異的である抗体を含む。最近の結果は、ヒストンが、アルギニンメチル化に対する生理学的標的の可能性を示唆している。ヒト細胞から単離したヒストンの分析は、全てではないが幾つかのH4分子はArg3でメチル化されることを示した。ヒストンH4中のこのメチル化部位に特異的な抗体が作成され、この修飾部位は転写活性で役割をすることが示された。

30

## 【0036】

コアヒストンメチル化に含まれる酵素を同定するため、HeLa細胞からの核タンパク質は核抽出物および核ペレット中に分離され、その後、さらにDEAE52およびホスフェートセルロースP11カラムで分画された。得られた画分は、基質としてコアヒストンオクタマーを用いるメチルトランスフェラーゼ活性についてアッセイされた。ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)活性を追跡することにより、核ペレット画分からのH4-特異的HMTは、均一に精製された。カラム画分を含むSDS-PAGEの銀染色は、42kDaポリペプチドは酵素活性により共溶出することを再び示した。マスマスペクトロメトリー分析は、ヒトタンパク質アルギニンN-メチルトランスフェラーゼ1、PRMT1として42kDaポリペプチドを同定した。

40

## 【0037】

1つの最も豊富なH4-特異的HMTとしてPRMT1の同定は意外である。それは、H4のLys20のみがインビボでメチル化されると報告されており、PRMT1はリシン残基をメチル化できることが知られていないためである。PRMT1がH4をLys20でメチル化するかどうか決定するため、コアヒストンオクタマーは、S-アデノシル-L

50

- [メチル - <sup>3</sup>H]メチオニン(<sup>3</sup>H - SAM)の存在下、組換えまたは天然PRMT1でメチル化された。SDS-PAGEによる分離後、メチル化H4は、回収され、自動Edman化学的塩基配列決定により小配列決定(microsequenced)した。連続して放出したアミノ酸誘導体は回収され、Lys20の代わりにArg3が主なメチル化部位であることを示す液体シンチレーションによりカウントされた。

【0038】

Arg3メチル化がインビボで起こるかどうかが決定するため、Arg3-メチル化ヒストンH4 N-末端ペプチドに対する抗体が作成された。特に、最初のセリンがN-アセチル化されており、残基3が非対称性NG、NG-ジメチル化(Bachem)である、ヒトH4 N-末端9アミノ酸(SGRGKGGKGC<sup>\*</sup>、配列番号15)をコードする合成ペプチドは、ウサギに免疫する前にC-末端人工システイン(C<sup>\*</sup>)を介してテンガイ(Keyhole Limpet)ヘモシアニンに結合した。

【0039】

得られた抗体は、PRMT1-メチル化H4と強力に反応し、大腸菌中で発現する同量の組換えH4を認識せず、これは、当該抗体は、メチル-Arg3-特異的であることを示す。重要なことに、この同一抗体はまた、HeLa細胞から精製したヒストンH4を認識し、これは、特定レベルのArg3-メチル化がインビボで生ずることを示した。H2Aはまた、PRMT1により弱くメチル化され得、メチル化H2Aはメチル-Arg3抗体により認識され得る。H2Aのメチル化部位は、H2Aが、H4のものと同じく極度のN-末端配列SGRGK(配列番号1)を有するため、Arg3であるようである。しかし、内生的なH2Aメチル化レベルは、同様の条件下では検出されなかった。

【0040】

H4およびH2Aの極度のN-末端配列SGRGK(配列番号1)ではまた、セリン1のリン酸化およびリシン5のアセチル化を含む幾つかの他の翻訳後修飾がされる。これらの3つの修飾は、相互作用し、「翻訳後修飾カセット」と呼ばれるものを構成する。より好ましくは、一次配列SGRGK(配列番号1)の特定修飾は、転写活性および有糸分裂または減数分裂の開始を含む特定の生物学的応答を伴う。出願人は、修飾配列Ser(P) Gly Arg Gly Lys(配列番号3)に対して生ずる抗体は、H3中のPhos Ser10に対し生ずる抗体と同様に、有糸分裂マーカーとしての役割をする。さらに、修飾配列Ser Gly Arg(M) Gly Lys(配列番号2)およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A)(配列番号6)に対し生ずる抗体は、転写活性のマーカーとしての役割をする。したがって、H4のこの領域は、転写性アップレギュレーションおよび一次アミノ酸配列の特定翻訳後修飾に依存する有糸分裂の両方に含まれると思われる。

【0041】

本発明の1つの観点は、5から20のアミノ酸配列、およびより好ましくは5-9アミノ酸残基を含む抗原性ペプチドを目的とし、この場合、アミノ酸配列は、以下からなる群から選択される：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号3)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、

Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)

ここで、「Ser(P)」、「Arg(M)」および「Lys(A)」は、それぞれ、リン酸化されたセリン、メチル化したArg残基およびアセチル化したリシンを示す。好ましくは、当該ペプチドは、ヒストンタンパク質の精製した抗原性フラグメントであるか、相当する合成性等価物であり、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号9)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、

10

20

30

40

50

Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 1 1)、  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 1 2)、  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 1 3)、および  
Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 1 4)。

【 0 0 4 2 】

より好ましくは、抗原性ペプチドは、9 から 2 0 のアミノ酸配列、およびより好ましくは 9 アミノ酸配列を含み、この場合、当該アミノ酸配列は、配列番号 8 - 1 4 の配列、または 6 - 9 位での単一保存アミノ酸置換(すなわち、当該ペプチドの配列 Gly Gly Lys Gly 内の置換)により配列番号 8 - 1 4 とは相違するアミノ酸配列を含む。他の実施態様では、精製抗原は、ウシ血清アルブミンまたはテンガイ(Keyhole Limpet)ヘモシアニンのような適当な担体に連結する配列番号 1 - 1 3 の群から選択されるアミノ酸配列を含む。 10

【 0 0 4 3 】

1 つの好ましい実施態様では、抗原は、少なくとも 9 つの保存残基を有し、Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys (配列番号 4)、Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) (配列番号 6) および Ser Gly Arg(M) Gly Lys (配列番号 2) からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドからなる。他の実施態様では、抗原組成物は、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2 およびこれらのアミノ酸配列の誘導体からなる群から選択されるアミノ酸配列(ここで、当該アミノ酸配列は、6 - 9 位での 1 つまたはそれより多い保存アミノ酸置換(すなわち、当該ペプチドの配列 Gly Gly Lys Gly 内の置換)を含む)、および所望により当該ペプチドに連結した担体タンパク質からなる。他の実施態様では、精製した抗原は、アミノ酸配列 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 1 4)、およびこのアミノ酸配列の誘導体の少なくとも 9 つの保存残基を有するペプチド(ここで、当該アミノ酸配列は、1 つまたはそれより多い保存アミノ酸置換を含む)、および所望により当該ペプチドに連結する担体タンパク質からなる。 20

【 0 0 4 4 】

本発明はまた、修飾ペプチドに対し作成された抗体を含む。これらの抗体の作成に使用する 1 つの方法は、実験動物、典型的にはウサギへの各抗原の投与により、当該抗原に特異的な抗体の産生を引き起こすことを含む。したがって、本発明はまた、配列番号 2 - 1 4 のペプチドからなる群から選択されるアミノ酸配列および医薬的に許容される担体を含む抗原組成物を含む。当該組成物はさらに、希釈剤、賦形剤、可溶化剤(solubilizing agent)、安定剤、およびアジュバントを含み得る。本発明での使用に適当な担体および希釈剤は、水および油のような滅菌液体を含む。実例となる油は、石油、動物、植物、または合成の源のもの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、またはミネラルオイルである。一般的に、水、生理食塩水、水性デキストロース、および関連の糖溶液(related sugar solution)、およびプロピレングリコールまたはポリエチレングリコールのようなグリコールは、特に注射可能溶液として好ましい液体担体である。適当なアジュバントは、ミョウバンまたは完全フロイドアジュバント(Montanide ISA-51)を含む。 30

【 0 0 4 5 】

抗体作成を引き起こすのに必要な抗原投与の用量および摂取および抗体の精製のための方法は、当業者に既知である。典型的に、その抗体は、最初に血液をとり、免疫前の血清を得るニュージーランド白ウサギに、目的の抗原を皮下的に投与することにより、生じ得る。抗原は、6 つの異なる部位に部位あたり合計 1 0 0  $\mu$  l で注射され得る。それぞれ注射した物質は、合成界面活性剤添加物ブルロニックポリオール、または SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質またはポリペプチドを含む破砕(pulverize)アクリルアミドゲルを含む。 40

【 0 0 4 6 】

次いで、当該ウサギは、最初の注射後 2 週間で血液を採り、6 週間ごとに 3 回同じ抗原で定期的にブースト(boost)する。次いで、血清のサンプルを各ブースト後 1 0 日で回収する。次いで、ポリクローナル抗体は、当該抗体を捕捉する相当する抗原を用いるアフィニティークロマトグラフィーで血清から回収する。最終的に、当該ウサギは、ペントバルビ 50

タール 150 mg / Kg IVで安楽死(euthenize)させられる。ポリクローナル抗体を生ずるためのこの方法および他の方法は、E. Harlow, et. al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988)に開示されており、それは引用により本明細書に含める。抗体の当該特異性は、酵素連結免疫吸着剤アッセイまたは免疫プロットティング、または当業者に既知の類似の方法により決定され得る。

【0047】

本発明の1つの観点は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体を目的とする：

Ser Gly Arg Gly Lys、(配列番号1)

Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号2)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、

Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)。1つの実施態様では、本発明の抗体は、

以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号9)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、

Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号11)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号13)、および

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号14)。より特に、当該抗体は、以下からなる群から選択されるポリペプチドに特異的に結合する：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、

Ser (P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)、および

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号13)。1つの態様では、本

発明は、ポリペプチドSer Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)に特異的

に結合する抗体、またはポリペプチドSer(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配

列番号10)に特異的に結合する抗体、またはポリペプチドSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) G

ly Gly Lys Gly (配列番号12)に特異的に結合する抗体またはポリペプチドSer Gly Arg

Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号14)に特異的に結合する抗体を目的とする。本願

明細書で使用するとき、標的抗原に特異的に結合する抗体は、標的抗原の存在下で検出可

能なシグナルを生ずるが、標的抗原の検出に使用する同一条件下では他の非標的抗原(す

なわち、検出できないシグナルを生ずる)とは交差反応しない抗体である。例えば、Ser G

ly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)に対して生ずるモノクローナル抗体は

、最適な条件を用いると、配列Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号14)ま

たは配列番号9 - 13の何れか他のペプチドとは結合しない。

【0048】

1つの好ましい実施態様では、標的修飾ペプチドの抗体は、モノクローナル抗体である。

モノクローナル抗体産生は、当業者に既知の技術を用いて実施し得る。基本的に、当該方

法は、最初に、インビボまたはインビトロの何れかで目的の抗原で先に免疫化された哺乳

類(例えば、マウス)の脾臓から免疫細胞(リンパ球)を得ることを含む。次いで、当該抗体

分泌リンパ球は、細胞培養中で無制限に複製することができる、骨髓細胞または形質転換

細胞と融合させ、それにより、不死の、免疫グロブリン分泌細胞系を生ずる。得られた融

合細胞、またはハイブリドーマを培養し、得られたコロニーを望ましいモノクローナル抗

体の産生のためにスクリーニングした。その抗体を産生するコロニーはクローニングされ

、インビボまたはインビトロの何れかで増殖し、大量の抗体を産生する。本発明の1つの

態様は、配列番号1 - 14の標的抗原の1つに結合するモノクローナル抗体を産生するハ

10

20

30

40

50

イブリドーマ細胞系を目的とする。その細胞と融合する理論的根拠および実施方法の記載は、Kohler and Milstein, Nature, 256: 495 (1975)に開示されており、それは引用により本明細書に含める。

【0049】

すべての抗体に加えて、抗体のフラグメントは、特定抗原に対する特異的結合を保持し得る。抗体フラグメントは、幾つかの方法により作成され得、それには限定されるものではないが、組換えDNA技術を用いるタンパク質分解または合成が含まれる。その実施態様の例は、Fabフラグメントを生ずるパインにより、またはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを生ずるペプシンによる抗体の選択的タンパク質分解である。これらの抗体フラグメントは、J. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 98-118 (N. Y. Academic Press 1983)(引用により本明細書に含める)に記載のような、通常の方法により作成され得る。すべての抗体の特異的結合を保持する本抗体の他のフラグメントは、当業者に既知の他の手段により作成され得る。

【0050】

本発明の抗体または抗体フラグメントは、担体または希釈剤と組合され得、組成物を形成する。これらの組成物は、ウエスタンブロット分析、免疫蛍光、および免疫沈降のような標準的分子生物学技術に使用され得る。1つの実施態様により、本発明の抗体は、診断または治療に使用のため標識される。本発明は、任意の特定の検出システムまたは標識に限定することを意図するものではない。当該抗体は、<sup>35</sup>S、<sup>131</sup>I、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>I、<sup>99m</sup>Tc、<sup>32</sup>P、<sup>125</sup>I、<sup>3</sup>H、<sup>14</sup>C、および<sup>188</sup>Rhのような放射性同位元素、またはフルオレセインおよびローダミンのような蛍光標識を含む非放射性標識試薬、またはビオチンまたはジゴキシゲニンのような他の非放射性標識試薬で標識され得る。ビオチンを含む抗体は、蛍光色素のような任意の望ましい標識に結合したアビジンのような「検出試薬」を用い、検出され得る。本発明による使用に適当な更なる標識には、核磁気共鳴活性化標識、電子密度または放射線不透過性物質、陽電子放射トモグラフィ(PET)スキャナーにより検出可能な陽電子放射同位元素、ルシフェリンのようなケミルミネサー(chemiluminescer)、およびペルオキシダーゼまたはホスファターゼのような酵素学的マーカーを含む。1つの実施態様では、本発明の抗体に特異的なヒストンは、二次抗体の使用により検出され、この場合、当該二次抗体は標識され、一次抗体に特異的である。他に、本発明の抗体は、放射性同位元素またはFITCまたはローダミンのような蛍光色素で直接標識され得、その場合、二次検出試薬は、標識プローブの検出を必要とし得ない。1つの好ましい実施態様により、当該抗体は、当分野に既知の標準的部分(moieties)を用いるフルオロホアまたはクロモホアで標識される。

【0051】

本発明の1つの実施態様により、修飾ヒストンタンパク質を検出する方法が、より特に、当該ヒストンのアミノ末端の最初の5アミノ酸の1つにおけるH4またはH2Aヒストンの修飾が提供される。当該方法は、ヒストンタンパク質を抗体と接触させるステップを含み、この場合、当該抗体は、以下からなる群から選択される修飾配列を含むH4またはH2Aのみに特異的に結合する：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号3)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、

Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)。より好ましくは、当該抗体は、アミノ酸配列Ser Gly Arg(M) Gly Lys(配列番号2)、またはSer(P) Gly Arg(M) Gly Lys(配列番号4)、またはSer Gly Arg(M) Gly Lys(A)(配列番号6)を含むH4またはH2Aヒストンに特異的に結合する。

【0052】

本発明の抗体は、当業者に既知の標準試薬および技術を用い検出可能標識に連結し得る。

例えば、抗体の放射標識に関連する技術の場合、Wensel and Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, New York (1983)参照(引用により本明細書に含める)。また、D. Colcher et al., "Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice, "Meth. Enzymol, 121: 802-816 (1986)参照(引用により本明細書に含める)。

【0053】

出願人は、ヒストンH4のアミノ末端の最初の5アミノ酸、特にセリン1、アルギニン3およびリシン5の翻訳後修飾は、修飾ヒストンに近接の遺伝子の活性および不活性遺伝子発現と関連することを発見した。特に、メチル化Arg3を含むヒストンH4は、転写活性に、特にArg3のメチル化がLys5のアセチル化を伴う際、関連する。加えて、ヒストンH4を含むクロマチン(H4は、メチル化Arg3およびリン酸化Ser1を含む)は、転写的にサイレントな領域と関連し、有糸分裂活性のマーカーとしての役割をする。したがって、本発明の1つの実施態様では、メチル化Arg3/アセチル化Lys5ヒストンH4に特異的な抗体は、クロマチンの転写的に活性な領域を検出するのに使用され得、そしてメチル化Arg3/リン酸化Ser1ヒストンH4に特異的な抗体は、クロマチンの不活性領域および有糸分裂的に活性な細胞を検出するのに使用され得る。

10

【0054】

1つの実施態様により、クロマチンの転写的に活性な領域を検出する方法が提供される。当該方法は、サンプルを含むクロマチンを、配列Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)に特異的に結合する抗体に、特異的結合に適する条件下、そして抗体がその標的に結合し得るのに十分な時間、接触させるステップを含む。1つの好ましい実施態様では、抗体またはクロマチンの何れかは固体支持体に結合する。次いで、当該サンプルは、緩衝性溶液で洗浄され、当該サンプルから非結合および非特異的結合抗体が除かれ、そして当該抗体を保持するクロマチン領域は、クロマチンの転写的に活性な領域として同定される。1つの実施態様では、当該抗体は、検出可能標識(放射性同位元素またはフルオロホアのような)で直接標識されるか、または他の実施態様では、二次抗体は、当該抗体の検出に使用され、この場合、当該二次抗体は、一次抗体に特異的な標識化抗免疫グロブリン抗体である。

20

【0055】

本発明の他の実施態様では、有糸分裂的に活性な細胞を検出する方法が提供される。当該方法は、細胞のサンプル(生検サンプルを含む)を得るステップ、および標準的技術を用いる組織学的分析のためにサンプル細胞を調製するステップを含む。次いで、細胞の群は、配列Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)に特異的に結合する抗体に、特異的結合に適する条件下、そして当該抗体がその標的に結合し得るのに十分な時間、接触させる。1つの好ましい実施態様では、抗体または細胞の何れかは、固体支持体に結合される。次いで、当該サンプルは、緩衝性溶液で洗浄され、当該サンプルから非結合および非特異的結合抗体を取り除き、有糸分裂的に活性な細胞は、その細胞に結合する抗体を有するものとして同定される。サンプル中の活性的に分裂する多くの細胞を比較することにより、不適当な細胞増殖(過剰または不十分な細胞増殖の何れか)により特徴付けられる疾患が同定され得る。そのため、当該方法は、疾患状態を同定するための診断として使用され得る。1つの実施態様では、当該抗体は、検出可能な標識(放射性同位元素またはフルオロホアのような)で直接標識されるか、または他の実施態様では、二次抗体が使用され、当該抗体が検出され、この場合、当該二次抗体は、一次抗体に特異的な標識した抗免疫グロブリン抗体である。

30

40

【0056】

クロマチン免疫沈降(クロマチンIP)アッセイにおける修飾SGRGKカセット抗体(すなわち、配列番号2-13)(およびより特にペプチドSer(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)に対する抗体)の使用は、ヒトゲノム(および同様に他のゲノム)の後成的な「ON/OFF」に相当するゲノムDNAの富化(enrich)する1つの方法である。免疫沈降したDNA

50

と現在のゲノムマイクロアレイ技術(チップ上)を合わせることにより、「ヒストンコード」を介する on/off 状態に関するヒト(または他の)ゲノムの任意の部分を調査することが可能である。より特に、アミノ酸配列 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu、(配列番号 10) および Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly Leu、(配列番号 12) を目的とする抗体の使用は、転写的に不活性および転写的に活動中のクロマチンの検出を許容する。クロマチンをヘテロクロマチンおよびユークロマチンに分離した後、DNA チップを使用し、どの遺伝子が特定組織中で発現/抑制されるかを評価し得る。

【0057】

1つの実施態様では、クロマチンの免疫沈降は、マイクロアレイの使用を介するゲノム全体のレベルで活性遺伝子の位置をマッピングするのに使用される。例えば、1つの好ましい実施態様では、免疫沈降クロマチン(すなわち、疾患組織および健常組織由来の免疫沈降クロマチン)の2つのプールを比較する方法は、遺伝子チップ、DNA マイクロアレイ、または当業者に既知の標準技術を用いるプロテオミクスチップの使用を含む。例えば、WO 01/16860、WO 01/16860、WO 01/05935、WO 00/79326、WO 00/73504、WO 00/71746 および WO 00/53811(それらは引用により本明細書に含める)に記載の任意のシステムは、本発明の使用に相当である。好ましくは、当該チップは、既知の化合物(既知 DNA 配列、抗体または他のリガンド)の整列させたアレイを含み、それによって、当該チップの特定位置での免疫沈降したクロマチン(または免疫沈降化クロマチンから回収した個々の DNA またはタンパク質コンポーネント)の相互作用が同定され、免疫沈降化クロマチンを伴う DNA 配列またはタンパク質の単離が許容される。

【0058】

1つの実施態様により、方法は、疾患状態が関連するクロマチン変化の検出に関し提供される。用語「疾患状態」は、先天的な欠損、癌のような病的な状態を含む生存動物または植物の正常状態の欠陥を伴い、そして因子および感染性病原体(agents)(細菌、ウイルスなど)に反応する任意の状態を含むことを意図する。当該方法は、クロマチンを正常および疾患の組織の両方から単離するステップ、クロマチンの当該2つのプールを、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 8)、

Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 9)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 10)、

Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 11)、

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 12)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 13)、および

Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 14)、

およびより好ましくは以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 8)、

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号 10)、および

Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号 12)、

と接触させるステップ、ならびに正常組織から単離したクロマチンの染色パターンを疾患組織のものと比較するステップを含む。より好ましくは、免疫沈降により単離されたクロマチンの当該2つのプールの染色パターンは、クマジー染色ゲル、ウエスタンブロット分析、サザンブロット分析、または各免疫沈降化クロマチンを伴うタンパク質または核酸配列の配列決定を含む、任意の標準技術の使用を介し比較され得る。特に、クロマチンの当該2つのプールのうちの1つのみに存在する(または一方のプールの量が他方に対し実質的により少ない量で存在する)配列が目的とされる。

【0059】

1つの実施態様では、異なるスクリーニング技術と組み合わせる、本発明の抗体を用いるクロマチン免疫沈降が用いられ、特有の腫瘍サプレッサー遺伝子または疾患状態の他のマーカーが単離される。この方法では、クロマチンは、正常組織および疾患組織からそれぞ

れ単離した、2つ別のプールのクロマチンから免疫沈降される。使用する抗体は、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する抗体が好ましい：Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)。次いで、タンパク質および核酸を伴うクロマチンは、それぞれ免疫沈降したプールであるクロマチンから回収され、標準的技術を用い比較される。1つの実施態様では、回収タンパク質/核酸の2つのプールは、標準技術を用い比較される。回収タンパク質の一方のプールには存在するが、タンパク質の他方のプールには全くない(または実質的に量が少ない)か、さもなければ変化しているタンパク質は、マイクロシーケンシングまたはTandem Mass Spectroscopic Analysisのような標準技術を再び用い、同定される。同様に、核酸配列は、回収配列の一方のプールに存在するが回収核酸配列の他方のプールには全くない(または実質的に量が少ない)核酸配列を同定するための、PCR、ゲル電気泳動、核酸シーケンシング、核酸ハイブリダイゼーション分析およびTandem Mass Spectroscopic Analysisを含む標準技術により分析される。

10

## 【0060】

本発明の抗体を用い、所定の疾患を伴うクロマチン構造の変化が検出され得る。例えば、当該抗体は、発現パターンの変化(すなわち、優勢天然パターンに関連するヘテロクロマチン対ユークロマチンのパターンの相違)を伴うクロマチン構造の変化を検出する診断として使用され得る。クロマチンの特定領域のクロマチン構造の変化は、特定疾患状態の診断となり得る。例えば、ゲノムの正常のユークロマチン領域の、ヘテロクロマチンへの変換は、癌または癌前状態を示す腫瘍サプレッサー遺伝子の抑制を示し得る。同様に、ヘテロクロマチンの領域の、ユークロマチンへの変換は、宿主細胞/生体に有害な効果を有する遺伝子の不適当または過剰な発現を伴い得る。

20

## 【0061】

本発明はまた、疾患組織において発現パターンを変化する核酸領域を単離する、広範のディファレンシャル・スクリーニング(differential screening)技術を用いる方法を目的とする。例えば、クロマチンは、疾患組織から単離され、そして健常組織から単離したクロマチンと比較して、疾患状態に関連するクロマチン構造(すなわち、ヘテロクロマチン対ユークロマチンの変化)における任意の相違が存在するかどうか決定され得る。クロマチン構造のその相違は、疾患において直接的または間接的に役割をする遺伝子の抑制または過剰発現を示し得る。ペプチド配列Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)に対する抗体を用いると、クロマチン構造のそのような変化が検出され、そして疾患状態を伴う遺伝子の同定の助けとなり得る。その遺伝子の当該同定は、疾患を処置するためのより有効な治療の設計のアシストとなり得る。

30

## 【0062】

1つの実施態様では、特定疾患に関連するクロマチン構造の変化の検出のための方法は、修飾特異的ヒストン抗体を用いる、クロマチン免疫沈降アッセイを含む。この方法は、クロマチン環境により決定される広範囲のDNA鋳型化方法の分析を許容する。より特に、当該方法は、疾患組織および健常組織の両方からクロマチンを単離するステップ、DNAをフラグメント化するステップ(好ましくは超音波により)、および以下からなる群から選択されるアミノ酸：

40

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、およびSer Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)

に特異的に結合する抗体を用いクロマチンを免疫沈降するステップ、および健常組織から免疫沈降したクロマチン(および結合DNA配列)を疾患組織と比較するステップを含む。免疫沈降したクロマチンの2つのプールの比較は、疾患組織と健常組織との相違の同定を許容する。

## 【0063】

50

ヌクレオソームは、健常の個人の血清中で検出されることが最近報告された。さらに、ヌクレオソームの血清濃度は、良性および悪性疾患を患う患者において相当により高い(Holdenrieder et al., Int J Cancer, 95 (2): 114-120 (Mar 20,2001))。恐らく、腫瘍を生ずる患者では高濃度のヌクレオソームが、増幅する腫瘍において自然発生的に生ずるアポトーシスから得られる。そのため、患者の血液中の上昇したレベルのヌクレオソームの存在は、促進された細胞死を伴う疾患の診断として役割をし得る(Holdenrieder et al., Anticancer Res, 19 (4A): 2721-2724 (1999))。

**【 0 0 6 4 】**

1つの実施態様により、血清サンプルは、個体(individual)から単離され得、診断方法としての本発明の抗体でスクリーニングされ得、種々の疾患状態を検出し得る。第一に、当該抗体は、異常濃度のヌクレオソームが当該サンプル中に存在するかどうか決定するのに使用され得る。さらに、個体の血液中の特定ヒストン修飾のそれ自体による検出は、特定疾患状態のための診断として役割をし得る。加えて、更なる分析は、本抗体を用いるヌクレオソームを免疫沈降することにより、そして免疫沈降化クロマチンを伴うタンパク質および核酸配列を分析することにより、行われ得る。

10

**【 0 0 6 5 】**

本発明の抗体が診断および治療製剤としてヒトでの使用の可能性があるため、本発明の1つの態様は、ヒト化(humanized)型のこれらの抗体を目的とする。ヒト化型の抗体は、非ヒト種由来の抗体がヒト免疫システムにより外来物質として認識され、それらが有効となくなるように中性化(neutralize)され得るため、治療適用に必要である。ヒト化抗体は、ヒトおよび非ヒト部分を含む免疫グロブリン分子である。より特に、ヒト化抗体の抗原組合せ領域(antigen combining region)(可変領域)は、非ヒト源(例えば、マウス)から得られ、ヒト化抗体の定常領域はヒト源から得られる。ヒト化抗体は、非ヒト抗体分子の抗原結合特異性およびヒト抗体分子により供与されるエフェクター機能を有する。典型的に、ヒト化抗体の作成は、組換えDNA技術の使用を含む。

20

**【 0 0 6 6 】**

1つの実施態様では、本発明の抗体は、固体支持体に結合され、クロマチンの免疫沈降に使用される。本発明の抗体はまた、不溶性支持体に連結し、細胞からユークロマチンまたはヘテロクロマチンを単離する手段を提供し得る。当該支持体は、粒子型または固体型であり得、限定されるものではないが、プレート、試験管、ビーズ、ボール、フィルターまたは膜を含む。抗体を不溶性支持体に固定化する方法は当業者に既知である。1つの実施態様では、本発明の抗体は、アフィニティークロマトグラフィーでの使用に相当である不溶性支持体に固定化される。クロマチンの免疫沈降は、本発明の1つの実施態様で用いられ、マイクロアレイの使用を介するゲノム全体のレベルでのDNA結合タンパク質の位置をマッピングする。加えて、修飾特異的ヒストン抗体を用いる、クロマチン免疫沈降アクセシは、クロマチン環境により決定される広範囲のDNA鋳型化方法の分析に使用され得る。

30

**【 0 0 6 7 】**

この技術の鍵は、種々の修飾がヒストンコードに関連するため、その修飾に特異的な抗体の使用である。これをヒトおよび他のゲノムに適用することは、エピゲノミクス(epigenomics)の基礎となる。例えば、Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys カセット対Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)カセットに特異的な抗体は、分化対増殖を調節する「phos/acetyl」スイッチであり得る。

40

**【 0 0 6 8 】**

この情報を得ることにより、種々のヒト癌において鍵となる腫瘍サプレッサーまたは腫瘍形成性タンパク質のon/off状態を決定に非常に貴重となることが証明され得る。Ser Gly Arg Gly Lysカセットは、非ヒストンタンパク質中に存在する。例えば、t(8;21)転座型急性骨髄性白血病(translocation type acute myeloid leukemia)は、染色体8上の遺伝子の、染色体21への転座を伴う急性骨髄性白血病である。転座した遺伝子、AML1は配列Ser Gly Arg Gly Lysを含む。

50

## 【 0 0 6 9 】

このペプチド配列に結合する後成的作成がどのようにゲノムDNAに相当するののかを知ることによってまた、トランスジェニック動物および植物(この場合、殆どのトランスジェニックDNAは「悪い」クロマチン環境に入り、サイレンス化されることがしばしば見られる)を作成する能力が導かれる(guide)。そのため、動物および植物トランスジェニックの働きで、どのようによりよくDNAを「良好な」クロマチン環境(すなわち、Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)修飾を有するH4を伴うクロマチン)中へ「導く」かを知るという意味あいは高い。ヒトでは、これは、(目的の遺伝子が患者にとって良好となるものを発現しないならば)遺伝子治療の提供(issues)で更に強い影響を与える(impact)。

## 【 0 0 7 0 】

本発明の1つの態様では、キットは、ユークロマチンおよびヘテロクロマチンを検出するために提供される。当該キットは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号2)、  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys、(配列番号3)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys、(配列番号4)、  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A)、(配列番号5)、  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号6)、および  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A)、(配列番号7)

に特異的に結合する抗体を含む。より特に、当該キットは、以下からなる群から選択されるアミノ酸配列：

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)、  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号10)、および  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (配列番号12)

に特異的に結合する抗体を含む。1つの実施態様では、当該抗体は、固体支持体へ結合されており、この場合、当該支持体は、モノリシックな固体であるか、または特定の型であるか、何れかである。1つの好ましい実施態様では、当該抗体は、モノクローナル抗体であり、更なる態様では、当該抗体は標識されている。この目的のため、本発明の抗体は、種々のコンテナ、例えば、バイアル、チューブ、マイクロタイターウェルプレート、ボトルなどにパッケージされ得る。他の試薬は、別のコンテナに含まれ得、キット、例えば、陽性対照サンプル、陰性対照サンプル、緩衝液、細胞培養培地などを提供する。

## 【 0 0 7 1 】

本発明のキットは更に、一旦、標的抗原に結合すると、モノクローナル抗体を検出する試薬を含み得る。所望により、核タンパク質を免疫学的結合にアクセス可能とする細胞または組織を処理するための試薬(ペプシン、希塩酸)がまた、免疫蛍光検出試薬(フルオレセインまたはローダミンで誘導された抗免疫グロブリン抗体、またはフルオレセインまたはローダミンで誘導されたアビジンまたはストレプトアビジンを伴うビオチニル化抗免疫グロブリン抗体)、免疫組織化学的または免疫細胞化学的検出試薬(アルカリホスファターゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼで誘導された抗免疫グロブリン抗体、またはアルカリホスファターゼまたはセイヨウワサビペルオキシダーゼで誘導されたアビジンまたはストレプトアビジンを伴うビオチニル化抗免疫グロブリン抗体)が含まれ得るので、含まれ得る。1つの実施態様では、当該キットは、免疫ペルオキシダーゼ染色のための1つまたはそれより多い試薬(セイヨウワサビペルオキシダーゼで誘導された抗免疫グロブリン抗体、またはセイヨウワサビペルオキシダーゼで誘導されたアビジンまたはストレプトアビジンを伴うビオチニル化抗免疫グロブリン抗体)を、その発色性基質(例えば、ジアミノベンジジン)と共に含む。

## 【 0 0 7 2 】

他の実施態様では、ペプチドSer Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu (配列番号14)、所望により、不溶性支持体に結合した当該ペプチドを含むキットは、サンプルがメチラーゼ、キナーゼまたはアセチラーゼ活性を有するかどうかを決定するアッセイでの使用に提供され得る。1つの実施態様では、当該ペプチドは、所定のサンプルのPRMT1の活

10

20

30

40

50

性のレベルの検出に使用される。当該方法は、事前に決定した長さの時間、当該ペプチドを当該サンプルと接触させこと、次いで、メチル化ペプチドにのみ結合する抗体の使用を介するペプチド基質において生ずるメチル化の量を決定することを含む。

【0073】

このアッセイはまた、メチラーゼ、キナーゼまたはアセチラーゼ活性の可能性あるインヒビターをスクリーニングする方法に使用され得る。例えば、1つの態様では、アルギニンメチルトランスファー活性のインヒビターをスクリーニングする方法は、メチラーゼおよび当該メチラーゼによりメチル化される基質を含むサンプルを提供するステップ、当該サンプルにメチラーゼの可能性あるインヒビターを加えるステップ、当該メチル化基質に特異的に結合するが非メチル化基質には結合しない抗体を当該サンプルと接触させるステップを含む。1つの実施態様では、当該抗体は、ペプチドSer Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (配列番号8)に特異的である。当該ペプチドに結合する抗体の量の定量は、サンプル中のメチラーゼのレベル活性(level activity)と直接関連する。1つの好ましい実施態様では、検出されるべきメチラーゼ活性はPRMT1である。

10

【実施例】

【0074】

実施例1

H3アルギニンメチル化の同定

CARM1およびPRMT1がヒストンをインビトロでメチル化し、転写コアクチベーター機能を含むことを示す最近の報告は、ヒストンは、アルギニンメチル化の、可能性ある生理学的標的であることを示唆する。しかし、ヒストンにおけるアルギニンメチル化の存在の明白な証明は、欠いている。インビボでの哺乳類のヒストンにおけるアルギニンメチル化の部位を特定するため、非同期的に増殖するヒト293T細胞から単離したヒストンは、キモトリプシンにより消化した逆相高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)により個々に精製され、得られたペプチドは、ナノ-HPLCマイクロエレクトロスプレーイオン化タンデムマススペクトロメトリー(nano-HPLC microelectrospray ionization tandem mass spectrometry)により調査された。ヒトH4末端キモトリプシンペプチドのコリシン活性化分離(CAD)スペクトルは、NG-モノメチル化を示すArg3残基へのメチル基の付加を示した。Arg3がモノメチル化されたH4ペプチドの、予測されるb-およびy-型イオン群が観察された。更に、他のCADスペクトルは、Arg3でのメチル化を欠くH4N末端ペプチドを示し、それは、上記特性を支持し、全てではないが幾つかのH4分子がArg3でメチル化されている。

20

30

【0075】

アルギニン残基が、NG-モノメチルアルギニン、対称性NG、N'G-ジメチルアルギニンまたは非対称性NG、NG-ジメチルアルギニンを生ずる2つの末端グアニジノ窒素原子基の何れかまたは両方でメチル化され得る場合、当該分析は、H4Arg3でのジメチルアルギニンの存在を示さなかった。しかし、これらのデータは、H4Arg3ジメチル化が存在する可能性を排除しない。

【0076】

ヒストンH4中のこのメチル化部位に特異的な抗体は、Arg3がNG、NG-ジメチル化されたH41-9合成ペプチドで免疫されたウサギを用い作成された。メチル化Arg3に対するこの抗血清の特異性は、Arg3での非修飾またはメチル化の何れかがされたN-末端H41-9ペプチドを用いるELISAにより変化した(図1C)。インビボのArg3H4メチル化の変換を調査するため、複数の真核生体から単離したヒストンが、H4Arg3メチル特異的抗血清でプローブ化された(以下、-H4R3Me)。免疫プロット分析は、Arg3を欠く多岐にわたる極限アミノ末端H4テイルおよび組換えジェノパス(Xenopus)H4を含むテトラヒメナを除いて、試験した全てのヒストン中のH4におけるArg3メチル化の存在を示した。マススペクトロメーター分析と共に、これらのデータは、-H4R3Me抗体がモノ-およびジメチルアルギニンの両方を認識することを示唆する。これらの結果は、広範囲の真核性ヒストンの中のアルギニンメチ

40

50

ル化のインビボでの存在を明らかに示している。所定のこの保存H4 Arg3メチル化は、ヒストン代謝で重要な役割をし得る。

【0077】

実施例2

H3アルギニンメチル化酵素の同定

コアヒストンメチル化に含まれる酵素を同定するため、HeLa細胞由来の核タンパク質を核抽出物および核ペレット中に分離し、その後、DEAE52およびリン酸セルロースP11カラムで更に分画した。得られた画分は、基質としてコアヒストンオクタマーを用いメチルトランスフェラーゼ活性についてアッセイした。特に、カラム画分または組換えヒトタンパク質アルギニンN-メチルトランスフェラーゼ1(PRMT1)を、20mM Tris-HCl(pH8.0)、4mM EDTA、1mM PMSF、0.5mM DTT、および $1.5 \mu\text{l}^{-3} \text{H-SAM}$ (15 Ci/mmol; NEN Life Science Products)を含む総体積30 $\mu\text{l}$ 中で、30分間、コアヒストンオクタマー、組換えH4、またはH4テイルペプチドと共にインキュベーションした。反応物は、SDSローディング緩衝液の添加により停止させ、その後、18% SDS-PAGE中で電気泳動した。クマジー染色および脱色後、ゲルをEntensify(NEN Life Science Products)で処理し、乾燥させX線フィルムにさらした。

10

【0078】

ヒストンH3およびH4に対し特有の特異性を有する複数のメチルトランスフェラーゼ活性を検出した。ヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)活性を追跡することにより、H4-特異的HMTを、核ペレット画分から均一となるまで精製した。ヒドロキシアパタイトカラムから得られるカラム画分の分析は、酵素活性のピークは画分14で溶出し、画分26で裾が延びている(trailed through)ことを示した。カラム画分を含むSDS-PAGEの銀染色は、42kDaのポリペプチドが当該酵素活性と共に共溶出したことを示した。この結果を確認するため、同じインプット(input)をゲル濾過Superose-200カラムにロードした。当該カラム画分の分析は、酵素活性のピークが画分38-41の間の約330kDaを溶出したことを示した。カラム画分を含むSDS-PAGEの銀染色は、再び、42kDaポリペプチドは、当該酵素活性と共に共溶出することを示した。マスマスペクトロメトリー分析は、ヒトタンパク質アルギニンN-メチルトランスフェラーゼ1、PRMT1として42kDaポリペプチドを同定した。

20

30

【0079】

HMT活性は、約330kDaを溶出し、PRMT1と共に共溶出するのみであるので、PRMT1は、ホモオリゴマーとして機能するようである。これは、組換えPRMT1は330kDa複合体として内在性PRMT1と同一物を分画するという証拠により証明された。そのため、我々は、PRMT1は、ホモオリゴマーの形態のH4特異的HMTとして機能すると結論づける。

【0080】

最も豊富なH4特異的HMTの1つとしてのPRMT1の同定は、H4のLys20のみがインビボでメチル化されていると報告されているため、驚きであり、そのPRMT1は、リシン残基をメチル化できるとは知られていない。代わりに、PRMT1およびその酵母相同体は、特定RNA結合タンパク質のアルギニンを主にメチル化すると報告されている。

40

【0081】

PRMT1がLys20においてH4をメチル化するかどうか決定するため、コアヒストンオクタマーは、S-アデノシル-L-[メチル- $^3\text{H}$ ]メチオニン( $^3\text{H-SAM}$ )の存在下、組換えまたは天然PRMT1でメチル化された。SDS-PAGEによる分離後、メチル化H4を回収し、自動化Edman化学的シーケンシングによりマイクロシーケンスした。連続して、放出アミノ酸誘導体を回収し、液体シンチレーションによりカウントし、Lys20の代わりにArg3が主なメチル化部位であることが示された。Lys20における変異を伴うかまたは伴わないH4テイルペプチドをメチル化するPRMT1の能

50

力の比較では相違は見られず、L y s 2 0 が P R M T 1 メチル化の部位ではないことを確認した。

【 0 0 8 2 】

P R M T 1 が、この部位特異的 A r g 3 メチル化に対しインビボで応答性であるかどうか決定するため、P R M T 1 を細胞中で過剰発現させ、A r g 3 メチル化レベルを対応して増加するかどうか決定した。P R M T 1 の過剰発現は、A r g 3 メチル化における増加を生じた。この結果を確認するため、P R M T 1<sup>+</sup> / <sup>+</sup> および P R M T 1<sup>-</sup> / <sup>-</sup> 胚幹 (E S) 細胞由来のコアヒストンを精製し、その A r g 3 メチル化レベルと比較した。P r m t 1 遺伝子の不活性化は、A r g 3 メチル化レベルの劇的な減少を生じ、これは、ヒストン H 4 が P R M T 1 のインビボの基質であるようであることを示す。

10

【 0 0 8 3 】

事実、H 4 の有糸分裂性 A r g 3 メチル化は、粘菌、フィサルム (Physarum) の有糸分裂の同期的進行の間に S e r 1 がリン酸化される前に、わずかに生じ得る。A r g 3 メチル H 4 は、マウス E S 細胞中の不活性 X 染色体において富化 (enrich) されることがまた観察された (E. Heard, 非公表)。集合的に、これらのデータは、修飾カセットを明確にする、これらの極めて近い隣接する修飾が同時に働き、多くの多様な生物学的状況において、より凝縮したクロマチン状態に対し H 4 テイルをマーク (mark) することを示唆する。そのため、修飾配列 Ser (P) Gly Arg (M) Gly Lys (配列番号 4) は、転写不活性と関連し、有糸分裂のマーカーとして有用性を有すると考えられている。

【 0 0 8 4 】

実施例 3

H 3 アルギニンメチル化酵素の更なる分析

更に H 4 A r g 3 メチルトランスフェラーゼの同定を決定するため、遊離子ウシ胸腺ヒストンの混合物中の H 4 をメチル化することが先に示された、P R M T 1 の基質および部位特異性を調査した。精製した組換え G S T - P R M T 1 を、S - アデノシル - L - [メチル - 3 H] メチオニン (3 H - A d o M e t) の存在下、ニワトリ、テトラヒメナおよびヒト 2 9 3 T 細胞から単離したコアヒストンと共にインキュベートし、反応産物を S D S - P A G E およびフルオログラフィーにより分析した。その結果は、G S T - P R M T 1 は、コアヒストンの混合物からのニワトリおよびヒト 2 9 3 T H 4 を効率的にメチル化することを示した。予想通り、G S T - P R M T 1 は、テトラヒメナ由来の H 4 をメチル化することができず、これは、A r g 3 は、これらアッセイ条件下の P R M T 1 メチル化の主な (排他的でないとしても) 部位であることを示唆した。ヒストンのメチル化は、G S T - P R M T 1 の非存在下では観察されなかった。これらの反応条件下で、哺乳動物 H 2 A はまた、弱くメチル化されていることが発見されており、この結果は初期の発見と一致する。

20

30

【 0 0 8 5 】

H 4 アミノ末端のアルギニン残基が P R M T 1 によりメチル化されていることを明確に決定するため、精製 G S T - P R M T 1 およびニワトリコアヒストンを用いる標識反応からの R P - H P L C 精製 H 4 をマイクロシーケンスし、各サイクルと関連した。<sup>3</sup> H - 組込み (<sup>3</sup> H - incorporation) を決定した。マイクロシーケンス分析は、A r g 3 が、H 4 テイルでのメチル化の排他的部位であることを示す。常に、G S T - P R M T 1 の存在下で反応した組換えジェノパス H 4 (r H 4) を、<sup>3</sup> H 4 R 3 M e 抗体を用いる免疫プロット分析により A r g 3 で強力にメチル化した。対照的に、G S T - P R M T 1 を欠く反応からの r H 4 は免疫反応しなかった。上記同一反応のナノ - H P L C マイクロエレクトロスプレーイオン化マスペクトロメトリー分析は、A r g 3 での排他的なメチル化産物は N G - モノメチルアルギニンであり、その結果は、ヒト 2 9 3 T 細胞から単離した H 4 におけるマスペクトロメトリーにより従前に観察された結果と一致する (実施例 2 参照)。ジメチルアルギニンは、我々のアッセイ条件を用いる G S T - P R M T 1 によるインビボのメチル化後、r H 4 におけるマスペクトロメトリーによっては検出されなかった。

40

【 0 0 8 6 】

50

PRMT1がヒト293T細胞中で仲介するH4Arg3活性に反応するかどうか決定するため、これらの細胞から単離した異所的に発現したPRMT1を調査し、組換えPRMT1に見られるようにH4への、同一の基質特異性を維持しているかどうかを決定した。その目的のため、推定AdoMet結合部位またはペアレントベクター(HA)に結合する推定AdoMetを欠く、HA-タグ化PRMT1(HA-PRMT1 wt)、HA-タグ化PRMT1変異型(HA-PRMT1 mut)を、ヒト293T細胞中で異所的に発現させ、その後、核単離し、DNase I抽出した。ニワトリコアヒストンおよびAdoMetまたは<sup>3</sup>H-AdoMetを用いるこれらの抽出を伴うヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)アッセイは、HA-PRMT1発現細胞由来の核抽出物は、HA-PRMT1変異型またはHA発現細胞の何れかからの抽出物よりもH4において<sup>3</sup>H-AdoMetを組み込むことを示した。更に、<sup>3</sup>H-4R3Me抗体でプローブ化された免疫プロットは、この活性はヒストンH4 Arg3に特異的であることを示す。HA特異的抗体を伴う同一核抽出物の免疫沈降は、促進されたH4 Arg3メチル活性がHA-PRMT1発現の結果であることを直接示す。これらの結果は、細胞誘導性PRMT1は、H4におけるArg3を直接的におよび特異的にメチル化し得ることを示す。更に、発現HA-PRMT1は、DNase I消化により抽出されるということが提供されるため、これらのデータはまた、PRMT1はクロマチンと関連することを示唆する。HA-PRMT1の発現は、293T DNase I核抽出物中で検出され得るヌクレオソームH4 Arg3メチル化活性を促進することも意味する。

#### 【0087】

組換えまたは細胞性PRMT1は、H2Aをメチル化し得るけれども、このメチル化は、<sup>3</sup>H-4R3Me抗体により検出されず、これは、<sup>3</sup>H-4R3Me抗体はH4 Arg3メチル化に関し選択的であることを示唆する。H4 Arg3メチル化活性は、293T対照DNase I抽出物で検出可能であったため、以下の実験により、当該活性が内在性PRMT1によるものかどうかを決定した。この考えを直接試験するため、内在性PRMT1をDNase I核抽出物から免疫枯渇(immuno-depleted)させ、次いで、当該抽出物を任意の残りのH4メチル化活性に関しアッセイした。PRMT1の免疫枯渇により、これらの抽出物中のH4 Arg3メチル化活性の完全破壊をほぼ生じ、これは、PRMT1は、ヒト293T細胞由来の主なH4 Arg3 HMT(排他的でないとしても)であることを示唆した。更に、上記免疫枯渇アッセイからの免疫沈降したPRMT1は、実質的に全てのH4 HMT活性を持続した。

#### 【0088】

##### 物質および方法

##### 細胞培養および核酸抽出物およびヒストンの調製

HeLaおよび293T細胞を、10% FBSまたは5% FBSを含むD-MEN中にそれぞれ37°Cで増殖させた。核は、界面活性剤溶解および低速度遠心分離[Chen et al, J. Biol Chem 275,40810 (2000)]し、その後、先に述べられたようにDNase I抽出またはヒストンの酸抽出により単離した[1つの100mmプレートの293T細胞(約 $1.5 \times 10^6$ )を、Effectene transfection reagent(Qiagen)を用い、空のpCDNAベクターまたはpCDNA-PRMT1 4μgでトランスフェクションした。トランスフェクション後48時間、核を単離し、コアヒストンを酸抽出およびTCA沈殿で精製した。]。テトラヒメナサーモフィラ(Tetrahymena thermophila)(株CU427またはCU428)は、[K. Luger, T. J. Rechsteiner, T. J. Richmond. Methods Enzymology 304,3 (1999)]により述べられたように、富化1%プロテオースペプトンおよび増殖的(vegetatively)に増殖する細胞から単離された巨大核ヒストン中で増殖させた。ニワトリヒストンおよびヌクレオソームは、C.Mizzenにより無理なく提供された。酵母ヒストンは、野生型株MX4-22Aから単離された。

#### 【0089】

##### プラスミドの発現およびトランスフェクション

GSTまたはPRMT1のHA発現に使用する細菌性および哺乳類発現プラスミドは、他

でも記載されている。哺乳類 H A - P R M T 1 推定 A d o M e t 結合変異型 (SGTをAAAに ; アミノ酸 79 - 89) は、サイトダイレクテッド P C R 突然変異により作成した。この構成物は配列決定することにより確認した。293T細胞を用いる一過性トランスフェクションは、100mmディッシュにおいてプラスミド D N A 15  $\mu$ g を用いおこなった。

#### 【0090】

メチルトランスフェラーゼ活性アッセイ

G S T - P R M T 1 または 293T D N a s e I 核抽出物を含むヒストンメチルトランスフェラーゼ (H M T) アッセイの場合、コアヒストン 2 g または組換え H 4 0.5 g は、30 で 30 分間、総体積 10  $\mu$ l で、0.55  $\mu$ Ci の S - アデノシル - L - [メチル - 3 H]メチオニン (3 H-AdoMet; 72 Ci/mmol; NEN Life Science Products) を伴うヒストンメチルトランスフェラーゼ (HMT) 緩衝液 (最終濃度、50 mM Tris-pH 8.0, 1 mM PMSF および 0.5 mM DTT) 中の G S T - 精製 P R M T 1 1  $\mu$ g または 293T 核抽出物 25  $\mu$ g と共にインキュベーションした。当該反応物 2  $\mu$ l を液体シンチレーションカウンティングの Whatman P-81 にスポットし反応をモニターし、その間、残りは SDS-PAGE、その後、クマジー染色およびフルオログラフィーにより分析した。上記のような同一反応は、非放射性標識化 AdoMet (最終 15  $\mu$ M) を用い並行して行い、<sup>3</sup>H-4 R3Me 抗体を用いるウエスタンブロッティングにより分析した。

10

#### 【0091】

ヒストン H 4 の A r g 3 のメチル化を選択する抗体の開発

合成ペプチドは、最初のセリンが N - アセチル化されており、残基 3 は、ウサギに免疫する前に C - 末端人工システイン (C<sup>\*</sup>) を介してテンガイ (Keyhole Limpet) ヘモシアニンに標準プロトコールにより結合した非対称性 N G、N G - ジメチルアルギニン (Bachem) で形成されている、ヒト H 4 アミノ末端 (S G R G K G G K G C<sup>\*</sup>; 配列番号 15) の配列 1 - 9 をコードする。酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) は、ウサギ血清からの抗体特異性を特徴付ける図 1 C で示すような非修飾または A r g 3 メチル化 H 4 1 - 9 ペプチドの種々の量を用い、先に記載したように行った。

20

#### 【0092】

免疫沈降の研究

一過的にトランスフェクトした 293T 細胞由来の D N a s e I 核抽出物を、免疫沈降前に 150 mM N a C l に調節した。<sup>3</sup>H - H A 免疫沈降の場合、一過性トランスフェクトした 293T 細胞由来の 293T D N a s e I 核抽出物 50  $\mu$ l を<sup>3</sup>H - H A 抗体 (HA.11; Covance) 2.5  $\mu$ l およびプロテイン G セファロース (Amersham) 5  $\mu$ l と共にインキュベーションし、インキュベーションは 4 で 2 時間であった。免疫沈降は、RIPA 緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 1% Deoxycholate) で 2 回洗浄し、その後、HMT 緩衝液で 2 回洗浄した。内在性 P R M T 1 免疫沈降の研究では、293T D N a s e I 抽出物 30  $\mu$ l を 150 mM N a C l に調節し、<sup>3</sup>H - P R M T 1 1  $\mu$ l およびプロテイン G セファロース (Amersham) 3  $\mu$ l と共にインキュベーションし、そのインキュベーションは 4 で 2 時間であった。内在性免疫沈降物は、H M T 緩衝液で 3 回洗浄した。免疫沈降は、上記のように H M T 活性に関しアッセイした。

30

#### 【0093】

ウエスタンブロッティング

ウエスタンブロット分析は、Amersham Life sciences の試薬および手順を用い行った。ウサギ<sup>3</sup>H-4 NG、NG-ジメチルアルギニン 3 および<sup>3</sup>H - P R M T 1 は、1:5,000 の希釈で使用した。モノクローナル<sup>3</sup>H - H A 抗体は 1:1000 の希釈で使用した。

40

#### 【0094】

タンパク質マイクロシーケンシング

マイクロシーケンシングのための GST-PRMT1 を含む標識研究では、基質としてニワトリコアヒストンを用いる上記 H M T 反応体積を 10 倍にスケールアップした。この反応からのヒストンを、C8 カラムを用いる R P - H P L C により精製した T C A および H 4 で沈殿した。シーケンシングの前に、H 4 の N - 末端を脱ブロック (deblock) した [27]。H 4 は

50

、最適なサイクルを用いる in-line 120A PTH-Analyzer (Applied Biosystems)を伴う Applied Biosystems Model 477A Protein Sequencerでシーケンスした。変換後、50%のサンプルをPTH-アミノ酸同定のためにRP-HPLCに移し、他の50%は、シンチレーションカウンティングによる放射活性の決定のため回収した。

【0095】

マスペクトロメトリー分析

293Tから単離したH4を上記のようにRP-HPLCにより精製し、その後、50mM重炭酸アンモニウムpH8.5で2pmol/ $\mu$ lに希釈する。キモトリプシン(Roche)を0.025 $\mu$ g/ $\mu$ lに加え、消化を一夜室温で行った。当該消化物の2pmolアリコート、LCQイオントラップマスペクトロメーター(Finnigan)を用いるナノ-HPLCマイクロエレクトロスプレーイオン化マスペクトロメトリー分析のため7cm C18ビーズ(YMC ODS-AQ, Waters)および $\sim$ 5 $\mu$ m エミッターチップ[28]を伴う360 x 75  $\mu$ m 分析カラムにロードした。HPLC勾配は、70分で0-60% Bであり、15分で60-100% Bである。溶媒AおよびBは、それぞれ、水中の0.1M酢酸および70%アセトニトリル中の0.1M酢酸であった。マスペクトロメーター分析は、H4のN-末端キモトリプシンフラグメント(SGRGKGGKGL; 配列番号15)の+2イオンの標的MS/MSを含む。N-末端アセチル化、S1リン酸化、K5およびK8アセチル化、およびR3メチル化(モノ-およびジ-)の全ての可能な組合せを分析した。Arg3メチル化は、+3イオンのN-末端アセチル化標的MS/MSとの組合せにのみ観察され、確認した。

10

【0096】

実施例3

H4 Arg3メチル化仲介の事象

H3のLys9におけるメチル化がSer10リン酸化を阻害するという最近の報告(S. Rea, et al., Nature 406,593 (2000))が、Arg3メチル化がH4テイルにおけるリシン残基のアセチル化により阻害されるかどうかに関する研究を刺激した。この目的のため、mockメチル化またはPRMT1メチル化の何れかである組換えH4を、<sup>3</sup>H-アセチル-CoAの存在下、p300によるアセチル化の基質として使用し、H4の2つそれぞれのプールにおけるアセチル化の量を比較した。より特に、組換えH4を精製し、過剰量の非標識SAMの存在下PRMT1メチル化の基質として使用した。完全メチル化は、更なる<sup>3</sup>H-SAMの組込みを欠くことにより証明された。アセチル化は、50mM Hepes(pH 8.0)、5 mM DTT、5 mM PMSF、10 mM 酪酸ナトリウム、10%グリセロール、2 $\mu$ l <sup>3</sup>H-アセチル-CoA および 2  $\mu$ l p300を含む総体積 20  $\mu$ l 中で行った。当該反応混合物は37 で1時間インキュベーションし、SDSサンプル緩衝液を加えることにより停止させた。

20

30

【0097】

H4のメチル化はPRMT1により刺激され、その後、p300によりアセチル化した(図2A)。この結果を確認するため、等価のサンプルを、異なるアセチル化ヒストンイソ型を分離する、Triton-Acetic Acid-Urea (TAU)ゲルで分析した。当該結果は、PRMT1-メチル化H4は、全てのH4分子はp300によりアセチル化(0アセチル化型はなし)されるため、非メチル化H4と比較するとp300のよりよい基質となる(図2B)。しかし、同一条件下では、mockメチル化基質の画分はまた、非アセチル化されたままである(0アセチル化型)。4つのアセチル化可能リシン残基のどの残基がArg3メチル化により影響を受けるかを決定するため、上記分析したサンプルのアセチル化状態を、アセチル化部位特異的抗体を用い調査した。その結果は、Arg3メチル化は、K8およびK12アセチル化を促進するが、K5またはK16アセチル化においては殆ど影響しないことを示した。

40

【0098】

Arg3メチル化におけるリシンアセチル化の効果を決定するため、過剰アセチル化および低アセチル化(hypoacetylated)したコアヒストンの両方をHeLa細胞から精製し、<sup>3</sup>H-SAMの存在下PRMT1の基質として使用した。メチル化後、サンプルをTAUゲルで分離し、その後、クマジー染色およびオートラジオグラフィを行った。非およびモ

50

ノ - アセチル化 H 4 イソ型のみが検出可能レベルにメチル化したが、ほぼ等量の異なる H 4 イソ型は、メチル化反応中に存在した。非アセチル化 H 4 は、P R M T 1 の最もよい基質であるため、異なるアセチル化 H 4 イソ型と比較すると、リシン残基におけるアセチル化は、P R M T 1 により H 4 メチル化を阻害するようである。

#### 【 0 0 9 9 】

この阻害がインビボで生ずるかどうか決定するため、H e L a 細胞を、ヒストンデアセチラーゼインヒビター、Tricostatin A (TSA) で処理し、過剰アセチル化を誘導した。TSA 処理後 2 4 時間、コアヒストンを単離し、H 4 - A r g 3 のメチル化状態を分析した。低アセチル化 H 4 (非処理) は、殆ど検出できない A r g 3 メチル化レベルを有する過剰アセチル化 H 4 (T S A 処理した) と比較すると、より高い A r g 3 メチル化レベルを有した。そのため、リシン残基における過剰アセチル化は、H 4 A r g 3 の低メチル化と相関する。この結果は、リシン残基におけるアセチル化は、その後の A r g 3 メチル化を阻害するという観念と一致し、また、H 3 メチル化は好ましくはアセチル化ヒストンにおいて生ずる一方で H 4 メチル化は好ましくは非アセチル化ヒストンにおいて生ずることを証明する初期の研究とも一致する。

10

#### 【 0 1 0 0 】

H 4 は、アセチル化され得る 4 つのリシン残基を含むため、我々は、任意の 4 つの部位におけるアセチル化が A r g 3 メチル化において同様の影響を有するかどうか調査した。この目的のため、それぞれ、アセチル化されず、モノ - アセチル化され、トリ - アセチル化され、および十分にアセチル化された合成 H 4 テイルペプチドを、P R M T 1 の基質として使用した。任意の 4 つのリシンにおけるアセチル化は、P R M T 1 による A r g 3 メチル化を阻害した。しかし、L y s 5 におけるアセチル化は、最も効果を有していた。加えて、異なるリシンにおけるアセチル化は、更なる阻害効果を有すると思われた。トリ - アセチル化および十分にアセチル化したペプチドは、P R M T 1 の基質としての役割を酷く損なっていた。

20

#### 【 0 1 0 1 】

リシンアセチル化を促進する A r g 3 メチル化により、P R M T 1 は、転写活性中に含まれるようであると予測される。事実、P R M T 1 は、核ホルモンレセプターのコアクチベーターとして機能することが最近示された。しかし、そのコアクチベーター活性は、その H M T 活性とは関連していなかった。転写における A r g 3 メチル化の機能を直接取り組むため、単一のアミノ酸変異 (G 8 0 R) を、酵素活性を損なうことが従前に示された (A. E. McBride et al, J Biol Chem 275, 3128 (2000))、P R M T 1 の保存 S A M 結合ドメインに導入した。コアクチベーターとして C B P / p 3 0 0 を使用することが知られる、アンドロゲンレセプター (A R) により活性を促進する変異型および野生型 P R M T 1 の能力を、モデル系としてジェノパス卵母細胞を用いるクロマチンコンテクストで比較した。M M T V L T R に基づくレポーターをジェノパス卵母細胞の核中に注入し、当該レポーターの成功したアセンブリを、小球菌ヌクレアーゼ消化により確認した。ジェノパス卵母細胞中の A R の異所性発現は、レポーターのアゴニスト刺激活性を生ずる。P R M T 1 の共発現は、更に A R による活性化を増大した。重要なことに、P R M T 1 (G 8 0 R) 変異は、野生型 P R M T 1 と比較すると少ししかコアクチベーター活性を有さない。ウエスタンプロット分析は、転写の相違は、P R M T 1 および P R M T 1 (G 8 0 R) の異なる発現または A R 発現における効果に起因するものではないことを示した。そのため、P R M T 1 の H M T 活性は、そのコアクチベーター活性に重要となる。

30

40

#### 【 0 1 0 2 】

これらの研究は、A r g 3 メチル化とリシンアセチル化との間の相互作用を示し、「ヒストンコード」仮説を支持するものである。当該ヒストンコードの仮説は、ヒストンタンパク質およびその関連共有結合修飾は、クロマチン構造を変化し得る機構に寄与し、それによって、転写の「on - off」状態に遺伝的な相違を生じるかまたは分化したより高い次数の構造を明らかとすることによりクロモソームの安定な増加を生ずるという前提に基づく。H 4 A r g 3 メチル化は、転写活性化に重要な役割をすると考えられる。興味あ

50

ることに、H3 - 特異的アルギニンメチルトランスフェラーゼ CARM1 はまた、書くホルモンレセプターコアクチベーターとして機能得ることが示された。Arg3メチル化がp300のような特定HATの集積(recruitment)を手助けするかどうかは依然として決定される。

【図面の簡単な説明】

【0103】

【図1】図1は、非修飾した、またはArg3メチル化したH4 1-9ペプチドを用いるH4 Arg3メチル特異的ウサギ抗血清(α-H4 R3Me)のELISA分析を解説するグラフである。

【図2】図2Aは、<sup>3</sup>H-アセチル-CoAの存在下でp300アセチル化したmock-(rH4)およびPRMT1-メチル化[rH4(mR3)]組換えH4ヒストンからのデータを示す。サンプルを、クマジー、ウエスタン(H4 Arg3Me特異的抗体を用いる)およびフルオログラム(fluorogram)により分析した。PRMT1によるH4のメチル化は、その後のp300によるアセチル化を刺激した。図2Bは、図2Aで使用したサンプルのTriton-Acetic Acid-Urea(TAU)ゲル分析を示す。その結果は、PRMT1-メチル化H4は、非メチル化H4と比較するとp300にとっては、よりよい基質であることを示す。

10

【図1】

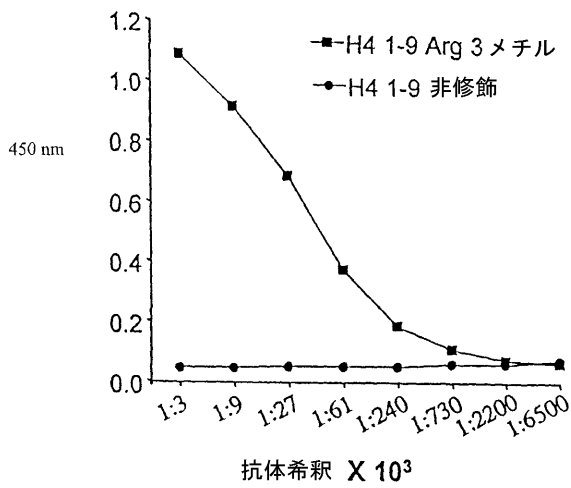


Fig. 1

【図2】

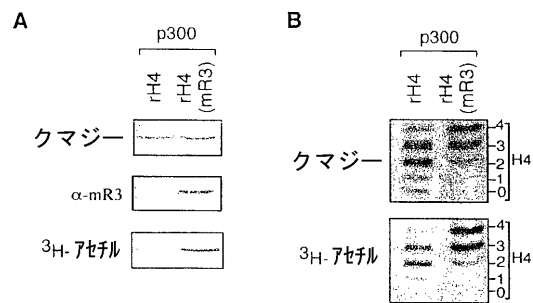


Fig. 2

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
16 January 2003 (16.01.2003)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 03/004050 A1

- (51) International Patent Classification: A61K 39/00, G01N 33/53, C07K 5/00, 7/00, 16/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/20906
- (22) International Filing Date: 2 July 2002 (02.07.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/302,811 3 July 2001 (03.07.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION [US/US]; Suite 1-110, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA 22903 (US).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): ALLIS, C., David [US/US]; 21 Old Farm Road, Charlottesville, VA 22903 (US). BRIGGS, Scott, D. [US/US]; 800 Norwood Lane, Lurysville, VA 22936 (US). STRAHL, Brian, D. [US/US]; 210 Glenmore Road, Chapel Hill, NC 27516 (US).
- (74) Agent: BREEN, John, P.; University of Virginia Patent Foundation, Suite 1-110, 1224 West Main Street, Charlottesville, VA 22903 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, MC, NL, PT, SI, SK, TR); OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
— with international search report  
— with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/004050 A1

(54) Title: METHYLATION OF HISTONE H4 AT ARGinine 3

(57) Abstract: The present invention relates to the generation of antibodies that bind to specific modifications of the amino terminus of histone H3 and H2A peptides. More particularly, the present invention is directed to the generation of a set of antibodies that recognize various post-translational modifications of a histone modification cassette SGRGK (SIQ ID NO: 1), wherein the modifications are selected from the group consisting of a phosphorylated serine, methylated arginine and acetylated lysine. Compositions comprising these antibodies are used as diagnostic and screening tools.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

**Methylation of Histone H4 at Arginine 3**

This application claims priority under 35 U.S.C. §119(e) to US  
Provisional Patent Application No. 60/302,811, filed on July 3, 2001, the disclosure  
5 of which is incorporated herein by reference in its entirety.

**US Government Rights**

This invention was made with United States Government support  
under Grant Nos. GM53512, GM20039, GM37537-14 and DK55274, awarded by the  
10 National Institutes of Health. The United States Government has certain rights in the  
invention.

**Field of the Invention**

The present invention is directed to antibodies that bind to histone  
15 epitopes created by post-translational modification of the histone protein,  
compositions comprising such antibodies, and the use of such compositions as  
diagnostic and screening tools.

**Background of the Invention**

20 In eukaryotes, DNA is complexed with histone proteins to form  
nucleosomes, the repeating subunits of chromatin. This packaging of DNA imposes a  
severe restriction to proteins seeking access to DNA for DNA-templated processes  
such as transcription or replication. It is becoming increasingly clear that post-  
translational modifications of histone amino-termini play an important role in  
25 determining the chromatin structure of the eukaryotic cell genome as well as  
regulating the expression of cellular genes.

Posttranslational modifications of histone amino-termini have long  
been thought to play a central role in the control of chromatin structure and function.  
A large number of covalent modifications of histones have been documented,  
30 including acetylation, phosphorylation, methylation, ubiquitination, and ADP  
ribosylation, that take place on the amino terminus "tail" domains of histones. Such  
diversity in the types of modifications and the remarkable specificity for residues  
undergoing these modifications suggest a complex hierarchy of order and

WO 03/004050

PCT/US02/20906

combinatorial function that remains unclear. Of the covalent modifications known to take place on histone amino-termini, acetylation is perhaps the best studied and appreciated. Recent studies have identified previously characterized coactivators and corepressors that acetylate or deacetylate, respectively, specific lysine residues in  
5 histones in response to their recruitment to target promoters in chromatin (See Berger (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11, 336-341). These studies provide compelling evidence that chromatin remodeling plays a fundamental role in the regulation of transcription from nucleosomal templates.

Chromosomes in higher eukaryotes have historically been considered  
10 to consist of regions of euchromatin and heterochromatin, which are distinguished by the degree of condensation and level of transcriptional activity of the underlying DNA sequences. Certain regions of constitutive heterochromatin are found at or near specialized structures such as centromeres, and are comprised mostly of genetically inert repetitive sequences. In contrast, other regions that have the same primary DNA  
15 sequences can exhibit characteristics of either type of chromatin, suggesting that epigenetic factors, such as packaging of DNA by histones and chromatin associated proteins, dictate the heterochromatin status at these loci.

Although the regulation of gene expression is probably one of the more intensely studied areas of current molecular biology, fundamental to all proliferating  
20 cells, whether they divide by mitosis or meiosis, is the faithful segregation of condensed chromosomes. In 1997, it was reported that histone H3 is uniquely phosphorylated at serine 10 during mitosis and meiosis in a wide range of organisms (Hendzel et al., 1997; Wei and Allis, 1998; Wei et al., 1998). Consistent with the hypothesis that H3 phosphorylation at serine 10 (Ser10) plays an important role with  
25 mitotic chromosome condensation *in vivo*, mutation of the H3 gene in *Tetrahymena* (S10A) displays abnormal patterns of chromosome segregation leading to extensive chromosome loss during mitosis and meiosis (Wei et al., 1999). Therefore post-translational modification of histones also appear to be involved in mitotic and meiotic processes.

30 Through the use of antibodies that specifically recognize histones that bear post-translational modifications, applicants have been elucidating a "histone code." In particular, evidence is emerging that histone proteins, and their associated covalent modifications, contribute to a mechanism that can alter chromatin structure,

WO 03/004050

PCT/US02/20906

thereby leading to inherited differences in transcriptional "on-off" states or to the stable propagation of chromosomes by defining a specialized higher-order structure.

In addition to the previously described histone code, a new theme is emerging in the field that histone modifications most likely do not function in isolation. For example, phosphorylation of H3 at Ser10 appears to have a 'split personality,' exhibiting clear links to mitotic chromatin as well as transcriptionally-active chromatin. These results seem counter-intuitive, but they have provided an impetus to explore if other neighboring modifications act together with Ser10 Phos H3 to distinguish these responses. Recent data, collected in yeast and in mammalian cells, document that Phos (Ser10) H3 can function in some circumstances with adjacent or nearby acetylation sites (Lys9 and/or Lys14). The exact order of addition or degree of non-randomness of these events remains controversial. Nevertheless, the Phos/Acetyl di-modification of H3 seems to be part of a highly conserved gene-inductive response.

The fact that post-translational modifications of adjacent amino acid residues may interact to produce an effect has led to the notion that certain "histone modification cassettes" exist that regulate basic genomic functions such as transcription and replication. A histone modification cassette comprises a primary histone amino acid sequence that contains two or more sites that are naturally modified under certain circumstances, wherein the post-translational modifications interact to give an specific response. One aspect of the present invention is directed to a "histone modification cassette" that is centered around a methylation site at Arg3 of histone 4.

Histone methylation is one of the least-understood post-translational modifications affecting histones. Early work suggests that H3 and H4 are the primary histones modified by methylation, and sequencing studies, using bulk histones, have shown that several lysines (e.g., 9 and 27 of H3 and 20 of H4) are often preferred sites of methylation, although species-specific differences appear to exist. Interestingly, each modified lysine has the capacity to be mono-, di-, or trimethylated, adding yet another level of variation to this post-translational "mark." One major obstacle in understanding the function of histone methylation is the lack of information about the responsible enzymes. The demonstrations that SUV39H1, the human homologue of the *Drosophila* heterochromatic protein Su(var)3-9, is an H3-specific

WO 03/004050

PCT/US02/20906

methyltransferase, and that methylation of lysine 9 (Lys 9) on histone H3 serves as a binding site for the heterochromatin protein 1 (HP1) underscore the importance of histone lysine methylation in heterochromatin function. In addition to lysine residues, methylation of histones can also occur on arginine residues. The recent demonstrations that a nuclear receptor co-activator-associated protein, CARM1, is an H3-specific arginine methyltransferase suggests that histone arginine methylation may be involved in transcriptional activation.

One aspect of the present invention is directed to antibodies that recognize specific postranlational modifications patterns of histones and other DNA associated proteins, that are associated with transcriptional or mitotic activity. More particularly, the present invention is directed to antibodies that are specific for the H2A and H4 histones methylated at the amino terminal Arginine (located at amino acid position number 3).

#### 15 **Summary of the Invention**

The present invention is directed to antibodies that bind to specific modifications of the amino terminus of histone H3 and H2A peptides. More particularly, the present invention is directed to the generation of a set of antibodies that recognize various post-translational modifications of a histone modification cassette. These antibodies recognize various modifications of the amino acid sequence SGRGK (SEQ ID NO: 1), wherein the modifications are selected from the group consisting of a phosphorylated serine, methylated arginine and acetylated lysine. Furthermore these antibodies recognize epitopes on non-histone proteins that may be linked to human biology and disease. Compositions comprising these antibodies are used as diagnostic and screening tools.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

**Brief Description of the Drawings**

Fig. 1 is a graph demonstrating an ELISA analysis of a H4 Arg 3 methyl-specific rabbit antiserum ( $\alpha$ -H4 R3Me) using unmodified or Arg 3 methylated H4 1-9 peptides.

5 Fig. 2A represents data from mock- (rH4) and PRMT1-methylated [rH4(mR3)] recombinant H4 histone that was subjected to p300 acetylation in the presence of  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA. Samples were analyzed by Coomassie, Western (using the H4 Arg3Me specific antibody) and fluorogram. Methylation of H4 by PRMT1 stimulated its subsequent acetylation by p300

10 Fig. 2B represents a Triton-Acetic Acid-Urea (TAU) gel analysis of the samples used in Fig. 2A. The results demonstrate that PRMT1-methylated H4 is a better substrate for p300 when compared to non-methylated H4.

**Detailed Description of the Invention****15 Definitions**

In describing and claiming the invention, the following terminology will be used in accordance with the definitions set forth below.

As used herein, the term "nucleic acid" encompasses RNA as well as single and double-stranded DNA and cDNA. Furthermore, the terms, "nucleic acid,"  
 20 "DNA," "RNA" and similar terms also include nucleic acid analogs, i.e. analogs having other than a phosphodiester backbone. For example, the so-called "peptide nucleic acids," which are known in the art and have peptide bonds instead of phosphodiester bonds in the backbone, are considered within the scope of the present invention.

25 The term "peptide" encompasses a sequence of 3 or more amino acids wherein the amino acids are naturally occurring or synthetic (non-naturally occurring) amino acids. Peptide mimetics include peptides having one or more of the following modifications:

1. peptides wherein one or more of the peptidyl  $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$  linkages (bonds)  
 30 have been replaced by a non-peptidyl linkage such as a  $-\text{CH}_2$ -carbamate linkage ( $-\text{CH}_2\text{OC}(\text{O})\text{NR}-$ ), a phosphonate linkage, a  $-\text{CH}_2$ -sulfonamide ( $-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}-$ ) linkage, a urea ( $-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}-$ ) linkage, a  $-\text{CH}_2$ -secondary amine linkage, or with an alkylated peptidyl linkage ( $-\text{C}(\text{O})\text{NR}-$ ) wherein R is C1-C4 alkyl;

WO 03/004050

PCT/US02/20906

2. peptides wherein the N-terminus is derivatized to a --NRR1 group, to a --NRC(O)R group, to a --NRC(O)OR group, to a --NRS(O)2R group, to a --NHC(O)NHR group where R and R1 are hydrogen or C1-C4 alkyl with the proviso that R and R1 are not both hydrogen;

5 3. peptides wherein the C terminus is derivatized to --C(O)R2 where R 2 is selected from the group consisting of C1-C4 alkoxy, and --NR3R4 where R3 and R4 are independently selected from the group consisting of hydrogen and C1-C4 alkyl.

Naturally occurring amino acid residues in peptides are abbreviated as recommended by the IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission as

10 follows: Phenylalanine is Phe or F; Leucine is Leu or L; Isoleucine is Ile or I; Methionine is Met or M; Norleucine is Nle; Valine is Val or V; Serine is Ser or S; Proline is Pro or P; Threonine is Thr or T; Alanine is Ala or A; Tyrosine is Tyr or Y; Histidine is His or H; Glutamine is Gln or Q; Asparagine is Asn or N; Lysine is Lys or K; Aspartic Acid is Asp or D; Glutamic Acid is Glu or E; Cysteine is Cys or C;  
15 Tryptophan is Trp or W; Arginine is Arg or R; Glycine is Gly or G, and X is any amino acid. Other naturally occurring amino acids include, by way of example, 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, and the like.

As used herein, the term "conservative amino acid substitution" is defined herein as exchanges within one of the following five groups:

20 I. Small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Polar, negatively charged residues and their amides:

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Polar, positively charged residues:

25 His, Arg, Lys;

IV. Large, aliphatic, nonpolar residues:

Met, Leu, Ile, Val, Cys

V. Large, aromatic residues:

Phe, Tyr, Trp

30

As used herein, the term "purified" and like terms relate to the isolation of a molecule or compound in a form that is substantially free (i.e. are at least 60%

WO 03/004050

PCT/US02/20906

free, preferably 75% free, and most preferably 90% free) from other components with which they are naturally associated.

As used herein the term "solid support" relates to a solvent insoluble substrate that is capable of forming linkages (preferably covalent bonds) with soluble molecules. The support can be either biological in nature, such as, without limitation, a cell or bacteriophage particle, or synthetic, such as, without limitation, an acrylamide derivative, glass, plastic, agarose, cellulose, nylon, silica, or magnetized particles. The surface of such supports may be solid or porous and of any convenient shape.

The term "linked" or like terms refers to the connection between two groups. The linkage may comprise a covalent, ionic, or hydrogen bond or other interaction that binds two compounds or substances to one another.

"Operably linked" refers to a juxtaposition wherein the components are configured so as to perform their usual function. For example, control sequences or promoters operably linked to a coding sequence are capable of effecting the expression of the coding sequence.

As used herein, the terms "complementary" or "complementarity" are used in reference to polynucleotides (i.e., a sequence of nucleotides) related by the base-pairing rules. For example, for the sequence "A-G-T," is complementary to the sequence "T-C-A."

As used herein, the term "hybridization" is used in reference to the pairing of complementary nucleic acids. Hybridization and the strength of hybridization (i.e., the strength of the association between the nucleic acids) is impacted by such factors as the degree of complementarity between the nucleic acids, stringency of the conditions involved, the length of the formed hybrid, and the G:C ratio within the nucleic acids.

"Therapeutic agent," "pharmaceutical agent" or "drug" refers to any therapeutic or prophylactic agent which may be used in the treatment (including the prevention, diagnosis, alleviation, or cure) of a malady, affliction, disease or injury in a patient.

As used herein, the term "treating" includes alleviating the symptoms associated with a specific disorder or condition and/or preventing or eliminating said

WO 03/004050

PCT/US02/20906

symptoms. For example, treating cancer includes preventing or slowing the growth and/or division of cancer cells as well as killing cancer cells.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier" encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water and emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents and includes agents approved by a regulatory agency of the US Federal government or listed in the US Pharmacopeia for use in animals, including humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient or vehicle with which an active agent is administered.

As used herein, the term "histone modification cassette" is intended to include any grouping of two or more histone modifications within a contiguous amino acid sequence of a histone tail that in combination are associated with a specific biological response. Examples of specific biological responses include but are not limited to transcriptional activation and the initiation of mitosis or meiosis.

As used herein, the term "post-translational modification cassette" is intended to include any grouping of two or more post-translational modifications of a contiguous amino acid sequence that in combination are associated with a specific biological response.

As used herein, the term "antibody" refers to a polyclonal or monoclonal antibody or a binding fragment thereof such as Fab, F(ab')<sub>2</sub> and Fv fragments.

As used herein, the term "biologically active fragments" of the antibodies described herein encompasses natural or synthetic portions of the respective full-length antibody that retain the capability of specific binding to the target epitope.

As used herein, the term "parenteral" includes administration subcutaneously, intravenously or intramuscularly.

As used herein the designation Ser(P) when used in the context of an amino acid sequence, will represent a serine amino acid that has been phosphorylated.

As used herein the designation Lys(A), when used in the context of an amino acid sequence, will represent a lysine amino acid that has been acetylated.

As used herein the designation Arg(M), when used in the context of an amino acid sequence, will represent an arginine amino acid that has been methylated.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

### The Invention

The present invention is directed to compositions and methods for identifying transcriptionally active and inactive regions of chromatin and the use of such information for diagnostic and therapeutic purposes. The compositions comprise antibodies that are specific for certain post-translational modifications of histone proteins that have been associated with a biological state. Recent results have suggested that histones are a potential physiological targets for arginine methylation. Analysis of histones isolated from human cells revealed that some but not all H4 molecules are methylated at Arg 3. Antibodies specific to this methylation site in histone H4 have been generated and have revealed that this modification site plays a role in transcriptional activation.

To identify enzymes involved in core histone methylation, nuclear proteins from HeLa cells were separated into a nuclear extract and nuclear pellet followed by further fractionation on DEAE52 and phosphate cellulose P11 columns. The resulting fractions were assayed for methyltransferase activity using core histone octamers as substrates. By following histone methyltransferase (HMT) activity an H4-specific HMT from the nuclear pellet fraction was purified to homogeneity. Silver staining of a SDS-PAGE containing the column fractions revealed again that a 42 kDa polypeptide co-eluted with the enzymatic activity. Mass spectrometry analysis identified the 42 kDa polypeptide as the human protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1.

The identification of PRMT1 as one of the most abundant H4-specific HMT is surprising since only Lys 20 of H4 has been reported to be methylated *in vivo*, and PRMT1 is not known to be able to methylate lysine residues. To determine whether PRMT1 methylates H4 on Lys 20, core histone octamers were methylated with recombinant or native PRMT1 in the presence of S-adenosyl-L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (<sup>3</sup>H-SAM). After separation by SDS-PAGE, methylated H4 was recovered and microsequenced by automated Edman chemical sequencing. Sequentially released amino acid derivatives were collected and counted by liquid scintillation revealing that Arg 3, instead of Lys 20, was the major methylation site.

To determine whether Arg3 methylation occurs *in vivo*, antibodies against an Arg 3-methylated histone H4 N-terminal peptide were generated. In

WO 03/004050

PCT/US02/20906

particular, a synthetic peptide coding for the human H4 N-terminal 9 amino acids (SGRGKGGKGC\*, SEQ ID NO: 15), in which the first serine was N-acetylated and residue 3 was asymmetric NG,NG-dimethylated (Bachem), was conjugated to keyhole limpet hemocyanin via a C-terminal artificial cysteine (C\*) prior to rabbit

5 immunization.

The resulting antibody reacts strongly with PRMT1-methylated H4, and does not recognize equal amounts of recombinant H4 expressed in *E. coli*, indicating that the antibody is methyl-Arg 3-specific. Significantly, this same antibody also recognized histone H4 purified from HeLa cells indicating certain level

10 of Arg 3-methylation occurs *in vivo*. H2A can also be weakly methylated by PRMT1 *in vitro* and methylated H2A can be recognized by the methy-Arg 3 antibody. The methylation site on H2A is likely to be Arg 3 because H2A has the same extreme N-terminal sequence SGRGK (SEQ ID NO: 1) as that of H4. However, the endogenous H2A methylation level has not been detected under the similar conditions.

15 The extreme N-terminal sequence SGRGK (SEQ ID NO: 1) of H4 and H2A is also subject to several other post-translational modifications including phosphorylation of serine 1 and acetylation of lysine 5. These three modifications interact and constitute what will be referred to as a "post-translational modification cassette." More particularly, certain modifications of the primary sequence SGRGK

20 (SEQ ID NO: 1) have been associated with specific biological responses, including transcriptional activation and the initiation of mitosis or meiosis. Applicants have found that antibodies generated against the modified sequence Ser(P) Gly Arg Gly Lys (SEQ ID NO: 3) serve as a mitotic marker, similar to antibodies raised against Phos Ser10 in H3. Furthermore, antibodies generated against the modified sequence Ser

25 Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2) and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) (SEQ ID NO: 6) served as markers of transcriptional activity. Accordingly, this region of H4 appears to be involved in both transcriptional up-regulation as well as mitosis depending on the particular postranlational modification of the primary amino acid sequence.

30

WO 03/004050

PCT/US02/20906

One aspect of the present invention is directed to antigenic peptides comprising an amino acid sequence of 5 to 20, and more preferably 5-9 amino acid residues wherein the amino acid sequence is selected from the group consisting of:

- 5 Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),  
 and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7),

10 wherein "Ser(P)", "Arg(M)" and "Lys(A)" represents a phosphorylated serine, a methylated Arg residue and an acetylated lysine, respectively. Preferably the peptide is a purified antigenic fragment of a histone protein, or a corresponding a synthetic equivalent thereof, comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- 15 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
 Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 9),  
 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
 Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 11),  
 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),  
 20 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),  
 and Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14).

More particularly the antigenic peptide comprises a 9 to 20 amino acid sequence, and more preferably a 9 amino acid sequence, wherein the amino acid sequence comprises the sequence of SEQ ID NOs: 8-14, or an amino acid sequence that differs from SEQ  
 25 ID NOs: 8-14 by a single conservative amino acid substitution at positions 6-9 (i.e. a substitution within the sequence Gly Gly Lys Gly of those peptides). In an alternative embodiment, the purified antigen comprises and amino acid sequence selected from the group of SEQ ID NOs: 1-13 linked to a suitable carrier, such as bovine serum albumin or Keyhole limpet hemocyanin.

30 In one preferred embodiment the antigen consists of a peptide having at least nine consecutive residues and comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys (SEQ ID NO: 4), Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) (SEQ ID NO: 6) and Ser Gly Arg(M) Gly Lys (SEQ ID NO: 2).

WO 03/004050

PCT/US02/20906

In another embodiment the antigenic composition consists an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12 and derivatives of these amino acid sequences wherein the amino acid sequence contains one or more conservative amino acid substitutions at positions 6-9 (i.e. a substitution within the sequence Gly Gly Lys Gly of those peptides), and optionally a carrier protein linked to the peptide. In another embodiment, the purified antigen consists of a peptide having at least nine consecutive residues of the amino acid sequence: Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14), and derivatives of this amino acid sequence wherein the amino acid sequence contains one or more conservative amino acid substitutions, and optionally a carrier protein linked to the peptide.

The present invention also encompasses antibodies generated against the modified peptides. One method used to generate these antibodies involves administration of the respective antigens to a laboratory animal, typically a rabbit, to trigger production of antibodies specific for the antigen. Accordingly the present invention also encompasses antigenic compositions comprising a peptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of the peptides of SEQ ID NO: 2 - SEQ ID NO: 14 and a pharmaceutically acceptable carrier. The composition may further comprise diluents, excipients, solubilizing agents, stabilizers and adjuvants. Carriers and diluents suitable for use with the present invention include sterile liquids such as water and oils. Illustrative oils are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, or mineral oil. In general, water, saline, aqueous dextrose, and related sugar solution, and glycols such as, propylene glycol or polyethylene glycol, are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable adjuvants include alum or complete Freund's adjuvant (such as Montanide ISA-51).

The dose and regimen of antigen administration necessary to trigger antibody production as well as the methods for purification of the antibody are well known to those skilled in the art. Typically, such antibodies can be raised by administering the antigen of interest subcutaneously to New Zealand white rabbits which have first been bled to obtain pre-immune serum. The antigens can be injected at a total volume of 100 ul per site at six different sites. Each injected material will

WO 03/004050

PCT/US02/20906

contain synthetic surfactant adjuvant pluronic polyols, or pulverized acrylamide gel containing the protein or polypeptide after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

The rabbits are then bled two weeks after the first injection and periodically boosted with the same antigen three times every six weeks. A sample of serum is then collected 10 days after each boost. Polyclonal antibodies are then recovered from the serum by affinity chromatography using the corresponding antigen to capture the antibody. Ultimately, the rabbits are euthenized with pentobarbital 150 mg/Kg IV. This and other procedures for raising polyclonal antibodies are disclosed in E. Harlow, et. al., editors, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), which is hereby incorporated by reference. The specificity of antibodies may be determined by enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting, or similar methods known to those skilled in the art.

On aspect of the present invention is directed to antibodies that specifically bind to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

- Ser Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 1)
- Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),
- Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),
- Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),
- Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),
- Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),
- and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7). In one embodiment the antibodies of the present invention specifically bind to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of
- Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),
- Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 9),
- Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),
- Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 11),
- Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),
- Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),
- and Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14).

WO 03/004050

PCT/US02/20906

More particularly, the antibody specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),

Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),

5 Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),

and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),

In one embodiment the present invention is directed to an antibody that specifically binds to the polypeptide Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8), or an antibody that specifically binds to the polypeptide Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10) or an antibody that specifically binds to the polypeptide Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12) or an antibody that specifically binds to the polypeptide Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14). As used herein, an antibody that binds specifically to a target antigen is an antibody that will produce a detectable signal in the presence of the target antigen but will not cross react with other non-target antigens (i.e. produces no detectable signal) under the identical conditions used to detect the target antigen. For example the monoclonal antibody generated against Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8) will not bind to the sequence Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14) or any of the other peptides of SEQ ID NO: 9-13, when optimal conditions are used.

In one preferred embodiment the antibody for the target modified peptide is a monoclonal antibody. Monoclonal antibody production may be effected using techniques well-known to those skilled in the art. Basically, the process involves first obtaining immune cells (lymphocytes) from the spleen of a mammal (e.g., mouse) which has been previously immunized with the antigen of interest either *in vivo* or *in vitro*. The antibody-secreting lymphocytes are then fused with myeloma cells or transformed cells, which are capable of replicating indefinitely in cell culture, thereby producing an immortal, immunoglobulin-secreting cell line. The resulting fused cells, or hybridomas, are cultured, and the resulting colonies screened for the production of the desired monoclonal antibodies. Colonies producing such antibodies are cloned, and grown either *in vivo* or *in vitro* to produce large quantities of antibody. One embodiment of the invention is directed to a hybridoma cell line which produces monoclonal antibodies which bind one of the target antigens of SEQ ID NO: 1 - SEQ

WO 03/004050

PCT/US02/20906

ID NO: 14. A description of the theoretical basis and practical methodology of fusing such cells is set forth in Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), which is hereby incorporated by reference.

In addition to whole antibodies, fragments of antibodies can retain  
5 binding specificity for a particular antigen. Antibody fragments can be generated by several methods, including, but not limited to proteolysis or synthesis using recombinant DNA technology. An example of such an embodiment is selective proteolysis of an antibody by papain to generate Fab fragments, or by pepsin to generate a F(ab')<sub>2</sub> fragment. These antibody fragments can be made by conventional  
10 procedures, as described in J. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), which is hereby incorporated by reference. Other fragments of the present antibodies which retain the specific binding of the whole antibody can be generated by other means known to those skilled in the art.

15 The antibodies or antibody fragments of the present invention can be combined with a carrier or diluent to form a composition. These compositions can be used in standard Molecular Biology techniques such as Western blot analyses, immunofluorescence, and immunoprecipitation. In accordance with one embodiment the antibodies of the present invention are labeled for use in diagnostics or  
20 therapeutics. It is not intended that the present invention be limited to any particular detection system or label. The antibody may be labeled with a radioisotope, such as <sup>35</sup>S, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>I, <sup>99m</sup>Tc, <sup>32</sup>P, <sup>125</sup>I, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, and <sup>188</sup>Rh, or a non-isotopic labeling reagent including fluorescent labels, such as fluorescein and rhodamine, or other non-isotopic labeling reagents such as biotin or digoxigenin. Antibodies  
25 containing biotin may be detected using "detection reagents" such as avidin conjugated to any desirable label such as a fluorochrome. Additional labels suitable for use in accordance with the present invention include nuclear magnetic resonance active labels, electron dense or radiopaque materials, positron emitting isotopes detectable by a positron emission tomography ("PET") scanner, chemiluminescers  
30 such as luciferin, and enzymatic markers such as peroxidase or phosphatase. In one embodiment the histone specific antibodies of the present invention are detected through the use of a secondary antibody, wherein the secondary antibody is labeled and is specific for the primary antibody. Alternatively, the antibodies of the present

WO 03/004050

PCT/US02/20906

invention may be directly labeled with a radioisotope or fluorochrome such as FITC or rhodamine; in such cases secondary detection reagents may not be required for the detection of the labeled probe. In accordance with one preferred embodiment the antibody is labeled with a fluorophore or chromophore using standard moieties known  
5 in the art.

In accordance with one embodiment of the present invention a method of detecting modified histone proteins is provided, and more specifically modifications of H4 or H2A histones at one of the first 5 amino acids of the amino terminus of the histone. The method comprises the steps of contacting histone  
10 proteins with an antibody, wherein the antibody specifically binds only to the H4 or H2A histones that comprise a modified sequence selected from the group consisting of:

Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),  
Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),  
15 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),  
and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7).

More preferably the antibody specifically binds to a H4 or H2A histone that comprises  
20 the amino acid sequence Ser Gly Arg(M) Gly Lys (SEQ ID NO: 2), or Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys (SEQ ID NO: 4), or Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) (SEQ ID NO: 6).

The antibodies of the present invention can be linked to a detectable label using standard reagents and techniques known to those skilled in the art. For example, see Wensel and Meares, Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy,  
25 Elsevier, New York (1983), which is hereby incorporated by reference, for techniques relating to the radiolabeling of antibodies. See also, D. Colcher et al., "Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice," Meth. EnzymQL, 121: 802-816 (1986), which is hereby incorporated by reference.

30 Applicants have discovered that postranlational modifications of the first five amino acids of the amino terminus of histone H4, particularly at serine 1, arginine 3 and lysine 5, correlates with the activation and inactivation gene expression for genes in proximity to the modified histones. In particular, histone H4 that contains

WO 03/004050

PCT/US02/20906

a methylated Arg3 has been associated with transcriptional activity, particularly when the methylation of Arg3 is accompanied by the acetylation of Lys5. In addition, chromatin containing histone H4, wherein the H4 contains a methylated Arg3 and a phosphorylated Ser1, is associated with transcriptionally silent regions and serves as a marker for mitotic activity. Accordingly, in one embodiment of the present invention, antibodies specific for the methylated Arg3/acetylated Lys5 histone H4 can be used to detect transcriptionally active regions of chromatin, and antibodies specific for the methylated Arg3/phosphorylated Ser1 histone H4 can be used to detect inactive regions of chromatin and mitotically active cells.

10 In accordance with one embodiment, a method of detecting transcriptionally active regions of chromatin is provided. The method comprises the steps of contacting a chromatin containing sample with an antibody that specifically binds to the sequence Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12) under conditions suitable for specific binding and for a time sufficient to allow the antibody to bind to its target. In one preferred embodiment either the antibody or the chromatin is bound to a solid support. The sample is then washed with a buffered solution to remove unbound and non-specific bound antibody from the sample, and chromatin regions that retain the antibody are identified as transcriptionally active regions of chromatin. In one embodiment the antibody is directly labeled with a detectable label (such as a radioisotope or fluorophore) or in an alternative 20 embodiment a secondary antibody is used to detect the antibody, wherein the secondary antibody is a labeled anti-immunoglobulin antibody specific for the primary antibody.

In another embodiment of the present invention a method of detecting mitotically active cells is provided. The method comprises the steps of obtaining a sample of cells (including a biopsy sample) and preparing the sample cells for histological analysis using standard techniques. The population of cells is then contacted with an antibody that specifically binds to the sequence Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10) under conditions suitable for specific binding and for a time sufficient to allow the antibody to bind to its target. In one preferred embodiment either the antibody or the cells are bound to a solid support. The sample is then washed with a buffered solution to remove unbound and non-specific bound antibody from the sample, and the mitotically active cells are 25

WO 03/004050

PCT/US02/20906

identified as those cells with antibody bound to them. By comparing the number of actively dividing cells in a sample a disease characterized by inappropriate cell growth (either excessive or insufficient cell growth) can be identified. Thus the method can be used as a diagnostic for identifying disease states. In one embodiment the antibody  
5 is directly labeled with a detectable label (such as a radioisotope or fluorophore) or in an alternative embodiment a secondary antibody is used to detect the antibody, wherein the secondary antibody is a labeled anti-immunoglobulin antibody specific for the primary antibody.

The use of the modification SGRGK cassette antibodies (i.e. SEQ ID  
10 NOs: 2-13) in chromatin immunoprecipitation (chromatin IP) assays (and more particularly antibodies against the peptides Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10) and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12) is one way to enrich for genomic DNA corresponding to the epigenetic 'ON/OFF' state of the human genome (and other genomes as well). By combining chromatin  
15 immunoprecipitated DNA with current genomic microarray technology (on chips), one has the potential to survey any portion of the human (or other) genome as to their on/off state through the 'histone code'. More particularly, the use of antibodies directed to amino acid sequences Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu, (SEQ ID NO: 10) and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly Leu, (SEQ ID  
20 NO: 12), will allow for the detection of chromatin associated with transcriptionally inactive and transcriptionally on, respectively. After segregating the chromatin into heterochromatin and euchromatin, DNA chips can be used to assess what genes are being expressed/suppressed in a particular tissue.

In one embodiment, immunoprecipitation of chromatin will be used to  
25 map the location of active genes at a genome-wide level through the use of microarrays. For example, in one preferred embodiment the method of comparing the two pools of immunoprecipitated chromatin (i.e. the immunoprecipitated chromatin from diseased vs healthy tissues) comprises the use of a gene chip, DNA microarray, or a proteomics chip using standard techniques known to those skilled in the art. For  
30 example any of the systems described in WO 01/16860, WO 01/16860, WO 01/05935, WO 00/79326, WO 00/73504, WO 00/71746 and WO 00/53811 (the disclosures of which are expressly incorporated herein) are suitable for use in the present invention. Preferably the chip will contain an ordered array of known compounds (such as

WO 03/004050

PCT/US02/20906

known DNA sequences, antibodies or other ligands) so that interaction of the immunoprecipitated chromatin (or the individual DNA or protein components recovered from the immunoprecipitated chromatin) at a specific location of the chip will identify, and allow for the isolation of, DNA sequences or proteins associated with the immunoprecipitated chromatin.

In accordance with one embodiment a method is provided for detecting chromatin alterations that are associated with a disease state. The term "disease state" is intended to encompass any condition that is associated with an impairment of the normal state of a living animal or plant including congenital defects, pathological conditions such as cancer, and responses to environmental factors and infectious agents (bacterial, viral, etc.). The method comprises the steps of isolating chromatin from both normal and diseased tissue, contacting the two pools of chromatin with an antibody that specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

15 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 9),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 11),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),  
20 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),  
and Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14), and more

preferably, an antibody that specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

25 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12); and  
comparing the staining pattern of the chromatin isolated from normal tissue to that of the diseased tissue. More particularly, the staining pattern of the two pools of chromatin isolated by immunoprecipitation can be compared through the use of any  
30 standard technique, including Coomassie stained gels, Western blot analysis, Southern blot analysis, or sequencing of the protein or nucleic acid sequences associated with the respective immunoprecipitated chromatin. Of particular interest are those

WO 03/004050

PCT/US02/20906

sequences that are present in only one of the two pools of chromatin (or present in substantially lower amounts in one pool vs the other).

In one embodiment chromatin immunoprecipitation using the antibodies of the present invention, in combination with differential screening techniques, is used to isolate unique tumor suppressor genes or other markers of a disease state. In this method chromatin is immunoprecipitated from two separate pools of chromatin, isolated from normal tissue and diseased tissue, respectively. The antibody used would preferably be an antibody that specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of

10 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12). The chromatin associated proteins and nucleic acids are then recovered from the respective immunoprecipitated pools of chromatin and compared using standard techniques. In one embodiment the two pools of recovered protein/nucleic acids are compared using standard techniques. Proteins present in one pool of recovered proteins but absent (or substantially reduced in quantity) or otherwise altered in the other pool of proteins will be identified, again using standard techniques, such as microsequencing or Tandem Mass Spectroscopic Analysis. Similarly, nucleic acid sequences will be analyzed by standard techniques including PCR, gel electrophoresis, nucleic acid sequencing, nucleic acid hybridization analysis and Tandem Mass Spectroscopic Analysis to identify nucleic acid sequences present in one pool of recovered sequences but absent (or substantially reduced in quantity) the other pool of recovered nucleic acid sequences.

25 Using the antibodies of the present invention alterations in chromatin structure that are associated with a given disease state can be detected. For example, the antibodies can be used as a diagnostic to detect alterations of chromatin structure that are associated with alterations in expression patterns (i.e. differences in heterochromatin vs euchromatin patterns relative to predominant native patterns).  
30 Alterations in chromatin structure for a specific region of chromatin may be diagnostic of a particular disease state. For example, conversion of a normally euchromatic region of the genome to heterochromatin may represent the suppression of a tumor suppressor gene that is indicative of cancer or a pre-cancer state. Similarly

WO 03/004050

PCT/US02/20906

the conversion of a region of heterochromatin to euchromatin may be associated with the inappropriate or overexpression of a gene that has deleterious effects on the host cell/organism.

The present invention is also directed to a method of using broad-based  
5 differential screening techniques to isolate nucleic acid regions that have altered expression patterns in diseased tissues. For example, chromatin can be isolated from diseased tissues and compared to chromatin isolated from healthy tissues to determine if there are any differences in the chromatin structure (i.e. changes in heterochromatin vs. euchromatin) that are associated with the disease state. Such differences in  
10 chromatin structure may represent suppression or overexpression of genes that play a direct or indirect role in the disease. The antibodies directed against the peptide sequences Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12) can be used to detect such changes in chromatin structure and help identify genes that are associated with  
15 the disease state. The identification of such genes will assist in designing more effective therapies for treating the disease.

In one embodiment the method for detecting alterations in chromatin structure associated with a particular disease comprises chromatin immunoprecipitation assays, using modification-specific histone antibodies. This  
20 process allows for the analysis of a wide range of DNA-templated processes that are governed by the chromatin environment. More particularly, the method comprises the steps of isolating chromatin from both diseased tissue and healthy tissue, fragmenting the DNA (preferably by sonification), and immunoprecipitating chromatin using an antibody that specifically binds to an amino acid sequence selected from the group  
25 consisting of Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12), and comparing the chromatin (and the associated DNA sequences) immunoprecipitated from the healthy tissue relative to the diseased tissue. Comparison of the two pools of  
30 immunoprecipitated chromatin will allow for the identification of differences between diseased and healthy tissues.

It has recently been reported that nucleosomes can be detected in the serum of healthy individuals. Furthermore, the serum concentrations of nucleosomes is considerably higher in patients suffering from benign and malignant diseases

WO 03/004050

PCT/US02/20906

(Holdenrieder et al., *Int J Cancer*, 95(2): 114-120 (Mar 20, 2001)). Presumably, the high concentration of nucleosomes in tumor bearing patients derives from apoptosis, which occurs spontaneously in proliferating tumors. Thus, the presence of elevated levels of nucleosomes in the blood of patients can serve as a diagnostic of diseases associated with enhanced cell death (Holdenrieder et al., *Anticancer Res*, 19(4A): 2721-2724 (1999)).

In accordance with one embodiment a serum sample can be isolated from an individual and screened with the antibodies of the present invention as diagnostic procedure to detect various disease states. First of all the antibodies can be used to determine if an abnormal concentration of nucleosomes are present in the sample. Furthermore the detection of a particular histone modifications in the blood of an individual by itself may serve as a diagnostic for a particular disease state. In addition further analysis can be conducted by immunoprecipitating nucleosomes using the present antibodies and analyzing the proteins and nucleic acid sequences associated with the immunoprecipitated chromatin.

Because the antibodies of the present invention have the potential for use in humans as diagnostic and therapeutic agents, one embodiment of the present invention is directed to humanized versions of these antibodies. Humanized versions of the antibodies are needed for therapeutic applications because antibodies from non-human species may be recognized as foreign substances by the human immune system and neutralized such that they are less useful. Humanized antibodies are immunoglobulin molecules comprising a human and non-human portion. More specifically, the antigen combining region (variable region) of a humanized antibody is derived from a non-human source (e.g. murine) and the constant region of the humanized antibody is derived from a human source. The humanized antibody should have the antigen binding specificity of the non-human antibody molecule and the effector function conferred by the human antibody molecule. Typically, creation of a humanized antibody involves the use of recombinant DNA techniques.

In accordance with one embodiment, the antibodies of the present invention are attached to a solid support and used to immunoprecipitate chromatin. The antibodies of the present invention can also be linked to an insoluble support to provide a means of isolating euchromatin or heterochromatin from cells. The support may be in particulate or solid form and could include, but is not limited to: a plate, a

WO 03/004050

PCT/US02/20906

test tube, beads, a ball, a filter or a membrane. Methods for fixing antibodies to insoluble supports are known to those skilled in the art. In one embodiment an antibody of the current invention is fixed to an insoluble support that is suitable for use in affinity chromatography. Immunoprecipitation of chromatin will be used in one embodiment of the invention to map the location of DNA-binding proteins at a genome-wide level through the use of microarrays. In addition, chromatin immunoprecipitation assays, using modification-specific histone antibodies, can be used to analyze a wide range of DNA-templated processes that are governed by the chromatin environment.

10 The key to this technology is the use of antibodies specific to various modification as they relate to the histone code. Applying this to human and other genomes would lay the foundation of epigenomics. For example, antibodies specific for the Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys cassette vs. the Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) cassette may be a 'phos/acetyl' switch that regulates differentiation vs. proliferation.

15 Obtaining this information may prove invaluable in determining the on/off state of key tumor suppressor or oncogenic proteins in various human cancers. The Ser Gly Arg Gly Lys cassette is present in non-histone proteins. For example, the t(8;21) translocation type acute myeloid leukemia is an acute myeloid leukemia (hereinafter referred to as "AML") which accompanies translocation of a gene on chromosome 8 to chromosome 21. The translocated gene, AML1, contains the sequence Ser Gly Arg Gly Lys.

20 Knowing how the epigenetic marking associated with this peptide sequence corresponds to genomic DNA will also guide the ability to produce transgenic animals and plants where one often finds that most transgenic DNA enters a 'bad' chromatin environment and is silenced. Thus, the implications for knowing how to better 'guide' DNA into a 'good' chromatin environment (i.e. chromatin associated with H4 having the Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) modification) for animal and plant transgenic work are high. In humans, this would impact on gene therapy issues as well (if the gene of interest isn't expressed what good is it to the patient).

30

WO 03/004050

PCT/US02/20906

In one embodiment of the present invention a kit is provided for detecting euchromatin and heterochromatin. The kit comprises an antibody that specifically binds to an amino acid sequence selected from the group consisting of:

Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),  
5 Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),

and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7). More particularly  
10 the kit comprises an antibody that specifically binds to an amino acid sequence selected from the group consisting of

Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),

and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12). In one  
15 embodiment the antibodies are attached to a solid support, wherein the support is either a monolithic solid or is in particular form. In one preferred embodiment the antibodies are monoclonal antibodies and in a further embodiment the antibodies are labeled. To this end, the antibodies of the present invention can be packaged in a variety of containers, *e.g.*, vials, tubes, microtiter well plates, bottles, and the like.  
20 Other reagents can be included in separate containers and provided with the kit; *e.g.*, positive control samples, negative control samples, buffers, cell culture media, etc.

The kits of the present invention may further comprise reagents for detecting the monoclonal antibody once it is bound to the target antigen. Optionally, reagents (pepsin, dilute hydrochloric acid) for treating cells or tissue to render nuclear  
25 proteins accessible for immunological binding may also be included, as may immunofluorescent detection reagents (an anti-immunoglobulin antibody derivatized with fluorescein or rhodamine, or a biotinylated anti-immunoglobulin antibody together with avidin or streptavidin derivatized with fluorescein or rhodamine),  
immunohistochemical or immunocytochemical detection reagents (an anti-  
30 immunoglobulin antibody derivatized with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase, or a biotinylated anti-immunoglobulin antibody together with avidin or streptavidin derivatized with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase). In one embodiment, the kit includes one or more reagents for immunoperoxidase staining (an

WO 03/004050

PCT/US02/20906

anti-immunoglobulin antibody derivatized with horseradish peroxidase, or a biotinylated anti-immunoglobulin antibody together with avidin or streptavidin derivatized with horseradish peroxidase), together with a chromogenic substrate therefor (e.g., diaminobenzidine).

5 In an alternative embodiment a kit comprising the peptide Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 14), optionally attached to an insoluble support, can be provided for use in an assay to determine if a sample has methylase, kinase or acetylase activity. In one embodiment, the peptide is used to detect the level of PRMT1 activity of a given sample. The method comprises contacting the peptide  
10 with the sample for a predetermined length of time and then detecting the amount of methylation has occurred on the peptide substrate through the use of an antibody that binds only to the methylated peptide.

This assay can also be used in a method of screening for potential inhibitors of methylase, kinase or acetylase activity. For example, in one embodiment  
15 a method of screening for inhibitors of arginine methyl transfer activity comprises the steps of providing a sample that comprises the methylase and a substrate that is methylated by said methylase, adding a potential inhibitor of the methylase to the sample, contacting the sample with an antibody that binds specifically to the methylated substrate, but not the non-methylated substrate. In one embodiment the  
20 antibody is specific for the peptide Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8). Quantifying the amount of antibody bound to the peptide is a direct correlation of the level activity of the methylase in the sample. In one preferred embodiment the methylase activity to be detected is PRMT1.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

**Example 1****Identification of H3 Arginine Methylation**

Recent reports showing that CARM1 and PRMT1 methylate histones *in vitro* and contain transcriptional coactivator function suggest that histones are a potential physiological targets for arginine methylation. However, clear evidence for the existence of arginine methylation on histones has been lacking. To identify sites of arginine methylation on mammalian histones *in vivo*, histones isolated from asynchronously growing human 293T cells were individually purified by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), digested by chymotrypsin, and the resulting peptides examined by nano-HPLC microelectrospray ionization tandem mass spectrometry. Collision-activated dissociation (CAD) spectra of human H4 N-terminal chymotryptic peptides revealed an addition of a methyl group to the Arg 3 residue, indicating N G-monomethylation. The predicted b-and y-type ion series of the H4 peptide in which Arg 3 is monomethylated were observed. Furthermore, other CAD spectra show H4 N-terminal peptides lacking methylation at Arg 3, supporting the above characterization and indicating that some but not all H4 molecules are methylated at Arg 3.

While arginine residues are capable of being methylated at either or both of their two terminal guanidino nitrogen groups generating N G-monomethylarginine, symmetric N G, N 'G-dimethylarginine or asymmetric NG, NG-dimethylarginine, the analyses did not reveal the presence of dimethylarginine at H4 Arg 3. However, these data do not exclude the possibility that H4 Arg 3 dimethylation exists.

An antibody specific to this methylation site in histone H4 was generated using rabbits immunized with a H4 1-9 synthetic peptide in which Arg 3 was NG,NG-dimethylated. Specificity of this antiserum to methylated Arg 3 was verified by ELISA using N-terminal H4 1-9 peptides that were either unmodified or methylated at Arg 3 (Figure 1C). To examine the conservation of Arg 3 H4 methylation *in vivo*, histones isolated from multiple eukaryotic organisms were probed with the H4 Arg 3 methyl-specific antiserum (hereafter  $\alpha$ -H4 R3Me). Immunoblot analyses revealed the presence of Arg 3 methylation on H4 in all histones tested with the exception of *Tetrahymena* which contains a divergent extreme amino-terminal H4 tail lacking Arg 3 and recombinant *Xenopus* H4. Together with the mass

WO 03/004050

PCT/US02/20906

spectrometric analyses, these data suggest that the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody recognizes both mono- and dimethylarginine. These results clearly demonstrate the *in vivo* existence of arginine methylation in a broad range of eukaryotic histones. Given this conservation H4 Arg 3 methylation may play an important role in histone metabolism.

5

## Example 2

### Identification of the H3 Arginine Methylation Enzyme

To identify enzymes involved in core histone methylation, nuclear proteins from HeLa cells were separated into a nuclear extract and nuclear pellet followed by further fractionation on DEAE52 and phosphate cellulose P11 columns. The resulting fractions were assayed for methyltransferase activity using core histone octamers as substrates. In particular, column fractions or recombinant human protein arginine N-methyltransferase 1 (PRMT1) was incubated with core histone octamers, recombinant H4, or H4 tail peptides in a total volume of 30  $\mu$ l containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 4 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, and 1.5  $\mu$ l  $^3$ H-SAM (15 Ci/mmol; NEN Life Science Products) at 30°C for 1 hour. Reactions were stopped by the addition of SDS loading buffer followed by electrophoresis in an 18% SDS-PAGE. After Coomassie staining and destaining, gels were treated with Entensify (NEN Life Science Products) and dried before exposing to X-ray Film.

Multiple methyltransferase activities with distinctive specificity for histones H3 and H4 were detected. By following histone methyltransferase (HMT) activity, an H4-specific HMT was purified from the nuclear pellet fraction to homogeneity. Analysis of the column fractions derived from the Hydroxyapatite column indicated that the peak of the enzymatic activity eluted in fraction 14 and trailed through fraction 26. Silver staining of a SDS-PAGE containing the column fractions revealed that a polypeptide of 42 kDa co-eluted with the enzymatic activity. To confirm this result, the same input was loaded onto a gel-filtration Superose-200 column. Analysis of the column fractions indicated that the peak of the enzymatic activity eluted around 330 kDa between fractions 38-41. Silver staining of a SDS-PAGE containing the column fractions revealed again that a 42 kDa polypeptide co-eluted with the enzymatic activity. Mass spectrometry analysis identified the 42 kDa polypeptide as the human protein arginine N-methyltransferase 1, PRMT1.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

Since the HMT activity eluted around 330 kDa and only co-eluted with PRMT1, it is likely that PRMT1 functions as a homo-oligomer. This was verified by the demonstration that recombinant PRMT1 fractionated the same as the endogenous PRMT1, as a 330 kDa complex. Therefore, we conclude that PRMT1 functions as an H4-specific HMT in the form of homo-oligomer.

The identification of PRMT1 as one of the most abundant H4-specific HMT is surprising since only Lys 20 of H4 has been reported to be methylated *in vivo*, and that PRMT1 is not known to be able to methylate lysine residues. Instead, PRMT1 and its yeast homologue have been reported to mainly methylate arginine of certain RNA-binding proteins.

To determine whether PRMT1 methylates H4 on Lys 20, core histone octamers were methylated with recombinant or native PRMT1 in the presence of S-adenosyl-L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (<sup>3</sup>H-SAM). After separation by SDS-PAGE, methylated H4 was recovered and microsequenced by automated Edman chemical sequencing. Sequentially released amino acid derivatives were collected and counted by liquid scintillation revealing that Arg 3, instead of Lys 20, was the major methylation site. Comparison of the ability of PRMT1 to methylate H4 tail peptides with or without a mutation on Lys 20 showed no difference, confirming that Lys 20 is not a site for PRMT1 methylation.

To determine whether PRMT1 is responsible for this site-specific Arg 3 methylation *in vivo*, PRMT1 was over-expressed in cells to determine if there was a corresponding increase in the Arg 3 methylation level. Over-expression of PRMT1 resulted in an increase in Arg 3 methylation. To confirm this result, core histones from *PRMT1*<sup>+/+</sup> and *PRMT1*<sup>-/-</sup> embryonic stem (ES) cells were purified and compared for their Arg 3 methylation level. Inactivation of the *Prmt1* gene results in a dramatic decrease in the Arg 3 methylation level indicating that histone H4 is likely an *in vivo* substrate for PRMT1.

In fact, it appears that mitotic Arg3 methylation of H4 may occur slightly before Ser1 gets phosphorylated during the synchronous progression of mitotic divisions in the slime mold, *Physarum*. It also has been observed that Arg3 methyl H4 is enriched on the inactive X chromosome in mouse ES cells (E. Heard, unpublished). Collectively, these data suggest that these closely neighboring modifications, defining a modification cassette, work together to mark the H4 tail

WO 03/004050

PCT/US02/20906

towards a more condensed chromatin state in many diverse biological situations. Therefore the modified sequence Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys (SEQ ID NO: 4) is associated with transcriptional inactivity and is believed to have utility as a marker for mitosis.

5

**Example 3****Further Analysis of the H3 Arginine Methylation Enzyme**

To further determine the identity of the H4 Arg 3 methyltransferase, the substrate and site specificity of PRMT1, which was previously shown to methylate H4 in a mixture of free calf thymus histones, was examined. Purified recombinant GST-PRMT1 was incubated with core histones isolated from chicken, *Tetrahymena* and human 293T cells in the presence of S-Adenosyl-L-[methyl-<sup>3</sup>H]methionine (3 H-AdoMet), and reaction products were analyzed by SDS-PAGE and fluorography. Results showed that GST-PRMT1 efficiently methylates chicken and human 293T H4 from a mixture of core histones. As expected, GST-PRMT1 was unable to methylate H4 from *Tetrahymena*, suggesting Arg 3 is the major, if not exclusive, site of PRMT1 methylation under these assay conditions. No methylation of histones was observed in the absence of GST-PRMT1. Under these reaction conditions, mammalian H2A was also found to be weakly methylated, a result consistent with earlier findings.

To determine definitively which arginine residue(s) in the H4 amino terminus is methylated by PRMT1, RP-HPLC purified H4 from labeling reactions using purified GST-PRMT1 and chicken core histones was microsequenced and <sup>3</sup>H-incorporation associated with each cycle determined. Microsequence analysis shows that Arg 3 is the exclusive site of methylation in the H4 tail. In agreement, recombinant *Xenopus* H4 (rH4) reacted in the presence of GST-PRMT1 was strongly methylated at Arg 3 by immunoblot analysis using the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody. In contrast, rH4 from reactions lacking GST-PRMT1 was not immunoreactive. Nano-HPLC microelectrospray ionization mass spectrometric analyses of the identical reactions above revealed that the exclusive methylation product at Arg 3 was NG-monomethylarginine, a result consistent with that previously observed by mass spectrometry on H4 isolated from human 293T cells (see Example 2). No dimethylarginine was detected by mass spectrometry on rH4 after methylation *in vitro* by GST-PRMT1 using our assay conditions.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

To determine if PRMT1 is responsible for mediating H4 Arg 3 activity in human 293T cells ectopically expressed PRMT1 isolated from these cells was investigated to determine if it retained the same substrate specificity for H4 as seen with recombinant PRMT1. To that end, HA-tagged PRMT1 (HA-PRMT1 wt), HA-tagged PRMT1 mutant (HA-PRMT1 mut) which lacks the putative AdoMet binding site or parent vector (HA) were ectopically expressed in human 293T cells followed by nuclear isolation and DNase I extraction. Histone methyltransferase (HMT) assays with these extracts using chicken core histones and AdoMet or <sup>3</sup>H-AdoMet revealed that nuclear extracts from HA-PRMT1 expressing cells incorporated more <sup>3</sup>H-AdoMet on H4 than extracts from either HA-PRMT1 mutant or HA expressing cells. Furthermore, immunoblots probed with the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody show that this activity is specific for histone H4 Arg 3. Immunoprecipitations of the same nuclear extracts with a HA specific antibody directly demonstrate that the enhanced H4 Arg 3 methyl activity is a result of HA-PRMT1 expression. These results indicate that cellular-derived PRMT1 can directly and specifically methylate Arg 3 on H4. Furthermore, given that expressed HA-PRMT1 is extracted by DNase I digestion, these data also suggest that PRMT1 is chromatin associated. It is also noted that expression of HA-PRMT1 enhances nucleosomal H4 Arg 3 methylation activity that is detectable in 293T DNase I nuclear extracts.

Although recombinant or cellular PRMT1 can methylate H2A, this methylation is not detected by the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody, suggesting that the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody is selective for H4 Arg 3 methylation. Since H4 Arg 3 methylation activity was detected in 293T control DNase I extracts, the following experiment was conducted to determine if the activity was due to endogenous PRMT1. To directly test this idea, endogenous PRMT1 was immuno-depleted from DNase I nuclear extracts and the extracts were then assayed for any remaining H4 methylation activity. Immuno-depletion of PRMT1 resulted in nearly a complete abolishment of H4 Arg 3 methylation activity in these extracts, indicating that PRMT1 is the major, if not exclusive, H4 Arg 3 HMT from human 293T cells. Furthermore, immunoprecipitated PRMT1 from the above immuno-depleted assay retained essentially all of the H4 HMT activity.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

**Materials and methods***Cell culture and preparation of nuclear extracts and histones*

HeLa and 293T cells were grown at 37°C in D-MEM containing 10%FBS or 5%FBS, respectively. Nuclei were isolated by detergent lysis and low speed centrifugation [Chen et al, J. Biol Chem 275, 40810 (2000)] followed by DNase I extraction or acid extraction of histones as previously described [One 100 mm plate of 293T cells (about  $1.5 \times 10^6$ ) were transfected with 4 µg of empty pCDNA vector or pCDNA-PRMT1 using the Effectene transfection reagent (Qiagen). Forty-eight hours after transfection, nuclei were isolated and core histones were purified by acid extraction and TCA precipitation]. *Tetrahymena thermophila* (strains CU 427 or CU 428) was grown in enriched 1% proteose peptone and macronuclear histones isolated from vegetatively growing cells as described by [K. Luger, T. J. Rechsteiner, T. J. Richmond. Methods Enzymology 304, 3 (1999)]. Chicken histones and nucleosomes were kindly provided by C. Mizzen. Yeast histones were isolated from the wild-type strain MX4-22A.

*Expression plasmids and transfection*

Bacterial and mammalian expression plasmids used for GST or HA expression of PRMT1 have been described elsewhere. The mammalian HA-PRMT1 putative AdoMet-binding mutant (SGT to AAA; amino acids 79-89) was generated by site-directed PCR mutagenesis. This construct was confirmed by sequencing. Transient transfections using 293T cells were performed using 15 µg of plasmid DNA on 100 mm dishes.

*Methyltransferase activity assays*

For histone methyltransferase (HMT) assays involving GST-PRMT1 or 293T DNase I nuclear extracts, 2 µg of core histones or 0.5 µg of recombinant H4 was incubated with 1 µg of GST-purified PRMT1 or 25 µg of 293T nuclear extract in histone methyltransferase (HMT) buffer (final concentration being 50 mM Tris-pH 8.0, 1 mM PMSF and 0.5 mM DTT) along with 0.55 µCi of S-Adenosyl-L-[methyl- $^3$ H] methionine (3 H-AdoMet; 72 Ci/mmol; NEN Life Science Products) for 30 min at 30°C in a total volume of 10 µl. 2 µl of the reaction was spotted on Whatman P-81 for liquid scintillation counting to monitor reactions while the remainder analyzed by

WO 03/004050

PCT/US02/20906

SDS-PAGE followed by Coomassie staining and fluorography. Identical reactions as described above were performed in parallel using non-radiolabeled AdoMet (15  $\mu$ M final) and were analyzed by Western blotting using the  $\alpha$ -H4 R3Me antibody.

5 *Development of an antibody selective for methylation of Arg 3 of histone H4*

A synthetic peptide coding for sequence 1-9 of the human H4 amino-terminus (SGRGKGGKGC\*; SEQ ID NO: 15) in which the first serine was N-acetylated and residue 3 was made with asymmetric NG,NG-dimethylarginine (Bachem) that was conjugated by standard protocols to keyhole limpet hemocyanin via a C-terminal artificial cysteine (C\*) prior to rabbit immunization. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed as previously described using various amounts of unmodified or Arg 3 methylated H4 1-9 peptide as indicated in Figure 1C to characterize antibody specificity from rabbit serum.

15 *Immunoprecipitation Studies*

DNase I nuclear extract from transiently transfected 293T cells were adjusted to 150 mM NaCl prior to immunoprecipitation. For  $\alpha$ -HA immunoprecipitations, 50  $\mu$ l of 293T DNase I nuclear extract from transiently transfected 293T cells was incubated with 2.5  $\mu$ l of  $\alpha$ -HA antibody (HA.11; Covance) and 5  $\mu$ l of protein G sepharose (Amersham) followed by incubation for 2 hr at 4°C. Immunoprecipitates were washed twice in RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X, 0.1% SDS, 1% Deoxycholate) followed by two washes in HMT buffer. For endogenous PRMT1 immunoprecipitation studies, 30  $\mu$ l of 293T DNase I extract was adjusted to 150 mM NaCl and incubated with 1  $\mu$ l  $\alpha$ -PRMT1 and 3  $\mu$ l of protein G sepharose (Amersham) followed by a 2 hr incubation at 4°C. Endogenous immunoprecipitates were washed three times in HMT buffer. Immunoprecipitations were assayed for HMT activity as described above.

*Western blotting*

30 Western blot analyses were performed using reagents and procedures from Amersham Life sciences. Rabbit  $\alpha$ -H4 NG,NG-dimethylarginine 3 and  $\alpha$ -PRMT1 was used at a dilution of 1:5,000. Monoclonal  $\alpha$ -HA antibody was used at a dilution of 1:1000.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

*Protein Microsequencing*

For labeling studies involving GST-PRMT1 for microsequencing, the above HMT reaction volume, using chicken core histones as substrate, was scaled up 10-fold. Histones from this reaction were precipitated with TCA and H4 purified by RP-HPLC using a C8 column. Prior to sequencing, the N-terminus of H4 was deblocked [27]. H4 was sequenced in an Applied Biosystems Model 477A Protein Sequencer with an in-line 120A PTH-Analyzer (Applied Biosystems) using optimized cycles. After conversion, 50% of the sample was transferred to the RP-HPLC for PTH-amino acid identification and the other 50% was collected for determination of radioactivity by scintillation counting.

*Mass Spectrometry analyses*

H4 isolated from 293T cells was purified by RP-HPLC as described above before diluting to 2 pmol/ $\mu$ l with 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.5. Chymotrypsin (Roche) was added to 0.025  $\mu$ g/ $\mu$ l and digestion carried out overnight at room temperature. 2 pmol aliquots of the digest were loaded on a 360 x 75  $\mu$ m analytical column with 7 cm C18 beads (YMC ODS-AQ, Waters) and a ~5  $\mu$ m emitter tip [28] for nano-HPLC microelectrospray ionization mass spectrometric analysis using an LCQ ion trap mass spectrometer (Finnigan). The HPLC gradient was 0-60%B in 70 minutes, 60-100%B in 15 minutes. Solvents A and B were 0.1M acetic acid in water and 0.1M acetic acid in 70% acetonitrile respectively. Mass spectrometric analyses involved targeted MS/MS of the +2 ions of the N-terminal chymotryptic fragment of H4 (SGRGKGGKGL; SEQ ID NO: 15). All possible combinations of N-terminal acetylation, S1 phosphorylation, K5 and K8 acetylation, and R3 methylation (mono- and di-) were analyzed. Arg 3 methylation was observed only in conjunction with N-terminal acetylation targeted MS/MS of the +3 ion was performed for confirmation.

**Example 3****30 H4 Arg3 Methylation Mediated Events**

Recent demonstrations that methylation on Lys 9 of H3 inhibits Ser 10 phosphorylation (S. Rea, et al., *Nature* 406, 593 (2000)) prompted investigation as to whether Arg 3 methylation interferes with acetylation of lysine residues on H4 tails.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

To this end, recombinant H4 that was either mock methylated or PRMT1 methylated was used as substrates for acetylation by p300 in the presence of  $^3\text{H}$ -Acetyl-CoA and the amount of acetylation on the two respective pools of H4 was compared. More particularly, recombinant H4 was purified and used as substrates for PRMT1

5 methylation in the presence of excess amounts of non-labeled SAM. Complete methylation was verified by the lack of further incorporation of  $^3\text{H}$ -SAM. Acetylation was performed in 20  $\mu\text{l}$  volume containing 50 mM Hepes (pH 8.0), 5 mM DTT, 5 mM PMSF, 10 mM sodium butyrate, 10% glycerol, 2  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -acetyl-CoA and 2  $\mu\text{l}$  of p300. The reaction mixture was incubated for 1 hr at 37°C and terminated by the  
10 addition of SDS sample buffer.

Methylation of H4 by PRMT1 stimulated its subsequent acetylation by p300 (Fig. 2A). To confirm this result, equivalent samples were analyzed with a Triton-Acetic Acid-Urea (TAU) gel, which separates different acetylated histone isoforms. The results demonstrate that PRMT1-methylated H4 is a better substrate for  
15 p300 when compared to non-methylated H4 because all H4 molecules were acetylated (no 0 acetylated form) by p300 (Fig. 2B). However, under the same conditions, a fraction of the mock methylated substrates still remain un-acetylated (0 acetylated form). To determine which of the four acetylatable lysine residues are affected by Arg 3 methylation, the acetylation status of samples analyzed above was examined using  
20 acetylation site-specific antibodies. The results indicated that Arg 3 methylation facilitates K8 and K12 acetylation but has little affect on K5 or K16 acetylation.

To determine the effect of lysine acetylation on Arg 3 methylation, both hyperacetylated and hypoacetylated core histones were purified from HeLa cells and used as substrates for PRMT1 in the presence of  $^3\text{H}$ -SAM. After methylation,  
25 samples were resolved in a TAU gel followed by Coomassie staining and autoradiography. Only non- and mono-acetylated H4 isoforms were methylated to a detectable level although nearly equal amounts of the different H4 isoforms were present in the methylation reaction. Since non-acetylated H4 is the best substrate for PRMT1, when compared with different acetylated H4 isoforms, acetylation on lysine  
30 residues likely inhibits H4 methylation by PRMT1.

To determine whether this inhibition occurs *in vivo*, HeLa cells were treated with a histone deacetylase inhibitor, Tricostatin A (TSA), to induce hyperacetylation. Twelve hours after TSA treatment, core histones were isolated, and

WO 03/004050

PCT/US02/20906

the methylation state of H4-Arg 3 was analyzed. Hypoacetylated H4 (untreated) had a higher Arg 3 methylation level when compared with hyperacetylated H4 (TSA treated) which had an almost undetectable Arg 3 methylation level. Therefore, hyperacetylation on lysine residues correlates with hypomethylation of H4 Arg 3.

5 This result is consistent with the idea that acetylation on lysine residues inhibit subsequent Arg 3 methylation and it is also consistent with earlier studies demonstrating that H4 methylation preferentially occurs on non-acetylated histones while H3 methylation occurs preferentially on acetylated histones.

Since H4 contains four lysine residues that can be acetylated, we  
10 investigated whether acetylation on any of the four sites would have a similar affect on Arg 3 methylation. To this end, synthetic H4 tail peptides which were not acetylated, mono-acetylated, tri-acetylated and fully-acetylated, respectively, were used as substrates for PRMT1. Acetylation on any of the four lysines inhibited Arg 3 methylation by PRMT1. However, acetylation on Lys 5 had the most effect. In  
15 addition, acetylation on different lysines seemed to have an additive inhibition effect. Tri-acetylated and fully-acetylated peptides were severely impaired in serving as substrates for PRMT1.

Arg3 methylation enhanced lysine acetylation predicts that PRMT1 is likely to be involved in transcriptional activation. Indeed, PRMT1 has been shown  
20 recently to function as a co-activator of nuclear hormone receptors. However, its co-activator activity has not been linked to its HMT activity. To directly address the function of Arg 3 methylation on transcription, a single amino acid mutation (G80R) was introduced in the conserved SAM binding domain of PRMT1 which has been previously shown to impair its enzymatic activity (A. E. McBride et al, *J Biol Chem*  
25 **275**, 3128 (2000). The ability of the mutant and wild-type PRMT1 to facilitate activation by androgen receptor (AR), which is known to use CBP/p300 as co-activators, was compared in chromatin context using *Xenopus* oocytes as a model system. A MMTV LTR based reporter was injected into the nuclei of *Xenopus* oocytes and successful assembly of the reporter into chromatin was confirmed by  
30 micrococcal nuclease digestion. Ectopic expression of AR in *Xenopus* oocytes led to an agonist-stimulated activation of the reporter. Co-expression of PRMT1 further augmented the activation by AR. Significantly, the PRMT1(G80R) mutant has little co-activator activity when compared with wild-type PRMT1. Western blot analysis

WO 03/004050

PCT/US02/20906

revealed that the differences in transcription were not due to differential expression of PRMT1 and PRMT1(G80R) or their effect on AR expression. Therefore the HMT activity of PRMT1 is critical for its co-activator activity.

5 These studies demonstrate the interplay between Arg3 methylation and lysine acetylation and support the "histone code" hypothesis. The histone code hypothesis is based on the premise that histone proteins, and their associated covalent modifications, contribute to a mechanism that can alter chromatin structure, thereby leading to inherited differences in transcriptional "on-off" states or to the stable propagation of chromosomes by defining a specialized higher-order structure. H4 Arg  
10 3 methylation is believed to play an important role in transcriptional activation. Interestingly, an H3-specific arginine methyltransferase CARM1 was also shown to function as a nuclear hormone receptor co-activator. Whether Arg 3 methylation helps the recruitment of specific HATs, such as p300, remains to be determined.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

## Claims

1. An antigenic peptide comprising an amino acid sequence of 5 to 20 amino acids wherein the amino acid sequence is selected from the group consisting of:
- 5 Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),  
Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),  
10 and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7).
2. The antigenic peptide of claim 1 wherein the antigenic peptide consists of an amino acid sequence selected from the group consisting of
- 15 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 9),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 11),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),  
20 and Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14).
3. The antigenic peptide of claim 1 wherein the antigenic peptide consists of an amino acid sequence selected from the group consisting of
- 25 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12).
4. A composition comprising the peptide of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 30
5. The composition of claim 4 further comprising an adjuvant.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

6. A purified antibody that specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:  
Ser Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 1)  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 2),  
5 Ser(P) Gly Arg Gly Lys, (SEQ ID NO: 3),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys, (SEQ ID NO: 4),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 5),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 6),  
and Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A), (SEQ ID NO: 7).
- 10 7. The antibody of claim 6 wherein the antibody specifically binds to a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 9),  
15 Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
Ser Gly Arg Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 11),  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 13),  
and Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 14).
- 20 8. The antibody of claim 7 wherein the antibody specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of  
Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
25 and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12).
9. The antibody of claim 8 wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 30 10. The antibody of claim 9, wherein the antibody specifically binds to the sequence Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly Leu (SEQ ID NO: 8).

WO 03/004050

PCT/US02/20906

11. A composition comprising the antibody of claim 6 and a diluent or pharmaceutically acceptable carrier.
12. The antibody of claim 6 wherein said antibody is coupled to a bioactive substance selected from the group consisting of a drug, a toxin, an immunomodulator, a peptide effector and an isotope.
13. A diagnostic test kit for detecting euchromatin and heterochromatin, said kit comprising an antibody that specifically binds to a peptide selected from the group consisting of
- 10 Ser Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 8),  
Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10),  
and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12).
- 15 14. The kit of claim 13 comprising a first antibody that specifically binds to Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10), and a second antibody that specifically binds to Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12).
- 20 15. A method of detecting transcriptionally active regions of chromatin, said method comprising the steps of:
- contacting a chromatin containing sample with an antibody that specifically binds to the sequence Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12);  
25 removing unbound and non-specific bound antibody from the sample; and  
detecting transcriptionally active regions of chromatin by identifying those regions of chromatin that have antibody bound to them.
16. The method of claim 15, wherein the antibody is labeled.
- 30 17. The method of claim 16, wherein the antibody is labeled with a fluorescent marker.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

18. The method of claim 15, wherein the detection step comprises contacting said antibody with a labeled secondary antibody wherein said secondary antibody is an anti-immunoglobulin antibody.
- 5 19. A method of detecting mitotically active cells, said method comprising the steps of:  
contacting a population of cells with an antibody that specifically binds to the sequence Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10);  
removing unbound and non-specific bound antibody from the population of  
10 cells; and  
detecting mitotically active cells by identifying those cells with antibody bound to them.
20. The method of claim 19, wherein the antibody is labeled.
- 15 21. The method of claim 20, wherein the antibody is labeled with a fluorescent marker.
22. The method of claim 19, wherein the detection step comprises  
20 contacting said antibody with a labeled secondary antibody wherein said secondary antibody is an anti-immunoglobulin antibody.
23. A method for detecting methylase activity in a sample said method comprising the steps of:  
25 providing a sample that potentially contains methylase activity;  
contacting the sample with a polypeptide comprising the sequence Arg Ser Gly  
Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 2) for a predetermined length of time;  
contacting the sample with the antibody of claim 6 after said predetermined  
length of time;  
30 quantifying said antibody bound to said sample as an indication of the level activity of said methylase.
24. The method of claim 18 wherein said methylase is PRMT1.

WO 03/004050

PCT/US02/20906

25. A method of detecting chromatin alterations that are associated with a disease state, said method comprising the steps of
- isolating chromatin from both normal and diseased tissue to create a first and  
5 second pool of chromatin;
- contacting the first and second pools of chromatin with an antibody that specifically binds to a polypeptide selected from the group consisting of Ser(P) Gly Arg(M) Gly Lys Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 10) and Ser Gly Arg(M) Gly Lys(A) Gly Gly Lys Gly (SEQ ID NO: 12); and  
10 comparing the staining pattern of the antibody bound chromatin isolated from normal tissue to the staining pattern of the antibody bound chromatin isolated from the diseased tissue.
26. The method of claim 25 further comprising the step of fragmenting the  
15 isolated chromatin before the immunoprecipitation step.
27. The method of claim 25 wherein the step of comparing the DNA comprises
- immobilizing the DNA isolated from the first pool of chromatin onto a first  
20 solid surface;
- immobilizing the DNA recovered from the second pool of chromatin onto a second solid surface;
- probing the first and second solid surfaces with identical labeled nucleic acid sequences; and  
25 identifying those sequences that bind only to the immobilized DNA isolated from the first pool of chromatin.

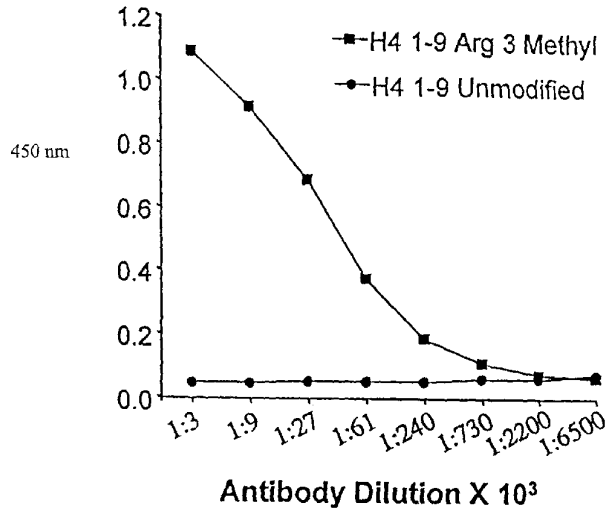


Fig. 1

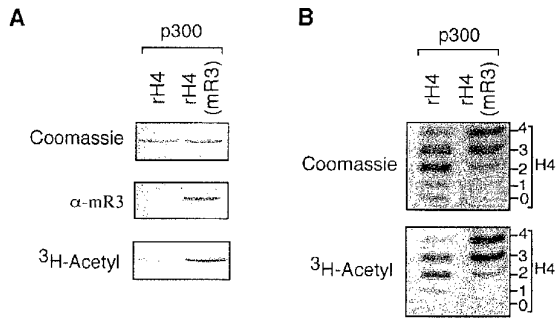


Fig. 2

WO 03/004050

PCT/US02/20906

## SEQUENCE LISTING

<110> The University of Virginia Patent Foundation  
Allis, C. David  
5 Briggs, Scott  
Strahl, Brian

<120> Methylation of Histone H4 at Arginine 3

10 <130> 00697-02

<150> US 60/302,811  
<151> 2001-07-03

15 <160> 15

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1  
<211> 5  
20 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1  
25 Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

<210> 2  
<211> 5  
30 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
35 <222> (3)..(3)  
<223> METHYLATION

<400> 2  
40 Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

<210> 3  
<211> 5  
<212> PRT  
45 <213> Homo sapiens

<220>

WO 03/004050

PCT/US02/20906

<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> PHOSPHORYLATION

5 <400> 3  
Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

<210> 4  
10 <211> 5  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
15 <221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> PHOSPHORYLATION

<220>  
20 <221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> METHYLATION

<400> 4  
25 Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

<210> 5  
<211> 5  
30 <212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
35 <221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> ACETYLATION

<400> 5  
40 Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

WO 03/004050

PCT/US02/20906

<210> 6  
<211> 5  
<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)

10 <223> METHYLATION

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)

15 <223> ACETYLATION

<400> 6  
Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

20

<210> 7  
<211> 5  
<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)

<223> PHOSPHORYLATION

30

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)

<223> ACETYLATION

35

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)

<223> METHYLATION

40

<400> 7  
Ser Gly Arg Gly Lys  
1 5

45

WO 03/004050

PCT/US02/20906

<210> 8  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5  
  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
10 <223> METHYLATION  
  
<400> 8  
Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
1 5  
15  
<210> 9  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
20  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> PHOSPHORYLATION  
25  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> METHYLATION  
30  
<400> 9  
Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
1 5  
35  
<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
40  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> PHOSPHORYLATION  
45

WO 03/004050

PCT/US02/20906

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> METHYLATION

5  
<400> 10  
Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
1 5

10 <210> 11  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> ACETYLATION

20 <400> 11  
Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
1 5

<210> 12  
25 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<220>  
30 <221> MOD\_RES  
<222> (5)..(5)  
<223> ACETYLATION

<220>  
35 <221> MOD\_RES  
<222> (3)..(3)  
<223> METHYLATION

<400> 12  
40 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
1 5

WO 03/004050

PCT/US02/20906

<210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> PHOSPHORYLATION  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (5)..(5)  
 15 <223> ACETYLATION  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 20 <223> METHYLATION  
 <400> 13  
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
 1 5  
 25  
 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30  
 <400> 14  
 Ser Gly Arg Gly Lys Gly Gly Lys Gly  
 1 5  
 35  
 <210> 15  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 40  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> ACETYLATION  
 45



## 【 國際調查報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/20906												
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>														
IPC(7) : A61K 39/00, G01N 33/53, C07K 5/00, 16/00 US CL : 424/185.1; 435/7.1; 530/328, 330, 387.1. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>														
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/185.1; 435/7.1; 530/328, 330, 387.1.														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>														
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
Y	COLLART et al. A Human Histone H2B.1 Variant Gene, Located on Chromosome 1, Utilizes Alternative 3' End Processing. J. Cell. Biochem. December 1992, Vol. 50, pages 374-385, see entire document.	6												
X	LIU et al. Mouse Histone H2A and H2B Genes: Four Functional Genes and a Pseudogene Undergoing Gene Conversion with a Closely Linked Functional Gene. Nucleic Acid Res. August 1987, Vol. 15, No. 7, pages 3023-39, see entire document.	1, 4-5 and 23												
X	WOODLAND et al. Are There Major Developmentally Regulated H4 Gene Classes in Xenopus? Nucleic Acids Res. June 1984, Vol. 12, No. 12, pages 4939-4958, see entire document.	1, 4-5												
Y	EHINGER et al. Sequence, Organization and Expression of the Core Histone Genes of Aspergillus nidulans. Mol. Gen. Genet. July 1990, Vol. 222, pages 416-424, see entire document.	7-8, 10, 13-15 and 25												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.														
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</td> </tr> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*A* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	*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)	*A* document member of the same patent family	*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	
* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention													
*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone													
*E* earlier application or patent published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art													
*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)	*A* document member of the same patent family													
*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 12 September 2002 (12.09.2002)	Date of mailing of the international search report 02 OCT 2002													
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Phuong N Huynh Telephone No. (703) 308-0196													

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US02/20906

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WOUTERS-TYROU et al. Acetylation of Histone H4 in Chicken Erythrocyte and Cuttle-Fish Testis Chromatin. FEBS Lett. June 1981, Vol. 128, No. 2, pages 195-200, see entire document.	13-14, 19 and 25
Y	HARLOW et al. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, pages 141-149 and 319-358, see page 148, 348 and 354-355, in particular.	6-27

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/US02/20906

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:  
MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, SCISEARCH, CAPLUS ON STN, PIR\_71, SWISSPRO\_40, SPTREMBL\_19,  
A\_GENESEQ\_032802, ISSUED PATENTS  
labeled antibody, conjugated antibody, histone H3 and H2A peptides, detection assay, methylase PRMT1 detection assay

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/527	4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/527	C 1 2 Q 1/68	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/62	A
G 0 1 N 33/62	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 シー・デイビッド・アリス

アメリカ合衆国 2 2 9 0 3 バージニア州 シャルロッツビル、オールド・ファーム・ロード 2 1 番

(72) 発明者 スコット・ディ・ブリッグズ

アメリカ合衆国 2 2 9 3 6 バージニア州 アーリースビル、ノーウッド・レイン 8 0 0 番

(72) 発明者 ブライアン・ディ・ストラール

アメリカ合衆国 2 7 5 1 6 ノースカロライナ州 チャペル・ヒル、グレンモア・ロード 2 1 0 番

F ターム(参考) 2G045 BB14 BB50 BB51 CB01 DA36 FB01 FB03 FB05 FB07 FB12

GC15

2G054 AA08 AB04 BB13 CA23 CE02 EA03 GA04 GB02

4B024 AA11 BA10 BA43 CA01 HA12 HA15

4B063 QA18 QQ79 QQ96 QR06 QR32 QR48 QR55 QS33 QS34 QX01

4C084 AA01 AA07 BA01 BA02 BA08 BA16 BA18 BA23 CA18 CA59

MA05 NA14 ZB072

4C085 AA03 BB11 CC02 CC05 CC21 CC23 EE06 FF02 FF03

4H045 AA10 AA11 BA13 BA15 CA40 EA50 FA71 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005508302A5</a>	公开(公告)日	2005-10-06
申请号	JP2003510060	申请日	2002-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚大学专利基金会		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚专利大学基金会		
[标]发明人	シーデイビッドアリス スコットディブリッグズ ブライアンディストラール		
发明人	シー・デイビッド・アリス スコット・ディ・ブリッグズ ブライアン・ディ・ストラール		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61P37/02 C07K7/06 C07K14/47 C07K16/18 C12N15/09 C12Q1/48 C12Q1/527 C12Q1/68 G01N21/78 G01N33/569 G01N33/573 G01N33/58 G01N33/62 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6875 A61K39/00 C07K14/47 C07K16/18 C12Q1/48 G01N33/56966 G01N33/573 G01N2333/91011 G01N2500/02 G01N2500/04		
FI分类号	C07K7/06.ZNA A61K39/395.D A61K39/395.N A61P37/02 C07K16/18 C12Q1/527 C12Q1/68.A G01N21/78.C G01N33/53.D G01N33/58.Z G01N33/62.A A61K37/02 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/BB14 2G045/BB50 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15 2G054/AA08 2G054/AB04 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GB02 4B024/AA11 4B024/BA10 4B024/BA43 4B024/CA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B063/QA18 4B063/QQ79 4B063/QQ96 4B063/QR06 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4C084/AA01 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA16 4C084/BA18 4C084/BA23 4C084/CA18 4C084/CA59 4C084/MA05 4C084/NA14 4C084/ZB072 4C085/AA03 4C085/BB11 4C085/CC02 4C085/CC05 4C085/CC21 4C085/CC23 4C085/EE06 4C085/FF02 4C085/FF03 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA13 4H045/BA15 4H045/CA40 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA74		
代理人(译)	小岛 一晃		
优先权	60/302811 2001-07-03 US		
其他公开文献	JP2005508302A		

#### 摘要(译)

本发明涉及制备与组蛋白H3和H2A肽的氨基末端的特异性修饰结合的抗体。更优选地，本发明涉及创建识别组的组蛋白修饰盒SGRGK的各种翻译后修饰的抗体的（SEQ ID NO：1），其中所述修饰是磷酸化丝氨酸，甲基精氨酸和乙酰卡利它是从由薄的组中选择。包含这些抗体的组合物用作诊断和筛选工具。

