

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-500478
(P2015-500478A)

(43) 公表日 平成27年1月5日(2015.1.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	2 GO 4 5
GO 1 N 33/48 (2006.01)	GO 1 N 33/48 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁)

(21) 出願番号 特願2014-545358 (P2014-545358)
 (86) (22) 出願日 平成24年12月7日 (2012.12.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年8月4日 (2014.8.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2012/053057
 (87) 国際公開番号 W02013/084002
 (87) 国際公開日 平成25年6月13日 (2013.6.13)
 (31) 優先権主張番号 1121040.8
 (32) 優先日 平成23年12月7日 (2011.12.7)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 61/568,090
 (32) 優先日 平成23年12月7日 (2011.12.7)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 1121230.5
 (32) 優先日 平成23年12月12日 (2011.12.12)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 514052210
 シンガポール ポリション ピーティーイー
 リミテッド
 シンガポール国 シンガポール 6701
 65 ユニット 01-70 ガングサ
 ロード 165
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ジャコブ ピンセント ミカレフ
 英国 エヌダブリュー1 4エスエヌ ロ
 ンドン パーク ロード 49 エイアン
 ドビー ハノーバー ゲート マンション
 ズ シー/オー シンガポール ポリショ
 ン ピーティーイー リミテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ヌクレオソームアダクト検出法

(57) 【要約】

本発明は、ヌクレオソーム タンパク質アダクトの存在を検出又は測定する方法、並びに疾患を検出及び診断するためのそれら測定の使用に関する。本発明はまた、疾患の検出及び診断のためのヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法、並びに該方法により同定されたバイオマーカーに関する。

【選択図】図1

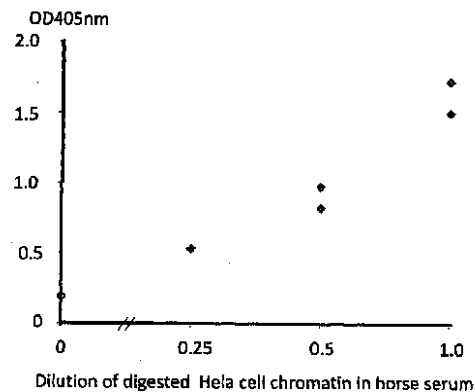


FIGURE 1

【特許請求の範囲】

【請求項1】

癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患の診断用の血液中バイオマーカーとしての、ヌクレオソームタンパク質アダクトの使用。

【請求項2】

前記バイオマーカーが、癌診断に使用される、請求項1記載の使用。

【請求項3】

前記ヌクレオソームタンパク質アダクトは、クロマチン修飾酵素、核受容体又はホルモンを含む、請求項1又は2記載の使用。

【請求項4】

前記ヌクレオソームタンパク質アダクトは、高移動度タンパク質を含む、請求項2記載の使用。

【請求項5】

前記クロマチン修飾酵素は、ヒストンアセチル化酵素、脱アセチル化酵素、メチル化酵素、脱メチル化酵素、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、ユビキチン化酵素、脱ユビキチン化酵素、SUMO化酵素、脱SUMO化酵素、又はDNAメチルトランスフェラーゼ酵素である、請求項3記載の使用。

【請求項6】

前記核受容体は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体、グルココルチコイド受容体、又はレチノイン酸受容体である、請求項3記載の使用。

【請求項7】

前記ホルモンは、甲状腺ホルモン、グルココルチコイドホルモン、又は、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステゲン、コルチコステロイド若しくはレチノイン酸を含むステロイドホルモンである、請求項3記載の使用。

【請求項8】

試料中の、ヌクレオソームタンパク質アダクトの存在を検出する方法であって：
 (i) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
 (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームへ付加したタンパク質に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
 (iii) 該第二の結合剤の、該試料中の付加されたタンパク質への結合を検出又は定量する工程；並びに
 (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；
 を含む、前記方法。

【請求項9】

試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在を検出する方法であって：
 (i) 試料を、ヌクレオソームへ付加されたタンパク質に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
 (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
 (iii) 該第二の結合剤の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程；並びに
 (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；
 を含む、前記方法。

【請求項10】

前記ヌクレオソームアダクトには、炎症誘発性タンパク質、高移動度タンパク質、ポリコムタンパク質、クロマチン修飾酵素、核受容体、又はホルモンが含まれる、請求項8又は9記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 1 1】
前記高移動度タンパク質は、HMGB1である請求項10記載の方法。
- 【請求項 1 2】
前記クロマチン修飾酵素は、EZH2である請求項10記載の方法。
- 【請求項 1 3】
前記ホルモン受容体は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体、又はレチノイン酸受容体である、請求項10記載の方法。
- 【請求項 1 4】
前記ホルモンは、甲状腺ホルモン、グルココルチコイドホルモン、又は、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステゲン若しくはレチノイン酸を含むステロイドホルモンである、請求項10記載の方法。 10
- 【請求項 1 5】
前記ヌクレオソーム又はヌクレオソーム成分バインダーが、特定のエピジェネティックシグナル構造へ結合するように標的化され、該エピジェネティックシグナル構造を含むヌクレオソームアダクトの特定のサブセットだけが検出される、請求項8～14のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 1 6】
前記結合剤が、抗体、抗体断片又はアプタマーである、請求項8～15のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 1 7】
前記試料が、生物学的流体である、請求項8～16のいずれか一項記載の方法。 20
- 【請求項 1 8】
前記試料が、血液、又は血清若しくは血漿である、請求項8～17のいずれか一項記載の方法。
- 【請求項 1 9】
細胞中の、請求項8～18のいずれか一項記載のヌクレオソーム タンパク質アダクトの存在を検出する方法であって：
(i) 細胞からクロマチンを単離する工程；
(ii) 該クロマチンを消化、超音波処理、又は別の手段で破壊し、モノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソームを形成する工程；並びに 30
(iii) 請求項8～18のいずれか一項記載の方法により、該ヌクレオソームアダクトの存在を検出又は測定する工程：
を含む、前記方法。
- 【請求項 2 0】
動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断する方法であって：
(i) 請求項8又は9記載のいずれかの方法により、対象の体液中のヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに
(ii) 該対象の疾患状態を同定するために検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程； 40
を含む、前記方法。
- 【請求項 2 1】
医学治療に関する適性について動物又はヒト対象を評価する方法であって：
(i) 請求項8又は9記載のいずれかの方法により、対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに
(ii) 該対象へ好適な治療を選択するためのパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程；
を含む、前記方法。
- 【請求項 2 2】
動物又はヒト対象の治療をモニタリングする方法であって：
(i) 請求項8又は9記載のいずれかの方法により、対象の体液中の、ヌクレオソームアダク 50

トを検出又は測定する工程；

(ii)1回以上にわたって対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトの検出又は測定を反復する工程；並びに

(iii)該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルの何らかの変化を使用する工程；

を含む、前記方法。

【請求項 2 3】

前記ヌクレオソームアダクトが、測定のパネルの一つとして検出又は測定される、請求項20～22のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 4】

真性癌若しくは癌が疑われる状態、良性腫瘍、炎症性疾患、自己免疫疾患、子宮内膜症、伝染病、敗血症、卒中又は心筋梗塞に罹患している対象に使用するための、請求項20～23のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 5】

ホルモン ホルモン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクトの検出に使用するための、請求項8～24のいずれか一項記載の方法。

【請求項 2 6】

前記ホルモン ホルモン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクトは、チロキシン 甲状腺ホルモン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクト、トリヨードサイロニン 甲状腺ホルモン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクト、レチノイン酸 レチノイン酸受容体 ヌクレオソーム複合体アダクト、アンドロゲン アンドロゲン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクト、又はエストロゲン エストロゲン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクトを含む、請求項25記載の方法。

【請求項 2 7】

前記ホルモンへ結合するように標的化された抗体又は他のバインダーを含む、請求項25又は26記載の方法。

【請求項 2 8】

抗体捕獲されたホルモン ホルモン受容体 ヌクレオソーム複合体アダクトからホルモンを抽出する工程を含み、その次に定量する行程が続く、請求項25又は26記載の方法。

【請求項 2 9】

動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断するためのヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって；

(i) 請求項8又は9記載のいずれかの方法により、対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；

(ii) 健常対象又は対照対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに

(iii)ヌクレオソームアダクトが、疾患状態のバイオマーカーとして有用であるかどうかを同定するために、疾患対象及び対照対象において検出されたレベル間の差異を使用する工程；

を含む、前記方法。

【請求項 3 0】

請求項29記載の方法により同定されるバイオマーカー。

【請求項 3 1】

ヌクレオソームアダクトの検出のためのキットであって、該アダクト内のタンパク質若しくはそれらの部分成分、又はアダクト内のタンパク質若しくはそれらの部分成分の構造/形状の模倣体に、特異的なリガンド又はバインダーを備え、請求項3～28記載の方法のいずれか一つに従う該キットの使用説明書も一緒に含む、前記キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

10

20

30

40

50

(発明の分野)

本発明は、ヌクレオソームタンパク質アダクトの存在を検出及び測定する方法、並びに疾患の検出及び診断のためのそのような測定の使用に関する。本発明はまた、疾患の検出及び診断のためにヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法、並びに該方法により同定されたバイオマーカーに関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ヒトの体は、数百種の細胞型を含んでいる。これらの細胞型は全て、同じゲノムを含んでいるが、広範に異なる表現型及び体内での異なる機能を有する。この表現型の多様性は、異なる細胞型におけるゲノムの分化的(differential)発現によるものである。分化的遺伝子発現の制御は、完全には理解されていないが、その基本的機構には、ユークロマチン又はヘテロクロマチンとしてのクロマチンパッキングの制御、ヌクレオソームポジショニング及びヌクレアーゼ到達可能部位の制御、DNAのメチル化、並びにその周りにDNAが巻き付いたヌクレオソームの構造の変化が含まれる、遺伝子と関連する多数の相互接続されたエピジェネティックシグナルによる遺伝子調節を含んでいる。

10

【0003】

ヌクレオソームは、クロマチン構造の基本単位であり、8種の高度に保存されたコアヒストンのタンパク質複合体(ヒストンH2A、H2B、H3及びH4の各々の対を含む)からなる。この複合体の周りには、DNAの約146塩基対が巻き付いている。別のヒストンであるH1又はH5は、リンカーとして作用し、且つクロマチン凝縮に関与している。このDNAは、「ビーズオンストリング」に似ているとしばしば言われる構造で連続したヌクレオソームの周りに巻き付いており、且つこれは、オープンなクロマチン又はユークロマチンの基本構造を形成している。凝縮された又はヘテロクロマチンにおいて、このストリングは、閉じた複雑な構造へ、コイル形成及びスーパーコイル形成される(Herranz及びEstellerの文献、2007)。

20

【0004】

成人における正常細胞の代謝回転には、毎日数千億個の細胞の細胞分裂による創出、及び主にアポトーシスによる同等数の細胞死が関与している。アポトーシスの過程において、クロマチンは、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームへ破壊され、これらは細胞から放出される。通常の状態ではそれらは除去され、対象健常者において認められる(体)循環中のヌクレオソームのレベルは低い。多くの癌、自己免疫疾患、炎症状態、卒中及び心筋梗塞を含む様々な状態の対象(者)において、上昇したレベルが認められる(Holdenrieder及びStieberの文献、2009)。

30

【0005】

モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)により検出することができ、且ついくつかの方法が報告されている(Salgameらの文献、1997; Holdenriederらの文献、2001; van Nieuwenhuijzeらの文献、2003)。これらのアッセイは典型的には、捕獲抗体として抗ヒストン抗体(例えば、抗H2B、抗H3又は抗H1、H2A、H2B、H3及びH4)を、並びに検出抗体として抗DNA又は抗H2A H2B DNA複合抗体を利用する。しかし本発明者らは、これらのアッセイの結果は、互いに一致しないことを発見した。更に、血清又は血漿中のほとんどの循環DNAは、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームとして存在することが報告されているが(Holdenriederらの文献、2001)、血清又は血漿中のヌクレオソーム及びDNAの測定されたレベルは、良くは一致しない。体循環内の細胞フリーヌクレオソームレベルのELISA結果と、リアルタイムPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)により測定された体循環DNAレベルの間の相関係数は、血清中 $r=0.531$ 、及び血漿中 $r=0.350$ であることが報告されている(Holdenriederらの文献、2005)。

40

【0006】

ヌクレオソームELISA法は、細胞培養物において、主にアポトーシスを検出する方法として使用され(Salgameらの文献、1997; Holdenriederらの文献、2001; van Nieuwenhuijz

50

eらの文献、2003)、且つ血清及び血漿中の循環細胞フリーヌクレオソームの測定のためにも使用される(Holdenriederらの文献、2001)。死滅しつつある細胞により循環中に放出された細胞フリー血清及び血漿ヌクレオソームレベルは、可能性のあるバイオマーカーとしてのそれらの使用を評価するために、数多くの異なる癌の研究においてELISA法により測定されている(Holdenriederらの文献、2001)。平均循環ヌクレオソームレベルは、全てではないがほとんどの試験された癌において、高いことが報告されている。最高の循環ヌクレオソームレベルは、肺癌対象において観察された。最低レベルは、前立腺癌において観察され、これは対象健常者の正常範囲内であった。しかし悪性腫瘍に罹患している対象者は、かなり変動する血清ヌクレオソーム濃度を有し、且つ進行した腫瘍疾患を伴う対象の一部は、対象健常者について測定された範囲内の低い循環ヌクレオソームレベルを有することが報告されている(Holdenriederらの文献、2001)。このこと及び様々な非癌がヌクレオソームレベルの上昇を引き起こすという理由で、循環ヌクレオソームレベルは、臨床

10

20

30

40

50

【0007】

ヌクレオソームの構造は、ヒストンタンパク質の転写後修飾(PTM)により、及び変種ヒストンタンパク質の封入により、変動することができる。ヒストンタンパク質のPTMは典型的には、8個のコアヒストンテールで起こり、一般的な修飾には、リジン残基のアセチル化、メチル化又はユビキチン化、並びにアルギニン残基のメチル化及びセリン残基のリン酸化を含む。ヒストン修飾は、遺伝子発現のエピジェネティック調節に参与していることが知られている(Herranz及びEstellerの文献、2007)。ヌクレオソームの構造はまた、異なる遺伝子若しくはスプライシング産物であり、且つ異なるアミノ酸配列を有する、代替ヒストンアイソフォーム又は変種の封入により、変動することができる。ヒストン変種は、個別の型に更に細分されている数多くのファミリーへ分類することができる。多数のヒストン変種のヌクレオチド配列が公知であり、且つ例えば、米国立ヒトゲノム研究所(NHGRI)ヒストンデータベース(Marino Ramirez, L., Levine, K.M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R.T., Baxevanis, A.D. 及び Landsman, D. の文献、「ヒストンデータベース: ヒストン及びヒストン折り畳み含有タンパク質に関する統合リソース(The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold containing proteins)」、Database Vol.2011.(投稿)、及び<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>)、GenBank(NIH遺伝子配列)データベース、EMBLヌクレオチド配列データベース、並びに日本DNAデータバンク(DDBJ)などにおいて公的に入手可能である。

【0008】

健常細胞や疾患細胞に存在するヒストン変種及びヒストン修飾パターンは、数多くの研究(多くは免疫組織化学)で違いを示されている(Herranz及びEstellerの文献、2007)。臨床使用のための免疫組織化学法の一つの欠点は、組織試料収集には手術又は生検を伴い、侵襲性であることである。

【0009】

ヌクレオソーム構造及び位置により媒介されたエピジェネティックシグナル伝達に加え、細胞における遺伝子発現の制御も又、DNAのメチル化状態により媒介される(Herranz及びEsteller、2007)。DNAは、シトシンヌクレオチドの5位でメチル化され、5-メチルシトシンを形成し得ることは、先般から当分野において公知である。

【0010】

癌におけるDNAメチル化の関与は、1983年と早くに報告された(Feinberg及びVogelsteinの文献、1983)。癌細胞において認められるDNAメチル化パターンは、健常細胞のそれとは異なる。特に動原体周囲領域の周りの反復エレメントは、癌において、健常細胞と比べ低メチル化されていることが報告されているが、特異的遺伝子のプロモーターは、癌において過剰メチル化されていることも報告されている。これら二つの作用の釣り合いが、癌細胞における全般的DNA低メチル化を生じることが報告されている(Rodriguez Paredes及びEstellerの文献、2011)。

【 0 0 1 1 】

特定の特異的遺伝子の過剰メチル化は、癌の診断用バイオマーカーとして使用することができる。例えば、血漿から抽出されたDNAのPCR増幅によるSeptin 9遺伝子の過剰メチル化の検出のために報告された方法は、結腸癌の72%を検出し、偽陽性率は10%であることが報告された(Grutzmannらの文献、2008)。特異的遺伝子又は遺伝子座のDNAメチル化状態は、通常、5メチルシトシンではなくシトシンのウラシルへの選択的パイサルファイト脱アミノ化により検出され、DNA一次配列変化が導かれ、これはシーケンシング又は他の手段により検出され得る(Allenらの文献、2004)。

【 0 0 1 2 】

全般的DNA低メチル化は、癌細胞の顕著な特徴である(Estellerの文献、2007、及びHervouetらの文献、2010)。全般的DNAメチル化は、免疫組織化学(IHC)技術を使用し、細胞において研究することができる。或いは、DNAは、分析のために細胞から抽出される。

10

【 0 0 1 3 】

長年の間に、核酸及びヒストンタンパク質に加え、クロマチンもその構成要素DNA及び/又はヒストンに結合している多数の非ヒストンタンパク質を含むことが知られている(Yoshida及びShimuraの文献、1972)。これらクロマチン関連のタンパク質は、様々な種類の型からなり、転写因子、転写促進因子、転写抑制因子、ヒストン修飾酵素、DNA損傷修復タンパク質その他多くの種々の機能を有する。クロマチン結合タンパク質の研究はクロマチン免疫沈降(ChIP)方法によって広く行われてきた。これらの方法は当分野で公知であるが、複雑で、手間と費用がかかる。

20

【 0 0 1 4 】

典型的なChIP法では、細胞のクロマチンは架橋されて全てのタンパク質及び核酸成分が互いに共有的に結合される。次にクロマチンは、断片化され、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームが提供される。目的のタンパク質を含むクロマチン断片を免疫沈降させるために、目的のタンパク質に対する抗体が断片化クロマチンへ加えられる。抗体は、目的タンパク質を含むクロマチン複合体の分離を容易にするために、通常は固相(例えばプラスチックビーズ)へ結合される。次に架橋が外され、タンパク質がプロテイナーゼで消化されて取り出される。クロマチン複合体に会合しているDNAを単離し、分析し、PCRとその次のゲル電気泳動法、DNA塩基配列決定法(ChIP Seq)又はDNAマイクロアレイ(ChIPオンチップ)等の種々の技術のいずれかを使用して、特定のタンパク質結合に關与するDNA配列、遺伝子又は遺伝子座を決定する。

30

【 0 0 1 5 】

これらChIP法により、クロマチン結合ヒストンタンパク質に關連するDNA配列が解明される。非ヒストンタンパク質とヒストン及びヌクレオソームとの結合を研究するために、例えばヒストン結合アッセイ(Histone Associated Assays) (Ricke及びBielynskyの文献、2005)等の、ChIP法の改変法が開発されている。クロマチンへ結合する多くのタンパク質は癌及び他の疾患の機構に關係するが、ヌクレオソームアダクト型が循環中に多量にあることは、これまで研究されていなかった。例として、高移動度群ボックスタンパク質1(HMGB1)、ポリコームタンパク質Zeste Homolog 2のエンハンサー(EZH2)及びタンパク質の核受容体群等が挙げられる。

40

【 0 0 1 6 】

タンパク質の高移動度群は、DNA又はヒストンの約3重量%で存在するクロマチンの1成分である。それらは、基本的DNA配列への特異性は知られておらず、ヌクレオソームへ結合する構造タンパク質である(Gerlitzらの文献;2009)。HMGB1は、構築的(architectural)染色体タンパク質であり、炎症誘発性メディエーターである。それは細胞死、アポトーシスに關与し、様々な炎症性状態、自己免疫疾患状態、敗血症、髄膜炎及び神経変性症等の多数の疾患にも關与する。HMGB1の過剰発現は、癌の非常に顕著な特徴に關係する(Tangらの文献;2010)。HMGB1はアポトーシス細胞のクロマチンへ緊密に結合している。ヌクレオソーム HMGB1複合体の研究は、これらアダクトは、自己免疫疾患、全身性エリテマトーデス(SLE)に罹患している対象(者)の(体)循環中に見られること、及び、アダクトはSLEの

50

重要な特色である抗核抗体の発生に關与していることを示す。HMGB1に結合していないヌクレオソームは、免疫応答を引き起こさない。これらアダクト内でのHMGB1のヌクレオソームへの結合は、ヌクレオソームをDNA又はヒストンに対する抗体で免疫沈降し、次に免疫沈降したヌクレオソーム内にHMGB1が存在することを確認するために抗HMGB1抗体を使用してウェスタンブロットを行うことにより示される(Urbonaviciuteらの文献;2008)。

【0017】

HMGBタンパク質と、クロマチン機能並びに、HMGBタンパク質及び追加的タンパク質を含むクロマチン複合体へ影響すると知られている多くの他のタンパク質との相互作用が起こることが示された(Gerlitzらの文献;2009)。従って、単純なヌクレオソーム タンパク質 アダクトに加え、その中で2又は複数のタンパク質がヌクレオソームと会合しているヌクレオソーム タンパク質 複合体アダクトがクロマチン中で発生する。

10

【0018】

EZH2は、遺伝子の転写抑制的状態の維持に關与する多重結合のタンパク質複合体を形成するポリコム群(PcG)ファミリーのメンバーである。EZH2は、ヌクレオソームのヒストン3のリジン27アミノ酸残基をメチル化するヒストン修飾酵素(ヒストン リジンN メチルトランスフェラーゼ)である。このヒストン修飾は、クロマチン凝縮及び遺伝子抑制と關連する(Caoらの文献;2002)。

【0019】

核受容体は、例えば、エストロゲン受容体(ER)がエストロゲン依存遺伝子の発現を調節するように、ホルモン又はリガンドの制御下で遺伝子発現を調整する分子である。これらタンパク質の多くは疾患プロセスに關連し、例えばERは乳癌の進行に關連しており、多くの乳癌治療はERを標的とし、及び/又はERがそのリガンドエストラジオールと相互作用することを防止することを標的とする。

20

【0020】

細胞内で発生するヌクレオソーム タンパク質アダクトに加え、他のヌクレオソーム タンパク質アダクトも存在し、それは細胞死の次に細胞からヌクレオソームを放出した後形成される。このようなヌクレオソームアダクトは、SLEの重要な特色であるヌクレオソーム 免疫グロブリンアダクトを含む。

【0021】

本発明者らはここで、生物学的試料中のタンパク質 ヌクレオソームアダクトを直接的に評価するための単純な免疫アッセイ法を報告する。本発明者らは、EZH2、HMGB1及びいくつかの核受容体へ結合しているヌクレオソームの検出のための単純な方法を開発し、ヌクレオソームアダクトは血清試料中で検出可能であり、それらは疾患のバイオマーカーとしての用途を有することを示す。

30

【発明の概要】

【0022】

本発明の第一の態様に従い、癌、自己免疫疾患、又は炎症性疾患の診断用の血液中のバイオマーカーとしての、ヌクレオソーム タンパク質アダクトの使用が、提供される。

【0023】

本発明の第二の態様に従い、試料中の、ヌクレオソーム タンパク質アダクトの存在を検出する方法であって：

40

- (i) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームへ付加したタンパク質に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
- (iii) 該第二の結合剤の、該試料中の付加されたタンパク質への結合を検出又は定量する工程；並びに
- (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

【0024】

50

本発明の第三の態様に従い、試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在を検出する方法であって：

- (i) 試料を、ヌクレオソームへ付加されたタンパク質に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
 - (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
 - (iii) 該第二の結合剤の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程；並びに
 - (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

10

【0025】

本発明の更なる態様に従い、細胞中の、ヌクレオソームアダクトを検出する方法であって：

- (i) 細胞からクロマチンを単離する工程；
 - (ii) 該クロマチンを消化、超音波処理、又は別の手段で破壊し、モノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソームを形成する工程；並びに
 - (iii) 前記第2又は第3の態様に記載された本発明のELISA法に従い、該ヌクレオソームアダクトの存在を検出又は測定する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

20

【0026】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断する方法であって：

- (i) 対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに
 - (ii) 該対象の疾患状態を同定するために検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

【0027】

本発明の更なる態様に従い、医学治療に関する適性について動物又はヒト対象を評価する方法であって：

- (i) 対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに
 - (ii) 該対象へ好適な治療を選択するためのパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

30

【0028】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象の治療をモニタリングする方法であって：

- (i) 対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；
 - (ii) 1回以上にわたって対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトの検出又は測定を反復する工程；並びに
 - (iii) 該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルの何らかの変化を使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

40

【0029】

本発明の更なる態様に従い、動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断するためのヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

- (i) 対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；
- (ii) 健常対象又は対照対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに
- (iii) ヌクレオソームアダクトが、疾患状態のバイオマーカーとして有用であるかどうか

50

を同定するために、疾患対象及び対照対象において検出されたレベル間の差異を使用する工程：

を含む、前記方法が、提供される。

【0030】

本発明の更なる態様に従い、本発明の方法により同定されたバイオマーカーが、提供される。

本発明の更なる態様に従い、ヌクレオソームアダクト若しくはそれらの部分成分、又はDNA塩基、ヌクレオチド、ヌクレオシド若しくはそれらの部分成分の構造/形状の模倣体に特異的なリガンド又はバインダーを備える、ヌクレオソームアダクトの検出のためのキットであり、該キットの使用説明書も一緒に備える、前記キットが、提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】図1は、ウマ血清へ希釈された、Hela細胞から抽出された消化クロマチン中のヌクレオソームEZH2アダクトレベルを検出するための、ELISA用量反応曲線である。

【図2】図2は、対象健常者5名及び対象癌患者11名から採取した血清試料について検出されたヌクレオソームEZH2アダクトのELISA結果である。

【図3】図3は、ウマ血清へ希釈された、Hela細胞から抽出された消化クロマチン中のヌクレオソームHMGB1アダクトレベルを検出するための、ELISA用量反応曲線である。

【図4】図4は、対象健常者5名及び対象癌患者11名から採取した血清試料について検出されたヌクレオソームHMGB1アダクトのELISA結果である。

20

【図5】図5は、対象健常者31名及び、(A)結腸癌、(B)乳癌又は(C)肺癌の対象癌患者74名から採取した血清試料について検出されたヌクレオソームHMGB1アダクトのELISA結果である。

【図6】図6は、Holdenriederらの文献、2001記載の方法により調製された、細胞フリーヌクレオソーム中のヌクレオソーム プロゲステロン受容体アダクトレベル検出のための、ELISA用量反応曲線である。

【図7】図7は、前立腺癌対象2例及び、Holdenriederらの文献、2001記載の方法により調製された細胞フリーヌクレオソーム試料中の、ヌクレオソーム アンドロゲン受容体アダクトレベル検出についての、ELISA結果である。

【図8】図8は、Holdenriederらの文献、2001記載の方法により調製された、細胞フリーヌクレオソーム中のヌクレオソーム エストロゲン受容体アルファ(ER α)アダクトレベル検出のための、ELISA用量反応曲線である。

30

【図9】図9は、消化されたMCF7クロマチン中のヌクレオソーム ER α アダクトレベル検出のためのELISA結果である。このアッセイは2種の異なるフォーマットに従い行われた。第一のフォーマットでは、抗ヌクレオソーム抗体はウェル上で被覆され、抗ER α 抗体はビオチン化された。第二のフォーマットでは、抗ER α 抗体がウェル上で被覆され、抗ヌクレオソーム抗体がビオチン化された。

【図10】図10は、ヌクレオソームH2AZ ER α アダクトのELISA結果である。

【図11】図11は、対象健常者12名及び対象癌患者16名から採取した血清試料について検出されたヌクレオソーム ER α アダクトのELISA結果である。

40

【発明を実施するための形態】

【0032】

(発明の詳細な説明)

本発明の第一の態様に従い、癌、自己免疫疾患又は炎症性疾患の診断用の血液中のバイオマーカーとしての、ヌクレオソーム タンパク質アダクトの使用が提供される。一実施態様において、前記バイオマーカーは、癌の診断に使用される。本発明者らは、HMGB1及びEZH2を含有する2個のこれらアダクトが対象癌患者の(体)循環に存在するが対象健常者の循環中で検出されないことを示した。

【0033】

癌はホルモン依存性があり、その成長にはホルモンの存在が必要であることは当分野で

50

よく知られている。核ホルモンは、受容体結合ホルモン複合体の核局在化により機能し、ゲノム中の特異的なホルモン応答要素へ結合していることも良く知られている。これら要素の関連する遺伝子の発現は、受容体結合ホルモン複合体がゲノム応答要素へ結合することにより調整される。本発明の一実施態様において、対象の腫瘍状態を特徴化するためのホルモン受容体ヌクレオソームアダクト及びホルモンホルモン受容体ヌクレオソーム複合体アダクトバイオマーカーを提供する。これらアダクトは、血液中又は別の体液中に存在する循環しているアダクトでも、又は腫瘍組織の試料からのクロマチン消化により製造されてもよい。

【0034】

核ホルモン受容体が、ホルモン性又はリガンド制御下で遺伝子発現を制御することもまた当分野でよく知られている。例えばエストロゲン受容体は、細胞膜でその基質(ステロイドホルモンエストロゲン)を結合することにより機能する。この結合の次に、ホルモン受容体複合体のインターナリゼーション、及び、受容体がゲノム中の特異的なホルモン応答要素へ結合する核内局在化が生じる。エストロゲン受容体が結合する特異的な遺伝子配列は、エストロゲン応答要素(ERE)として知られる。EREと関連する遺伝子の発現は、受容体により制御されるので、対象の循環中のエストロゲンの存在又はそのレベルにより制御される。乳癌の成長は、しばしばエストロゲン制御の下にあり、この癌は、エストロゲン依存性と言われることも当分野で広く知られている。エストロゲン受容体(ER)を過剰発現するこれら腫瘍は、しばしばER+腫瘍と呼ばれる。エストロゲン依存性腫瘍の成長は、エストロゲンのエストロゲン受容体への結合を防止することを目的とする治療的介入により、抑制又は防止でき、これは乳癌の治療では普通の方法である。これら治療の例として、エストロゲン依存性乳癌においてエストロゲンのアンタゴニストとして作用する製薬タモキシフェン及び、エストロゲン産生を抑制又は防止するアロマターゼ阻害剤が挙げられる。しかし、時間と共に、癌はエストロゲン刺激無しでも成長するエストロゲン非依存性腫瘍へ変容し、異なる治療が必要となる。エストロゲン依存性及び非依存性腫瘍の診断は、一般に腫瘍生検組織の免疫染色により腫瘍細胞内のエストロゲン受容体の存在度又はその不存在を決定することが、日常的に行われている。臨床医は、エストロゲン依存性治療が適切であるか、もはや不適切となっているかどうか、又は、対象の治療レジメンを変更して、疾患進行に応じて腫瘍の性質が変化したことを反映するべきかどうかを決定するために、腫瘍のエストロゲン依存性を、腫瘍治療期間中反復的に再試験する必要がある。残念なことに一般的な試験は最適とはいえず、試験の実施ごとに苦痛を伴う生検の反復が必要とされる。本発明の一実施態様において、乳癌患者の循環中のエストロゲン受容体ヌクレオソームアダクトの検出を、腫瘍細胞の細胞核中のEREへ結合しているエストロゲン受容体の標識として使用して腫瘍のエストロゲン依存性の指標とし、適切な治療の選択を助け、予後を予測する情報を与える。この方法は、エストロゲン受容体の存在または存在度を単純に示す以上のものであり、腫瘍中で結合しているEREエストロゲン受容体を示すことができる利点と、生検の必要無く単純な血液試験で、必要に応じた頻度で反復できる利点を有する。本発明者らは、受容体のER及びER型両方を含むヌクレオソームERアダクトの検出及び定量化のための、単純なELISA方法を開発した。驚くべきことに、これらアダクトは、癌患者の(体)循環中に存在する。

【0035】

同じ原則が、腫瘍組織自身から産生された細胞クロマチン消化産物中のエストロゲン受容体ヌクレオソームアダクトの検出にも適用できることは当業者に明らかである。この腫瘍のエストロゲン依存性の評価方法は、エストロゲン受容体の存在または存在度を単純に示す以上のものであり、腫瘍中で結合しているEREエストロゲン受容体を示すことから、従来法よりも優れている。

【0036】

本発明の他の態様では、循環中、又は別の体液中、又は、腫瘍組織からクロマチン消化産物として産生されたヌクレオソーム中のいずれかにおいて、エストロゲンエストロゲン受容体ヌクレオソーム複合体アダクト内のステロイドエストロゲン自身の存在の検出

10

20

30

40

50

が、腫瘍のエストロゲン依存性状態の標識として使用できる。

【0037】

循環しているヌクレオソームは、子宮内膜症で上昇していることが報告されている(Holdenriederらの文献;2001)。そして、子宮内膜症組織はエストロゲンに敏感であるために、子宮内膜症細胞のクロマチン内でのエストロゲン受容体の結合は、循環内でのエストロゲン受容体-ヌクレオソームアダクト、又はエストロゲン-エストロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクト(の形成)へ導く。本発明の更なる態様では、エストロゲン受容体-ヌクレオソームアダクト、又はエストロゲン-エストロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトは、例えば子宮内膜症等の、エストロゲン依存性婦人科医学的症状の存在のためのバイオマーカーとして体液内で検出される。

10

【0038】

エストロゲン依存性乳癌と同様に、アンドロゲン依存性前立腺癌の成長には、アンドロゲンが必要であるか、アンドロゲンにより促進される。アンドロゲン依存性前立腺腫瘍は同様に、アンドロゲン受容体(AR)へ結合しているアンドロゲンを阻止する方法によって治療される。アンドロゲン依存性前立腺腫瘍もまた、アンドロゲン非依存性へ変容する場合があり、物理的又は、その受容体へ結合しているアンドロゲンを阻止する薬による化学的去勢等の治療への耐性を示す。腫瘍のアンドロゲン依存性状態は、ゲノム内でアンドロゲン応答要素(ARE)へ結合しているアンドロゲン受容体のレベルにより決定でき、対象の循環内又は前立腺組織からのクロマチン消化産物内に存在する、アンドロゲン受容体-ヌクレオソームアダクトレベルの分析により決定できる。この目的のための本発明の実施態様には、対象の循環内若しくは体液内、又は対象の腫瘍組織からのクロマチン消化により産生されたヌクレオソーム内の、アンドロゲン受容体-ヌクレオソームアダクト、又はアンドロゲン-アンドロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトの検出が含まれる。本発明者らはここで、ヌクレオソーム-ARアダクトの検出及び定量化のための単純なELISA法を開発し、それらの用途を示す。本発明者らは又、ヌクレオソーム-プロゲステロン受容体アダクトの検出及び定量化のための単純なELISA法を開発した。他のホルモン依存性疾患も、本発明の方法の同様な実施態様の対象となる。これら実施態様には、例えばグルココルチコイド受容体、甲状腺ホルモン受容体及びレチノイン酸受容体-ヌクレオソームアダクト等の他の受容体-ヌクレオソームアダクトを検出して、例えば様々な種類の、レチノイン酸受容体を含む白血病等の腫瘍を検出する態様も含まれる。

20

30

【0039】

本発明の更なる態様において、前記の方法はホルモン-ホルモン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトを検出するために使用できる。一実施態様において、ホルモン-ホルモン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトには、チロキシン-甲状腺ホルモン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクト、トリヨードサイロニン-甲状腺ホルモン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクト、レチノイン酸-レチノイン酸受容体-ヌクレオソーム複合体アダクト、エストロゲン-エストロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクト、又はエストロゲン-エストロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトが含まれる。この本発明の態様は、例えば(エストロゲン非依存性乳癌等の)疾患進行期間内の突然変異のために、そのリガンドへ結合していないホルモン受容体から、ホルモン活性化されたアダクトや、野生型又は正常型(normal)ホルモン受容体を含むアダクトを区別する利点を有する。この本発明の態様は、複数の実施態様で実施できる。一実施態様において、ホルモン自身への結合方向性を有する抗体又は他のバインダーを、ホルモン受容体へ結合するための抗体の代わりに使用できる。代替的な実施態様では、ホルモンは、抗体が捕獲したホルモン-ホルモン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトから抽出され、定量化される。定量化法としては、例えば免疫アッセイ法、分光分析法、又は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、液体クロマトグラフィーとそれに続く質量分光分析器(LC/MS)若しくはガスクロマトグラフィーとそれに続く質量分光分析器(GC/MS)等のクロマトグラフィー法の確立された方法が挙げられる。例えば、エストロゲン-エストロゲン受容体-ヌクレオソーム複合体アダクトは、アダクト上(例えば、エストロゲン受容体上、又はヌクレオソーム上)に存在する

40

50

エピトープへの結合特異性を有する固定化抗体により捕獲される。次にホルモンは、アダクトと結合している固相から、有機溶媒(例えば、ジエチルエーテル)で抽出される。この溶媒を、移し、乾燥し、アンドロゲンをアッセイバッファ中に再溶解し、その濃度を(例えば、競合的免疫アッセイにより)測定する。この実施態様は、ステロイド及び甲状腺ホルモン等の小分子ホルモンに、特に適した用途を持つことは、当業者に明らかである。

【0040】

本発明は、ヌクレオソームに結合するタンパク質の検出も目的とする。これは、二重抗体ELISA試験を利用して行うことができ、その試験では、1の抗体はヌクレオソームに結合し、もう一方はヌクレオソームに結合しているタンパク質に結合する特異性を有する。しかし、ヌクレオソームに結合する抗体は、全てのヌクレオソーム複合体への特異性を有する必要は無いが、タンパク質又はヌクレオソームの核酸成分部分への特異性は必要である。本発明のこの実施態様では、ヌクレオソームへ結合するために採用される抗体は、例えば、特定のヒストン、ヒストン修飾、ヒストン変種若しくはアイソフォーム、又は特定のヌクレオチド若しくは修飾されたヌクレオチド等の、ヌクレオソームのいずれかの成分部分に結合する特異性を有する。本発明者らは、このアッセイ設計はヌクレオソームのバインダーとしてヒストン変種H2AZへ特異的な抗体を使用する例を利用して、良好に実施できることを示した。この方法は、アダクト内の目的のタンパク質及びH2AZ両方を含むこれらヌクレオソームのみと選択的に結合する、追加的な利点を有することは当業者に明らかである。本発明の設計は、アダクトタンパク質を、いずれかの特定のヒストン、ヒストン修飾、ヒストン変種、ヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は他のヌクレオソーム構造との組み合わせでも試験するためのアッセイ法を提供する。

10

20

【0041】

本発明の第二の態様に従い、試料中の、ヌクレオソーム タンパク質アダクトの存在を検出する方法であって：

- (i) 該試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
 - (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームへ付加したタンパク質に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
 - (iii) 該第二の結合剤の、該試料中の付加されたタンパク質への結合を検出又は定量する工程；並びに
 - (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

30

前記検出される結合剤は、付加されたタンパク質又はヌクレオソーム又はヌクレオソームの成分部分のいずれかへ抗体が特異性を有するように選択できることは、当業者に明らかである。

【0042】

本発明の第三の態様に従い、試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在を検出する方法であって：

- (i) 試料を、ヌクレオソームへ付加されたタンパク質に結合する第一の結合剤と接触させる工程；
 - (ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二の結合剤と接触させる工程；
 - (iii) 該第二の結合剤の、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への結合を検出又は定量する工程；並びに
 - (iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；
- を含む、前記方法が、提供される。

40

【0043】

一実施態様において、ヌクレオソームアダクトには、炎症誘発性タンパク質、高移動度群タンパク質、ポリコームタンパク質、クロマチン修飾酵素、核受容体又はホルモンが含

50

まれる。代替的な実施態様では、ヌクレオソームアダクトには、高移動度群タンパク質、ポリコームタンパク質、クロマチン修飾酵素、ホルモン受容体又はホルモンが含まれる。本発明の更なる態様では、ヌクレオソームアダクトには、クロマチン修飾酵素、核受容体又はホルモンが含まれる。本発明の更なる態様では、高移動度群タンパク質はHMGB1である。一実施態様において、バイオマーカーが癌診断用に使用される場合、ヌクレオソームタンパク質アダクトには、高移動度群タンパク質が含まれる。

【0044】

一実施態様において、クロマチン修飾酵素は、ヒストンアセチル化、脱アセチル化、メチル化、脱メチル化、リン酸化、脱リン酸化、ユビキチン化、脱ユビキチン化、SUMO化、脱SUMO化酵素、又はDNAメチルトランスフェラーゼ酵素である。代替的な実施態様において、クロマチン修飾酵素はEZH2である。

10

【0045】

一実施態様において、ヌクレオソームタンパク質アダクトに核受容体が含まれる場合、該核受容体は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体、グルココルチコイド受容体、又はレチノイン酸受容体である。代替的な実施態様において、ヌクレオソームタンパク質アダクトが核受容体を含む場合、該核受容体は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、又はレチノイン酸受容体である。

【0046】

一実施態様において、ヌクレオソームタンパク質アダクトがホルモンを含む場合、該ホルモンは、甲状腺ホルモン、グルココルチコイドホルモン、又は、エストロゲン、アンドロゲン、プロゲステロン、コルチコステロイド、若しくはレチノイン酸等のステロイドホルモンである。代替的な実施態様において、ヌクレオソームタンパク質アダクトがホルモンを含む場合、該ホルモンは、エストロゲン、アンドロゲン、コルチコステロイド又はレチノイン酸等のステロイドホルモンである。

20

【0047】

一実施態様において、ヌクレオソームタンパク質アダクトがホルモン受容体を含む場合、該ホルモン受容体は、エストロゲン受容体、アンドロゲン受容体、プロゲステロン受容体、甲状腺ホルモン受容体、又はレチノイン酸受容体である。

【0048】

本発明者らは、本発明の方法は、ヌクレオソーム自身への特異性を有する抗体とヌクレオソームへ付加したタンパク質への結合特異性を有する抗体との組み合わせを使用するか、又は同様に、ヌクレオソームの成分への特異性を有する抗体を、ヌクレオソームへ付加したタンパク質への結合特異性を有する抗体との組み合わせを使用することにより実施できることを示す。一実施態様において、ヌクレオソーム又はヌクレオソーム成分抗体又はバインダーは、特定のエピジェネティックヌクレオソームエピトープへ結合する特異性を有する；例えばいずれかのヒストン変種(例えばH2AZ)、いずれかのヒストン修飾(例えばトリメチルH3K9)、又はいずれかのヌクレオチド、又は修飾されたヌクレオチド(例えば、5メチルシトシン)。代替的な実施態様において、ヌクレオソーム、又はヌクレオソーム成分バインダーは、特定のエピジェネティックシグナル構造への結合特異性を持ち、そのため該エピジェネティックシグナル構造を含む特定のサブセットのヌクレオソームアダクトのみが検出される。

30

40

【0049】

一実施態様において、使用される結合剤は、抗体、抗体断片、又はアプタマーである。本発明の更なる態様では、使用される結合剤は、抗体である。

【0050】

一実施態様において、試料は生物学的流体である。本発明の更なる態様では、試料は血液又は血清又は血漿である。体液中のヌクレオソームアダクトの検出は、生検を必要としない最小限度に侵襲的な方法である利点を有することは、当業者に明らかである。

しかし、細胞からヌクレオソームを産生し、ヌクレオソームを分析して特定のヌクレオ

50

ソームアダクトの存在を確認することにより、細胞のヌクレオソームアダクト状態を直接評価することが好ましい場合もある。

【0051】

本発明の更なる態様において、細胞中の、ヌクレオソームアダクトを検出する方法であって：

(i)細胞からクロマチンを単離する工程；

(ii)該クロマチンを消化、超音波処理、又は別の手段で破壊し、モノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソームを形成する工程；並びに

(iii)前記第2～第6のいずれかの態様に記載された本発明のELISA法により、該ヌクレオソームアダクトの存在を検出又は測定する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

10

【0052】

本発明の更なる態様において、動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断する方法であって：

(i)対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象の疾患状態を同定するために検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

【0053】

本発明の一実施態様において、試料中のヌクレオソームアダクトの存在が、その治療を必要とする対象への最適な治療レジメンを決定するために使用される。このような実施態様の一例として、腫瘍のホルモン依存性を評価するための、核ホルモン受容体ヌクレオソームアダクト又はホルモンホルモン受容体ヌクレオソーム複合体アダクトの検出が挙げられる。

20

【0054】

本発明の更なる態様において、医学治療に関する適性について動物又はヒト対象を評価する方法であって：

(i)対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象へ好適な治療を選択するためのパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルを使用する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

30

【0055】

本発明の更なる態様において、動物又はヒト対象の治療をモニタリングする方法であって：

(i)対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；

(ii)1回以上にわたって対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトの検出又は測定を反復する工程；並びに

(iii)該対象の状態の何らかの変化に関するパラメータとして、検出されたヌクレオソームアダクトレベルの何らかの変化を使用する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

40

【0056】

一実施態様において、ヌクレオソームアダクトは、測定のパネルの一つとして検出又は測定される。

本発明の更なる態様において、単独測定又は測定のパネルの一部のいずれかで、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する方法が提供され、その方法は、疾患状態を検出又は診断する目的のため、医学治療に関する適性について動物又はヒト対象を評価するため、動物又はヒト対象の治療をモニタリングするため、又は真性癌又は癌の疑い、良性腫瘍、炎症性疾患、自己免疫疾患、子宮内膜症、伝染病、敗血症、卒中又は心筋梗塞に罹患している対象に使用するためのいずれかを目的とする。

【0057】

50

本発明の更なる態様において、動物又はヒト対象における疾患状態を検出又は診断するためのヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

(i) 対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；

(ii) 健常対象又は対照対象の体液中の、ヌクレオソームアダクトを検出又は測定する工程；並びに

(iii)ヌクレオソームアダクトが、疾患状態のバイオマーカーとして有用であるかどうかを同定するために、疾患対象及び対照対象において検出されたレベル間の差異を使用する工程；

を含む、前記方法が、提供される。

【0058】

本発明の更なる態様において、ヌクレオソームアダクト若しくはそれらの部分成分、又はDNA塩基、ヌクレオチド、ヌクレオシド若しくはそれらの部分成分の構造/形状の模倣体に特異的なリガンド又はバインダーを備える、ヌクレオソームアダクトの検出のためのキットであり、該キットの使用説明書も一緒に備える、前記キットが、提供される。

【0059】

ヒストン及び核酸成分に加え、クロマチンは、広い範囲の機能を奏する非常に多様なタンパク質を含むことで知られる。本発明者らは、これらタンパク質の例としてHMGB1、EZH2及び数個の核受容体を選択し、これらタンパク質のモノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームアダクトを検出するための単純なELISA法を開発した。本発明者らは、健常な対象者及び疾患のある対象者から採取された血清試料へ直接これらELISA法で実施し、その方法は試料抽出又はその他の試料の前処理を必要としない。驚くべきことに、本発明者らは、これらヌクレオソームアダクトは、対象癌患者の血清内で検出可能であり、ヌクレオソームアダクトELISAアッセイは、疾患状態の検出及び診断に有用であることを示すことができた。

【0060】

HMGB1は、損傷関連分子パターン (damage associated molecular pattern: DAMP) タンパク質であり、細胞死、アポトーシス、並びに様々な炎症性及び自己免疫症状、敗血症、髄膜炎、神経変性症、SLE及び癌を含む多数の疾患に関係する (Tangらの文献;2010)。HMGB1の過剰発現は多くの癌において発生し、侵潤及び転移に関係すると考えられている (Simsらの文献;2010)。HMGB1レベルの上昇は、癌患者及び種々の他の症状の血液中でも見られる (Stoetzerらの文献;2012)。循環しているHMGB1はELISA法で測定できるが、循環しているHMGB1は、結合 (bound) 型及び分離 (free) 型をとり、一般にこれらを区別することができるウェスタン免疫ブロット法は日常的使用に相当では無いため、この測定は日常的な臨床操作で使用されない。従って、分離したHMGB1とHMGB1複合体とを区別する信頼性のある方法が求められている (Urbonaviciute及びVollの文献、2011)。循環しているHMGB1複合体の重要なクラスは、HMGB1-ヌクレオソームアダクトであり、本発明の一実施態様は、HMGB1-ヌクレオソームアダクト及び他のHMG-ヌクレオソームアダクトの検出を目的とする。本発明者らはHMG-ヌクレオソームアダクトが、急速で単純なELISA法を使用して、癌患者の血液中に測定できることを示した。

【0061】

HMGB1は、アポトーシス細胞のクロマチンへ緊密に結合している。ヌクレオソーム-HMGB1複合体の研究は、これらアダクトは自己免疫疾患SLEの患者である対象の循環内に発見され、そのアダクトはSLEの重要な特色である抗核抗体の発達に関与していることを示す。循環内でのこれらアダクトの存在は、それらの検出のために使用されるウェスタンブロット法は、高価で遅く、手間がかかるので日常的使用には適当でないため、臨床的診断に有用な目的のために使用されていなかった。本発明は、これらの欠陥を解消するものである。

【0062】

EZH2は、ヌクレオソームのヒストン3のリジン27アミノ酸残基をメチル化するクロマチン修飾酵素 (ヒストン-リジンN-メチルトランスフェラーゼ) であり、この修飾は、クロ

10

20

30

40

50

マチン凝縮及び遺伝子抑制へと向かう(Caoらの文献;2002)。このタンパク質は、生細胞の細胞核中のクロマチンを結合することが知られている。驚くべきことに本発明者らは、細胞死後でもEZH2はヌクレオソームへ結合しており、モノヌクレオソーム EZH2及びオリゴヌクレオソーム EZH2アダクトは、本発明の新規なELISA法を使用して対象癌患者の血清中で検出できることを示す。

【0063】

クロマチン修飾酵素が癌に関係することは知られており(Fullgrabeらの文献;2011)、これら酵素活性の阻害を目標とした薬剤の使用は、癌治療法の主要な形態である。これら薬剤として、本発明を制限するものではないが、例えば、ヒストン脱アセチル化複合体阻害剤(HDACi)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤(HMTi)及びDNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(DNMTi)が挙げられる。循環内にHMGB1アダクトが存在することは病理学的であって、抗核抗体に関連していることは知られていたが、クロマチン修飾酵素ヌクレオソームアダクトが循環内に存在することの知見は、未だ報告されていない。クロマチン修飾酵素ヌクレオソームアダクトのアッセイには、癌に関して多くの利用態様があり、例えば癌疾患状態の評価や、例えば循環しているクロマチン修飾酵素ヌクレオソームアダクトのレベルが、特定の薬剤での治療で変化したかを測定する等のクロマチン修飾酵素阻害剤の有効性の測定等が挙げられる。本発明の方法は、疾患検出、モニタリング、予後、鑑別診断、及び治療レジメンの選択等の非常に多様な疾患診断に有用な目的のために、循環しているクロマチン修飾酵素ヌクレオソームアダクトレベルを決定するために使用できる。本発明者らは、HMT酵素EZH2を含有するヌクレオソームアダクトを、癌患者の循環内で検出できることを示す。本発明の方法が、前記のHDAC及びDNMT酵素、並びに、例えばヒストンアセチル化、脱メチル化、リン酸化、脱リン酸化、ユビキチン化、脱ユビキチン化、SUMO化、及び脱SUMO化のための酵素等の、他の多くの酵素を含む他のクロマチン修飾酵素へも適用できることは、当業者に明らかである。

10

20

【0064】

核受容体は、リガンドホルモン制御下において、細胞核中でのそれらの遺伝子調節効果を発揮する。例示として、ステロイドホルモン受容体、甲状腺受容体、グルココルチコイド受容体及びレチノイン酸及びビタミンD受容体等が挙げられる。これら受容体は、種々の癌及び他の疾患に関する機構に関連する。数例ではあるが、白血病におけるレチノイン酸受容体(RAR)、乳癌及び子宮内膜症におけるエストロゲン受容体(ER)、前立腺癌におけるアンドロゲン受容体(AR)、及び、甲状腺疾患及び癌における甲状腺ホルモン受容体の関与が挙げられる。

30

驚くべきことに、本発明者らは、核受容体ヌクレオソームアダクトが、癌患者の循環内で検出できることを示した。

【0065】

以上のとおり、本発明者らが研究に選択した全ての細胞内クロマチン関連タンパク質は、ヌクレオソームアダクトの形で癌患者の血清中に発見された。これら知見は、これらアダクトは異常なものではなく、多くの異なるクロマチン関連タンパク質を含む、多くのこれら細胞内ヌクレオソームタンパク質アダクトは、細胞死の後でもその状態を無傷で保ち、本発明の方法により癌、自己免疫及び炎症性疾患患者の血清中で検出可能であることを示すものである。

40

【0066】

本発明者らは、抗ヒストン抗体を捕獲抗体として、これらアッセイのために、適切で特異的な抗クロマチンタンパク質(抗HMGB1、抗EZH2又は抗核受容体)抗体と組み合わせて使用した。本発明者らは、特異的なタンパク質を含むヌクレオソームアダクトが癌患者対象から採取された血液試料中で測定でき、非侵襲的又は最小限度に侵襲的バイオマーカーとしての使用において識別可能なことを示すためにアッセイを使用した。疾患のある対象から採取された血清試料中で検出されたヌクレオソームアダクトレベルは、対象健常者からの血清試料中で検出されたものとは異なっていた。

【0067】

50

本発明者らは、結腸癌の対象患者3名、肺癌の対象患者6名、及び膵臓癌の対象患者2名から採取した血液試料中の、循環している細胞フリーヌクレオソーム HMBG1及びヌクレオソーム EZH2アダクトのレベルを測定し、これらを健常対象者5名からの血液試料中に存在するレベルと比較し、文献(Holdenriederらの文献,2001)記載に従い調製した、対象健常者から人為的に産生された血清ヌクレオソーム調製品に存在するレベルと比較し、更にHeLa細胞から抽出されたクロマチンの消化により調製された市販品であるヌクレオソーム調製品と比較した。

【0068】

ヌクレオソーム HMBG1及びヌクレオソーム EZH2アダクトに関する正常な範囲は、対象健常者5名に関する結果から算出し(平均結果±該平均の2標準偏差)、対象癌患者の結果を、それらがそれぞれの正常な範囲内か外かを見て判断した。データは、結腸癌試料3件中2件、肺癌試料6件中4件、膵臓癌試料2件中1件が、高いヌクレオソーム HMBG1アダクトレベルを有し、同様に、結腸癌試料3件中2件、肺癌試料6件中4件、膵臓癌試料2件中1件が、高いヌクレオソーム EZH2アダクトレベルを有する(光学濃度ODは、正常な範囲の最高値よりも高い結果を示した)ことを示す。

10

本発明者らは同様に、健常な及び疾患のある患者における核受容体ヌクレオソームアダクトのレベルを測定し、これらは癌患者の血清中に存在することを示した。

【0069】

クロマチンへ結合するタンパク質として、本発明を限定するものではないが、核受容体、高移動度群タンパク質(HMBG1等)、ポリコームタンパク質、クロマチン修飾酵素(EZH2等)、DNA修飾酵素、核受容体、転写因子、構築又は構造タンパク質、転写促進因子、転写抑制因子、複製タンパク質、DNA損傷修復タンパク質、及び、遺伝子発現、クロマチンパッキング又は複製の制御に関与する、その他のタンパク質が挙げられる。

20

【0070】

ヌクレオソームアダクトは、細胞死後に生物学的流体中に存在するヌクレオソームの結合によっても発生できる。これらアダクトの例として、SLE等の自己免疫疾患で形成されるヌクレオソーム抗体アダクトが挙げられる。

【0071】

従って、本発明の一実施態様では、ヌクレオソームタンパク質複合体又はアダクトの存在を検出又は測定する方法を提供する。測定されるヌクレオソームアダクトは、いかなる由来のものでもよく、本発明を限定するものではないが、例えば、健常状態又は疾患状態の結果として生物学的流体中に存在する天然由来ヌクレオソームアダクトでもよく、ヌクレオソームアダクトは細胞から抽出されるクロマチンの消化により産生されてもよく、それらは又(例えばHoldenriederらの文献の方法により;2001)誘起されたアポトーシス又は細胞死により産生されてもよい。驚くべきことに、本発明者らは、ヌクレオソームアダクトは、これら全ての状態で発生し、本発明の方法により検出できることを示す。

30

【0072】

本発明の他の態様において、生物学的流体中でのヌクレオソームタンパク質アダクトの存在の検出又は測定方法が、提供される。

本発明の更なる態様において、対象試料の1以上のヌクレオソームタンパク質複合体又はアダクトの存在又はレベルを試験して、疾患の存在、タイプ、再発若しくは重篤度を検出又は診断する方法、又は最適な薬剤若しくは他の治療選択肢を評価する方法が、提供される。

40

【0073】

本発明の更なる態様において、試験のパネルの部分として、対象から採取された試料のヌクレオソームタンパク質複合体又はアダクトの存在又はレベルを、試験して、疾患の存在、タイプ、再発又は重篤度を検出又は診断する方法、又は、最適な、薬剤若しくは他の治療選択肢を評価する方法が、提供される。異なるヒストン修飾を含む細胞フリーヌクレオソームを検出するためのELISA法が報告されている(Bawdenらの文献;2005)。

【0074】

50

従って、それらパネル試験は、例えば、異なるヌクレオソームエピトープを含むヌクレオソームの2以上の測定からなるものでもよい。本発明を制限するものではないが例えば、異なるアダクト及び/又はヒストン修飾及び/又はヒストン変種及び/又は修飾されたヌクレオチド及び/又は、ヌクレオソーム単体、又はそれらの組み合わせ又は割合の測定、及び対象の健常状態又は疾患状態の標識としてのその他のヌクレオソームエピトープが挙げられる。

【0075】

本発明者らは、本発明の方法は、特定のタンパク質を含むヌクレオソームアダクトの、成功した検出及び測定法であり、この方法は、従来法よりも優れたヌクレオソームアダクトの検出方法であると結論する。この方法は、急速で、安価で、複雑な生物学的媒体や、血液及びその誘導体等の流体中での使用に適している。本発明者らは、本発明の方法が、血液中のヌクレオソームアダクトを検出するために使用でき、癌のバイオマーカーとして使用できることを示した。血液中に存在するバイオマーカーは、循環しているヌクレオソームの上昇に関連する癌及び他の疾患(Holdenriederらの文献;2001)のための、広い範囲での診断及び疾患スクリーニング目的に価値を有することは当業者に明らかである。

10

【0076】

本発明の一の態様において、試料中の細胞フリーヌクレオソームアダクトを検出及び測定するための、二重抗体、免疫測定的又はサンドイッチ免疫アッセイ法が提供される。この態様の一実施態様は免疫アッセイであって：

(i) ヌクレオソームアダクトを含む可能性のある試料を、該ヌクレオソーム又はその成分に結合する第一抗体又は他のバインダーと接触させる工程；

20

(ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームタンパク質アダクトとして存在する可能性のあるタンパク質に結合する第二抗体又は他のバインダーと接触させる工程；

(iii) 該第二抗体又は他のバインダーの、該試料中のヌクレオソームタンパク質アダクトへの結合を検出及び/又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中の、ヌクレオソームタンパク質アダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；

を含む、前記アッセイである。

【0077】

本発明の一の態様において、試料中の細胞フリーヌクレオソームアダクトの、免疫測定的免疫アッセイによる検出及び測定法であって、

30

(i) 特定のタンパク質を含むヌクレオソームアダクトを含む可能性のある試料を、目的のタンパク質に結合する第一抗体又は他のバインダーと接触させる工程；

(ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソーム又はその成分に結合する第二抗体又は他のバインダーと接触させる工程；

(iii) ヌクレオソーム試料に対する該第二抗体又は他のバインダーの、該試料中のヌクレオソーム又はその成分への該第二抗体又は他のバインダーの結合を検出及び/又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中の、ヌクレオソームアダクトの存在の測定値として、当該結合の存在又は程度を使用する工程；

40

を含む、方法が提供される。

【0078】

前記第一の態様の工程(i)及び前記第二の態様の工程(ii)におけるヌクレオソーム又はその成分に結合するために使用される抗体又は他のバインダーは、無傷のヌクレオソームに特異的、又はヌクレオソームのいずれかの成分部分に特異的な抗体(又は他のバインダー)であってよいことは当業者に明らかであり、本発明を制限するものではないが、その特異選択性は、例えばヒストン、ヒストン変種、ヒストン修飾、ヌクレオチド、修飾ヌクレオチド又は、ヌクレオソームの他のDNA成分部分に対するものが挙げられる。以上より、本発明の更なる態様では、更に別の特徴を含み、これらヌクレオソームタンパク質アダクト(のみ)を検出する方法が提供され、ここでのバインダーの特異選択性は、本発明を

50

制限するものではないが、特定のヒストン修飾、ヒストン変種又はヌクレオチドに対するものである。この設計の利点は、アッセイのヌクレオソーム成分エピトープ及び付加したタンパク質エピトープを、対象健常者と、対象疾患患者又は他の試験対象である患者状態では非常に異なるレベルを示すエピトープとなるように選択できることである。従って、アッセイにより検出されるヌクレオソームの割合は減少させて、アッセイの臨床的選択性又は特異性は向上させることが可能である。

【0079】

本発明者らは、ヌクレオソーム成分H2AZへの特異性を有する抗体を、抗EZH2抗体と関連する抗ヌクレオソーム抗体として使用するアッセイ設計を行い、H2AZへ特異的に結合するヌクレオソーム EZH2アダクトがこのアッセイにより検出でき、このアッセイは、対象健常者及び疾患のある対象から採取された試料間を判別するために使用できることを示した。

10

【0080】

本発明の更なる態様において、検出されるヌクレオソームアダクトは、2以上のタンパク質を含んでも良い。アダクト中の更なるタンパク質は、直接的又は間接的にヌクレオソームへ結合する。例えばヌクレオソームは、HMGBタンパク質へ結合し、追加的に更に1又は2以上のタンパク質へ結合できる。更なるタンパク質は、直接的にヌクレオソームへ結合しても、又はHMGBタンパク質へ結合してその結果間接的にヌクレオソームへ結合してもよい。ヌクレオソームアダクトとして、複数のタンパク質成分からなる巨大タンパク質複合体も含まれ、その場合、複合体アダクト内での特定のタンパク質のヌクレオソームへの結合は、複数の仲介的な結合を介在するものとなる。ヌクレオソームアダクト内でヌクレオソームへ結合するタンパク質は、直接的又は間接的のいずれであっても本発明の方法で検出されることは、当業者に明らかである。

20

【0081】

本明細書に記載された本発明の方法は、バイオセンサー型アッセイ及び、例えば米国のForteBio社から市販されているタイプの非標識アッセイを含む、種々の実施態様を含むことは、当業者に明らかである。

【0082】

本発明の更なる態様において、試料における特定のヌクレオソームアダクトを含むヌクレオソームの割合を検出する方法であって：

30

(i) 試料中のヌクレオソームのレベルを検出又は測定する工程；

(ii) 本発明の方法により、ヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(iii) 2個の測定値を、ヌクレオチドアダクトを含むヌクレオソームの割合を決定するために使用する工程

を含む、方法が提供される。

【0083】

本発明者らは、対象から採取された血液中のヌクレオソームアダクト検出及び測定が、癌罹患対象を同定し、かれらを対象健常者と区別する診断に役立つ方法として使用できることを示した。本発明の更なる態様において、体液中の細胞フリーヌクレオソームアダクトの存在及び/又はレベル又は濃度の測定又は検出により、疾患の存在を検出又は診断する方法が提供され、対象の疾患状態のバイオマーカーとして、検出されたレベルを使用し、本発明を限定するものではないが、疾患の臨床的診断、疾患タイプ又はサブタイプの鑑別診断、又は疾患予後、又は疾患再発、又は治療レジメンへの対象の感受性の診断が含まれる。診断試験に使用される体液は、本発明を限定するものではないが、血液、血清、血漿、尿、脳脊髄液及び他の液体を含むことは、当業者により理解されるであろう。好ましい実施態様において、試料として選択される体液は、血液、血清又は血漿である。体液中のヌクレオソームアダクトのアッセイ応答、レベル、濃度又は量は、本発明を限定するものではないが例えば、存在する総ヌクレオソームのレベルの割合として、又はヒストン修飾等の別のヌクレオソーム構造を含むヌクレオソームのレベルに対する比、又は総DN

40

50

Aのレベルに対する比として、絶対ベース又は相対ベースとして表すことができる。

【0084】

本発明の一実施態様において、ヌクレオソームアダクトの測定は、対象の疾患状態の検出又は診断のための試験又は測定の診断パネルのメンバーとして使用され、本発明を限定するものではないが、疾患の臨床的診断、疾患タイプ又はサブタイプの鑑別診断、又は疾患予後、又は疾患再発、又は治療レジメンへの対象の感受性の診断が含まれる。

【0085】

本発明の別の態様において、細胞中の、クロマチンのタンパク質との結合の存在及び/又はレベルを検出又は測定する方法であって：

(i)細胞からクロマチンを単離する工程；

(ii)該クロマチンを破壊し、モノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソームを形成する工程；並びに

(iii)本明細書記載の免疫アッセイにより、該モノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソーム中のヌクレオソームアダクトの存在を検出又は測定する工程；

を含む方法が、提供される。

【0086】

クロマチンからモノヌクレオソーム及び/又はオリゴヌクレオソームを調製する方法は当分野で公知であり、酵素消化及び超音波処理が挙げられる(Daiらの文献;2011)。本発明者らは、Hela細胞から、及びMCF7細胞から産生されたヌクレオソームについてこの態様を示した。

【0087】

本発明の任意の態様に関する用語である、抗体、バインダー又はリガンドは、本発明を限定するものではないが、抗体断片、アプタマー又は、特定の分子若しくは実体に結合可能である任意のバインダーを含むことが意図されていること、並びに任意の好適なバインダーを本発明の方法において使用できることは、当業者に明らかである。同じく、用語ヌクレオソームは、液体媒体中で分析することができるモノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソーム及びそのクロマチン断片を含むことを意図されていることも明らかである。

【0088】

本発明の別の態様において、ヌクレオソームアダクト若しくはそれらの部分成分、又はヌクレオソームアダクト若しくはそれらの部分成分の構造/形状の模倣体に特異的なリガンド又はバインダーを備える、ヌクレオソームアダクトの検出又は測定のためのキットであり、本明細書に記載されたいずれかの方法に従う、該キットの使用説明書も一緒に備える前記キットが、提供される。

【0089】

本発明の更なる態様において、動物又はヒトにおける疾患状態を検出又は診断するためのヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

(i)罹患対象の体液中の、細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；

(ii)対照対象の体液中の、細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(iii)ヌクレオソームアダクトが、その疾患のバイオマーカーとして有用であるかどうかを同定するために、罹患対象及び対照対象において検出されたレベル間の差異を使用する工程；

を含む、方法が提供される。

【0090】

対照対象は、例えば、その疾患を罹患していないことがわかっている対象を含んでよいが、(例えば；鑑別診断の検査のために)異なる疾患を伴う対象であってよいが、など様々なことを基礎に選択され得ることは、当業者には明らかである。

【0091】

本発明の更なる態様において、罹患した動物又はヒト対象の予後の評価のために、ヌク

10

20

30

40

50

レオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

(i) 罹患対象の体液中の細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(ii) 罹患対象の体液中で検出された細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを、該対象の疾患転帰と関連させる工程；

を含む方法が、提供される。

【0092】

本発明の更なる態様に従い、治療を必要とする罹患した動物又はヒト対象のための治療レジメンの選択に使用されるヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

(i) 罹患対象の体液中の細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(ii) 罹患対象の体液中に検出された細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを、それらの対象における治療レジメンの観察された有効性と関連させる工程；

を含む方法が、提供される。

【0093】

本発明の更なる態様において、罹患した動物又はヒト対象の治療をモニタリングするために使用されるヌクレオソームアダクトバイオマーカーを同定する方法であって：

(i) 罹患対象の体液中の、細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを検出又は測定する工程；

(ii) 対象の疾患進行時、1回以上にわたって、該検出又は測定を反復する工程；並びに

(iii) 罹患対象の体液中に検出された細胞フリーヌクレオソームアダクトのレベルを、対象における疾患進行と関連させる工程；

を含む方法が、提供される。

本発明の更なる態様において、本明細書に記載された方法で同定されるバイオマーカーが提供される。

【0094】

本発明の更なる態様は、バイオマーカーに特異的に結合することが可能である、天然の又は化学的に合成された化合物などの、リガンド又はバインダーを提供する。本発明のリガンド又はバインダーとして、バイオマーカーに特異的に結合することが可能である、ペプチド、抗体若しくはそれらの断片、又はプラスチック抗体などの合成リガンド、又はアプタマー若しくはオリゴヌクレオチドが挙げられる。この抗体は、バイオマーカーに特異的に結合することが可能な、モノクローナル抗体又はそれらの断片でもよい。本発明のリガンドは、ルミネセンス、蛍光、酵素又は放射性マーカーなどの検出可能なマーカーにより標識されてよく；或いは又は加えて、本発明のリガンドは、親和性タグ、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジン若しくはHis(例えばhexa His)タグにより標識されてもよい。或いは、リガンド結合は、非標識技術、例えばForteBio社の技術を用い、決定されてよい。

【0095】

本発明のバイオセンサーは、バイオマーカーに対する抗体に特異的に結合することが可能である、バイオマーカー又はそれらの構造/形状の模倣体を含んでもよい。同じく、本明細書記載のリガンド又は模倣体を含むアレイも提供される。

【0096】

同じく本発明により、天然の又は化学的に合成されることができ、且つ好適にはペプチド、抗体若しくはそれらの断片、アプタマー若しくはオリゴヌクレオチドである、本明細書記載の1種以上のリガンドの使用、又はそのバイオマーカーを検出及び/又は定量するための、本発明のバイオセンサー、若しくは本発明のアレイ、若しくは本発明のキットの使用が提供される。これらの使用において、検出及び/又は定量は、本明細書記載の生物学的試料について実施することができる。

【0097】

診断又はモニタリング用キットが、本発明の方法を実行するために提供される。そのようなキットは、好適には、バイオマーカーの検出及び/若しくは定量のための、本発明のリガンド、並びに/又はバイオセンサー、並びに/又は本明細書記載のアレイを、任意にこのキットの使用説明書と一緒に備えてもよい。

【0098】

本発明の更なる態様は、本明細書記載の1種以上のバイオマーカーを検出及び/又は定量することが可能であるバイオセンサーを含む、疾患状態の存在を検出するためのキットである。

疾患の存在を検出するためのバイオマーカーは、その障害の進行を遅延又は停止する新規な標的及び薬物分子の発見に必須の標的である。バイオマーカーのレベルは、障害及び薬物反応の指標であるので、このバイオマーカーは、インビトロアッセイ及び/又はインビボアッセイにおける新規な治療用化合物の同定に有用である。本発明のバイオマーカーは、バイオマーカーの活性を調整する化合物のスクリーニング法において利用することができる。

【0099】

このように、本発明の更なる態様において、本発明のペプチド、抗体若しくはそれらの断片又はアプタマー若しくはオリゴヌクレオチドであることができる、本明細書記載のような、バインダー若しくはリガンドの使用；又は、本発明のバイオセンサー、若しくはアレイの使用；又は、バイオマーカーの産生を促進及び/若しくは抑制することができる物質を同定するための、本発明のキットが提供される。

【0100】

同じく、対象におけるバイオマーカーの産生を促進又は抑制することが可能である物質を同定する方法であって、試験物質を、対象動物へ投与し、対象由来の試験試料中に存在するバイオマーカーのレベルを検出及び/又は定量することを含む方法が、提供される。

【0101】

用語「バイオマーカー」は、プロセス、事象、又は状態の、示差的な生物学的指標又は生物学的に誘導された指標を意味する。バイオマーカーは、臨床スクリーニング等の診断方法、及び予後判定の方法、並びに療法の結果のモニタリング、特定の治療的処置に対し最も応答性の高い患者の同定、薬物のスクリーニング及び開発において、使用することができる。バイオマーカー及びそれらの使用は、新規な薬物治療の同定にとって、及び薬物治療の新規な標的の発見にとって価値がある。

【0102】

本明細書において使用される用語「検出」及び「診断」は、疾患状態の同定、確認、及び/又は特徴決定を包含している。本発明の検出、モニタリング及び診断の方法は、疾患の存在を確認するため、疾患の開始及び進行を評価することにより疾患の発症をモニタリングするため、又は疾患の改善若しくは退縮を評価するために有用である。検出、モニタリング及び診断の方法はまた、臨床スクリーニング、予後、療法選択、治療的利益の評価、すなわち薬物スクリーニング及び創薬に関する、評価方法においても有用である。

【0103】

有効性診断及びモニタリングの方法は、正確な診断を確立し、最も適切な治療の迅速な同定を可能にし(従って有害な薬物副作用への不要な曝露を減少し)、且つ再発率を減少させることにより、改善された予後の可能性を伴う非常に強力な「患者解決策(subject solutions)」を提供する。

【0104】

一実施態様において、該バイオマーカーは、腫瘍細胞から放出される。従って本発明の更なる態様において、(i)腫瘍細胞に会合した又は腫瘍細胞から放出された生物学的試料中のバイオマーカーを測定する工程、並びに(ii)該バイオマーカーのレベルが、腫瘍のサイズ、病期、攻撃性又は播種度に関連していることを明らかにする工程を含む、腫瘍成長を検出する方法が提供される。

【0105】

増大した細胞代謝回転、細胞死及びアポトーシスが、細胞フリーヌクレオソームの循環レベルの増加を導くことは公知である(Holdenriederらの文献、2001)。循環する細胞フリーヌクレオソームのレベルは、非特異的指標であり、且つ炎症性疾患、非常に多様な良性及び悪性の状態、自己免疫疾患に加え、外傷又は虚血後の発症を含む、多種多様な状態において起こる(Holdenriederらの文献、2001)。本発明が、循環するヌクレオソームが対象において認められる、多種の疾患領域において適用できることは、当業者に明らかである。これらには、本発明を限定するものでは無いが、外傷(例えば；重度の損傷又は手術)、極端な運動(例えばマラソンの走り)、卒中及び心臓発作、敗血症又は他の重篤な感染症、並びに子宮内膜症を含む。

【0106】

本発明の免疫アッセイは、放射性、酵素、蛍光、時間分解された蛍光及び粒子標識物を含む多様な標識物の種類による、酵素検出法(例えばELISA)を利用する免疫測定アッセイ、蛍光標識免疫測定アッセイ、時間分解蛍光標識免疫測定アッセイ、化学発光免疫測定アッセイ、免疫比濁アッセイ、粒子標識免疫測定アッセイ及び免疫放射線測定アッセイ、並びに標識抗原及び標識抗体の競合免疫アッセイ法を含む競合免疫アッセイ法を含む。該免疫アッセイ法は全て、当分野において周知であり、例えば、Salgameらの文献、1997及びvan Nieuwenhuijzeらの文献、2003を参照されたい。

【0107】

一実施態様において、該生物学的試料は、体液を含む。例えば、本発明の方法において試験できる生物学的試料は、脳脊髄液(CSF)、全血、血液の血清、血漿、月経血、子宮内膜の液体、尿、唾液、又は他の体液(糞便、涙液、滑液、痰)、例えば濃縮された呼気(condensed breath)のような呼気、又はそれらからの抽出物若しくは精製物、又はそれらの希釈物を含む。生物学的試料はまた、生存対象由来の標本、又は剖検時に採取された標本を含む。試料は、例えば、適切に希釈又は濃縮等して調製することができ、且つ通常の様式で貯蔵される。

【0108】

一実施態様において、本発明の方法は、複数回反復される。この実施態様は、検出結果が経時的にモニタリングされることを可能にするという利点を提供する。そのような設定は、疾患状態の治療の有効性をモニタリング又は評価する上での利点を提供する。このような本発明のモニタリング方法を使用し、発症、進行、安定化、改善、再発及び/又は寛解をモニタリングすることができる。

【0109】

従って、本発明はまた、疾患を有すると疑われる対象における疾患状態に関する治療法の有効性をモニタリングする方法であって、該対象由来の生物学的試料中に存在するバイオマーカーを検出及び/又は定量することを含む方法を提供する。モニタリング法において、試験試料は、2回以上にわたって採取されてもよい。本方法は更に、試験試料中に存在するバイオマーカーのレベルを、1以上の対照と比較すること、並びに/又は同じ試験対象からより早い時点で、例えば治療法の開始前に採取された、及び/若しくは治療法より早い段階にある同じ試験対象から採取された、1以上の以前の試験試料と比較することを含んでよい。この方法は、異なる機会に採取された試験試料中のバイオマーカーの性質又は量の変化を検出することを含んでもよい。

【0110】

従って本発明の更なる態様に従い、ヒト又は動物対象における疾患状態に関する治療法の有効性をモニタリングする方法であって：

(a)本明細書に規定されたバイオマーカーの量を定量する工程；並びに

(b)試験試料中の該バイオマーカーの量を、1以上の対照及び/又は同じ試験対象からより早い時点で採取した1以上の以前の試験試料中に存在する量と比較する工程；を含む方法が、提供される。

【0111】

試験試料中のバイオマーカーのレベルの、同じ試験対象からより早い時点で採取した以

10

20

30

40

50

前の試験試料中のレベルに対する変化は、障害又は障害の疑いに対する該治療法の、例えば安定化又は改善などの有益な作用の指標であり得る。更に一旦治療が完了すると、疾患の再発をモニタリングするために、本発明の方法が定期的に反復されてもよい。

【0112】

治療法の有効性をモニタリングする方法は、ヒト対象及び非ヒト動物(例えば動物モデル)において、現在の治療法及び新規な治療法の治療的効果をモニタリングするために使用できる。これらのモニタリング法は、新規な薬効物質及び物質の組合せのスクリーニングに組み込むことができる。

更なる実施態様において、急速に作用する治療法に起因した、より迅速な変化のモニタリングを、数時間又は数日の短い間隔で行うことができる。

10

【0113】

本発明の更なる態様に従い、疾患状態の存在を検出するためにバイオマーカーを同定する方法が提供される。本明細書で使用される用語「同定する」とは、生物学的試料中に存在するバイオマーカーの存在を確認することを意味する。試料中に存在するバイオマーカーの量の定量は、試料中に存在するバイオマーカーの濃度を決定することを含んでよい。同定及び/又は定量は、試料について直接的に、又はそれらからの抽出物若しくはそれらの希釈物について間接的に実行することができる。

【0114】

本発明の代替的態様において、バイオマーカーの存在は、バイオマーカーに反応して対象の体により産生され、従って疾患状態を有する対象に由来する生物学的試料中に存在する、バイオマーカーに特異的に結合できる抗体又はそれらの断片の検出及び/又は定量により評価される。

20

【0115】

同定及び/又は定量は、患者由来の生物学的試料中の又は生物学的試料の精製物若しくは抽出物若しくはそれらの希釈物中の、特異的タンパク質の存在及び/又は量を同定するのに適した任意の方法により実行することができる。本発明の方法において、定量は、1又は複数の試料中のバイオマーカーの濃度を測定することにより行える。本発明の方法により試験され得る生物学的試料は、本明細書において先に規定されたものを含む。試料は、例えば、適切に希釈又は濃縮など調製されることができ、且つ通常の様式で貯蔵される。

30

【0116】

バイオマーカーの同定及び/又は定量は、バイオマーカー又はそれらの断片、例えばC末端切断を伴う断片、又はN末端切断を伴う断片の検出により行なえる。断片は、好適には、長さが4個のアミノ酸よりも大きく、例えば、長さが5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20個のアミノ酸である。特にヒストンテールの配列と同じ又は関連した配列のペプチドが、特に有用なヒストンタンパク質の断片であることは、注目される。

【0117】

前記バイオマーカーは、例えば、SELDI又はMALDI TOFにより、直接的に検出されてもよい。或いは、バイオマーカーは、抗体若しくはそれらのバイオマーカー結合断片、又は他のペプチドなどの、1種又は複数のリガンドとの相互作用、或いは例えばバイオマーカーに特異的に結合することが可能である、アダプター又はオリゴヌクレオチドなどのリガンドとの相互作用を介して、直接的に又は間接的に検出されてよい。リガンド又はバインダーは、ルミネセント、蛍光又は放射性標識などの、検出可能な標識、及び/又は親和性タグを有することができる。

40

【0118】

例えば、検出及び/又は定量は、SELDI(TOF)、MALDI(TOF)、1 Dゲル ベース分析、2 Dゲル ベース分析、質量分析(MS)、逆相(RP)LC、サイズ透過(ゲル濾過)、イオン交換、アフィニティ、HPLC、UPLC及び他のLC又はLC MS ベースの技術からなる群から選択される1種以上の方法により、実行することができる。適切なLC MS技術は、ICAT(登録商

50

標)(Applied Biosystems社、CA、米国)、又はiTRAQ(登録商標)(Applied Biosystems社、CA、米国)を含む。液体クロマトグラフィー(例えば、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)又は低速液体クロマトグラフィー(LPLC))、薄層クロマトグラフィー、NMR(核磁気共鳴)分光法も、使用することができる。

【0119】

本発明における診断又はモニタリングの方法は、バイオマーカーの存在又はレベルを検出するために、SELDI TOF又はMALDI TOFにより試料を分析することを含んでよい。これらの方法も又、臨床スクリーニング、予後、治療法の結果のモニタリング、特定の治療的処置に対し最も応答性の高い患者の同定、薬物スクリーニング及び創薬、並びに薬物治療のための新規な標的の同定に適している。

【0120】

被検体バイオマーカーの同定および/または定量は、バイオマーカーに特異的に結合できる抗体、又はそれらの断片が関与する、免疫学的方法を用いて実行されてよい。好適な免疫学的方法は、被検体バイオマーカーの検出が被検体バイオマーカー上の異なるエピトープを認識する2種の抗体を用いて実行される、サンドイッチELISAなどの、サンドイッチ免疫アッセイ;放射免疫アッセイ(RIA)、直接的、間接的又は競合酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素免疫アッセイ(EIA)、蛍光免疫アッセイ(FIA)、ウェスタンブロット、免疫沈降及び任意の粒子ベースの免疫アッセイ(例えば、金、銀、若しくはラテックス粒子、磁気粒子、又はQ dotsを使用する)を含む。免疫学的方法は、例えば、マイクロタイタープレート又はストリップフォーマットにおいて実行されてもよい。

【0121】

一実施態様において、1種以上のバイオマーカーを、生物学的経路において該バイオマーカーの上流又は下流に認められる分子、又は分子の測定可能な断片と置き換えることができる。

【0122】

疾患に特異的な重要なバイオマーカーの同定は、診断手順と治療レジメンの統合の中心である。予測的バイオマーカーを使用し、バイオセンサーなどの適切な診断ツールを開発することができる;従って、本発明の方法及び使用において、同定及び定量を、バイオセンサー、マイクロ分析システム、マイクロ操作システム、マイクロ分離システム、イムノクロマトグラフィーシステム又は他の好適な分析装置を用いて、実行することができる。バイオセンサーへは、これらのバイオマーカーの検出のための免疫学的方法、電気技術、熱技術、磁気技術、光学技術(例えばホログラム)又は音響技術を組み込んでよい。そのようなバイオセンサーを使用し、生物学的試料中に認められる予測された濃度で標的バイオマーカーを検出することが可能である。

【0123】

本明細書において使用される用語「バイオセンサー」は、バイオマーカーの存在を検出できるものを意味する。バイオセンサーの例は、本明細書に記載されている。

本発明のバイオセンサーは、バイオマーカーへの特異的結合が可能である本明細書記載のリガンドバインダー又はリガンドを含んでよい。そのようなバイオセンサーは、本発明のバイオマーカーの検出及び/又は定量において有用である。

【0124】

本発明のバイオマーカーは、「スマート」ホログラム、又は高周波音響システムを基にしたバイオセンサー組み込み技術を用いて検出することができ、そのようなシステムは特に「バーコード」又はアレイ構成に適している。

【0125】

スマートホログラムセンサー(Smart Holograms社、Cambridge、英国)において、ホログラフィー像は、バイオマーカーと特異的に反応するように増感されている薄いポリマーフィルム上に保存される。露光時に、バイオマーカーはポリマーと反応し、ホログラムにより表示された画像の変化へ導く。この試験結果の読み取りは、輝度(optical brightness)、画像、色及び/又は画像の位置における変化でもよい。定性的及び半定量的適用のため

10

20

30

40

50

には、センサーホログラムは、肉眼により読み取ることができ、従って検出装置が不要となる。定量的測定値が必要な場合は、簡単な色センサーを使用し、シグナルを読み取ることができる。試料の不透明性又は色は、このセンサーの操作に干渉しない。このセンサーのフォーマットは、いくつかの物質の同時検出のための多重化(multiplexing)を可能にする。可逆センサー及び不可逆センサーを、様々な必要要件に合致するように設計することができ、且つ目的の特定のバイオマーカーの連続モニタリングが実現可能である。

【0126】

好適には、本発明の1種以上のバイオマーカーの検出のためのバイオセンサーは、生体分子認識を、試料中のバイオマーカーの存在の検出又は定量をシグナルへ変換するのに適切な手段と組合せている。バイオセンサーは、例えば病棟、外来患者部門、手術室、自宅、野外及び職場など、「代替場所」での診断試験のために適合させることができる。

10

【0127】

本発明の1種以上のバイオマーカーを検出するためのバイオセンサーは、音響センサー、プラズモン共鳴センサー、ホログラフィーセンサー、バイオ レイヤー干渉(BLI)センサー及びマイクロ操作センサーを含む。インプリンティング認識エレメント、薄膜トランジスタ技術、磁気音響共振装置及び他の新規な音響 電気システムを、本発明の1種以上のバイオマーカーの検出のためのバイオセンサーにおいて利用できる。

【0128】

本発明の1種以上のバイオマーカーの同定及び/又は定量に關与する方法は、卓上装置において実行することができるか、或いは例えば医師の診療所又は患者のベッド脇など、非実験室環境で使用することができる、使い捨ての診断又はモニタリング用のプラットフォームに組み込むことができる。本発明の方法を実行するのに適したバイオセンサーは、光学リーダー又は音響リーダーを備える、「クレジット(credit)」カードを含む。バイオセンサーは、収集されたデータを、分析のために医師へ電送できるように構成することができ、従ってe 医療(e medicine)の基礎を形成することができる。

20

【0129】

疾患状態の存在の診断及びモニタリングのための診断用キットが、本明細書に記載されている。一実施態様において、このキットは追加的に、バイオマーカーの同定及び/又は定量が可能であるバイオセンサーを含む。本発明のキットは好適なことに、バイオマーカー又はバイオマーカーの構造/形状の模倣体に特異的な、リガンドバインダー、又はリガンド、1種以上の対照、1種以上の試薬及び1種以上の消耗品の群から選択される1種以上の成分を含み；任意に、本明細書に規定される方法のいずれかに従うキットの使用説明書と一緒に、含んでよい。

30

【0130】

疾患状態のためのバイオマーカーの同定は、診断手順と治療レジメンの統合を可能にする。本発明のバイオマーカーの検出は、臨床試験への対象が参加する前に、対象をスクリーニングするために使用できる。これらのバイオマーカーは、治療応答、応答不良、好ましくない副作用プロファイル、服薬遵守の程度及び適切な血清薬物レベルの達成を示す手段を提供する。これらのバイオマーカーを使用して薬物副作用の警告を提供することができる。応答の評価は、用量の微調整、処方薬の数の最小化、有効な治療法の達成が遅延することの減少、及び薬物副作用の回避に使用することができるので、バイオマーカーは、個人化された治療法の開発において有用である。従って、本発明のバイオマーカーをモニタリングすることにより、対象の管理(care)を、対象の障害及び薬理ゲノミクスプロファイルにより決まる必要性と合致するように正確に適応させることができ、従ってこのバイオマーカーを使用し、適量まで漸増し、陽性治療反応を予測し、且つ重度の副作用のリスクが高いそれらの対象を同定することができる。

40

【0131】

バイオマーカー ベースの試験は、「新規」な対象患者を最前線で評価できる機会を提供し、且つ現在の測定を用いては達成できない、正確で迅速な診断のための客観的測定を提供する。

50

更に、診断用バイオマーカー試験は、軽度の又は無症候性の疾患を伴うか、或いは症候性疾患を発症するリスクの高い、家族の一員又は対象を同定するために有用である。このことは、適切な治療法の開始、又は予防的対策、例えばリスク因子の管理を可能にする。これらの方策は、転帰を改善し、且つ該障害の顕性の発症を防止できることが認められる。

【0132】

バイオマーカーモニタリング法、バイオセンサー及びキットはまた、再発が、該障害の悪化に起因するかどうかを医師が決定可能にするための、対象をモニタリングするツールとしても不可欠である。薬学的治療が不適切であると評価される場合は、治療法を元に戻すか増加させることができ；適切ならば、治療法の変更も可能である。これらのバイオマーカーが該障害の症状に感受性がある場合、これらは、薬物療法の影響の指標を提供する。

10

本発明はここで、下記の非限定的実施例を参照し、例示される。

【実施例1】

【0133】

血清試料を、対象健常者5名、対象結腸癌患者3名、対象肺癌患者6名、及び対象膵臓癌患者2名から採取した。Hela細胞から抽出されたクロマチンの消化により調製され、そのヌクレオソーム内のDNA及びタンパク質は安定性のため架橋されている市販のヌクレオソーム調製品を、ウマ血清中に連続希釈した。ヒト血液中のヌクレオソーム調製品を、Holdenrieder法に従い調製した(*Holdenriederらの文献;2001)。これら試料及び調製品を、本発明の方法により、ヌクレオソーム EZH2アダクトに対して二重反復(duplicate)アッセイした。組織培養内で使用するために調製された、未希釈の(neat)市販ウマ血清も又、ヌクレオソーム又はヌクレオソームアダクトを含まない陰性の対照試料としてアッセイした。

20

【0134】

ELISA法として、無傷のヌクレオソームへ結合する固相抗ヒストン捕獲抗体及びビオチン化されたモノクローナル抗EZH2検出抗体を下記の通り使用した:0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中の抗ヒストン抗体の溶液をマイクロタイターウェル(100 µL/ウェル)へ加え、4 で一晩インキュベーションし、ウェルを捕獲抗体により被覆した。過剰な抗ヒストン抗体をデカントした。ウシ血清アルブミン(20g/L)の溶液をウェルへ添加し(200 µL/ウェル)、室温で30分間インキュベーションし、ウェル上の過剰なタンパク質結合部位をブロックした。過剰なウシ血清アルブミン溶液をデカントし、これらのウェルを、洗浄緩衝液(200 µL/ウェル、1%Tween 20を含有する0.05Mトリス/HCl緩衝液(pH7.5))により3回洗浄した。血清試料(10 µL/ウェル)及びアッセイ緩衝液(50 µL/ウェル、0.9%NaCl、0.05%デオキシコール酸ナトリウム及び1% Nonidet P40置換体(substitute)を含有する0.05Mトリス/HCl(pH7.5))を、ウェルへ添加し、4 で一晩インキュベーションした。血清試料とアッセイ緩衝液の混合物をデカントし、ウェルを、洗浄緩衝液(200 µL/ウェル)により3回洗浄した。ビオチン化された抗EZH2検出抗体の溶液を添加し(50 µL/ウェル)、且つ穏やかに攪拌しながら、室温で90分間インキュベーションした。過剰な検出抗体をデカントし、再度ウェルを、洗浄緩衝液(200 µL/ウェル)により3回洗浄した。ストレプトアビジン ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を含有する溶液を添加し(50 µL/ウェル)、且つ穏やかに攪拌しながら、室温で30分間インキュベーションした。過剰な複合体をデカントし、ウェルを再度、洗浄緩衝液(200 µL/ウェル)により3回洗浄した。呈色基質溶液(100 µL/ウェル、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸] ジアンモニウム塩)を添加し、穏やかに攪拌しながら、室温で20分間インキュベーションした。ウェルの光学密度(OD)を、標準マイクロタイタープレートリーダーを用い、波長405nmで測定した。ヌクレオソームEZH2アダクト濃度を増加することにより増加する色の用量反応曲線が認められ、ヌクレオソームアダクト非存在(ウマ血清)下では、低いバックグラウンドシグナルが認められた。陽性ELISAシグナルは、ELISAによって検出されたEZH2は、ヌクレオソーム EZH2アダクト内に組み込まれており、アダクトはヒストンタンパク質及びEZH2の両方を含み

30

40

50

(i) 捕獲抗体は試料中のヒストンに結合し(ii) 検出抗体はアダクトのEZH2成分に結合していることを指摘している。これらの結果は、図1及び図2に示す。

【実施例2】

【0135】

血清試料を、対象健常者5名、対象結腸癌患者3名、対象肺癌患者6名、及び対象膵臓癌患者2名から採取した。Hela細胞から抽出されたクロマチンの消化により調製された、市販のヌクレオソーム調製品を、ウマ血清中に連続希釈した。ヒト血液中のヌクレオソーム調製品を、Holdenrieder法に従い調製した(*Holdenriederらの文献;2001)。これら試料及び調製品を、本発明の方法により、ヌクレオソーム HMGB1アダクトに対して二重反復アッセイした。未希釈のウマ血清も又、ヌクレオソーム又はヌクレオソームアダクトを含まない陰性の対照試料としてアッセイした。

10

【0136】

ELISA法のために、無傷のヌクレオソームへ結合する固相抗ヒストン捕獲抗体及びビオチン化されたモノクローナル抗HMGB1検出抗体を下記の通り使用した:0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)中の抗ヒストン抗体の溶液をマイクロタイターウェル(100 μ L/ウェル)へ加え、4で一晩インキュベーションし、ウェルを捕獲抗体により被覆した。過剰な抗ヒストン抗体をデカントした。ウシ血清アルブミン(20g/L)の溶液をウェルへ添加し(200 μ L/ウェル)、室温で30分間インキュベーションし、ウェル上の過剰なタンパク質結合部位をブロックした。過剰なウシ血清アルブミン溶液をデカントし、これらのウェルを、洗浄緩衝液(200 μ L/ウェル、1%Tween20を含有する0.05Mトリス/HCl緩衝液(pH7.5))により3回洗浄した。血清試料(10 μ L/ウェル)及びアッセイ緩衝液(50 μ L/ウェル、0.9%NaCl、0.05%デオキシコール酸ナトリウム及び1%Nonidet P40置換体(substitute)を含有する0.05Mトリス/HCl(pH7.5))を、ウェルへ添加し、4で一晩インキュベーションした。血清とアッセイ緩衝液の混合物をデカントし、ウェルを、洗浄緩衝液(200 μ L/ウェル)により3回洗浄した。ビオチン化された抗HMGB1検出抗体の溶液を添加し(50 μ L/ウェル)、且つ穏やかに攪拌しながら、室温で90分間インキュベーションした。過剰な検出抗体をデカントし、再度ウェルを、洗浄緩衝液(200 μ L/ウェル)により3回洗浄した。ストレプトアビジン ホースラディッシュペルオキシダーゼ複合体を含有する溶液を添加し(50 μ L/ウェル)、且つ穏やかに攪拌しながら、室温で30分間インキュベーションした。過剰な複合体をデカントし、ウェルを再度、洗浄緩衝液(200 μ L/ウェル)により3回洗浄した。呈色基質溶液(100 μ L/ウェル、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]ジアンモニウム塩)を添加し、穏やかに攪拌しながら、室温で20分間インキュベーションした。ウェルの光学密度(OD)を、標準マイクロタイタープレートリーダーを用い、波長405nmで測定した。ヌクレオソームHMGB1アダクト濃度を増加することにより増加する色の用量反応曲線が認められ、ヌクレオソームアダクト非存在(ウマ血清)下では、低いバックグラウンドシグナルが認められた。陽性ELISAシグナルは、ELISAによって検出されたHMGB1は、ヌクレオソーム HMGB1アダクト内に組み込まれており、アダクトはヒストンタンパク質及びHMGB1の両方を含み(i) 捕獲抗体は試料中のヒストンに結合し(ii) 検出抗体はアダクトのHMGB1成分に結合していることを指摘している。これらの結果は、図3及び図4に示す。

20

30

【0137】

より大規模な試験において、血清試料は、対象結腸癌患者25名、対象乳癌患者25名、対象肺癌患者24名、並びに対象健常者31名から採取した。試料は、ヌクレオソーム HMGB1レベルについて試験し、対象健常者の平均結果+2標準偏差をカットオフレベルとして使用した。結腸癌、乳癌、及び肺癌に関して下記結果が得られた:

40

- ・ 結腸癌:76%の癌が検出され(25名患者中19名)90%の特異性であった(31名対象健常者中3名偽陽性)。
- ・ 乳癌:96%の癌が検出され(25名患者中24名)90%の特異性であった(31名対象健常者中3名偽陽性)。
- ・ 肺癌:100%の癌が検出され(24名患者中24名)86%の特異性であった(28名対象健常者中4名偽陽性)。

50

測定されたヌクレオソーム HMGB1アダクトレベルがカットオフレベルを上回る場合は、陽性結果とみなし、下回る場合は陰性結果とみなしている。これらの結果は、図5に示す。

【0138】

ヌクレオソーム HMGB1アダクトレベルのアッセイも又、逆の形式で行われ、抗HMGB1抗体が捕獲抗体としてウェルへ被覆され、抗ヌクレオソーム抗体がビオチン化されて検出抗体として使用された。このアッセイ形式はまた、使用された陽性対照中でヌクレオソーム HMGB1アダクトの検出に成功した(OD405nm=1.15)が、ウマ血清又は緩衝液のいずれでも検出しなかった(両者OD406nm=0.13)。

【実施例3】

【0139】

ヌクレオソーム PR ELISAアッセイを、使用されるビオチン化された抗体がプロゲステロン受容体(PR)への結合を指向する点以外は、前記実施例1の方法を使って行った。結果は、図6に示す。

【実施例4】

【0140】

前立腺癌患者2名から採取された血清試料、並びに陽性対照及び陰性対照を、使用されるビオチン化された抗体がアンドロゲン受容体(AR)への結合を指向する以外は、前記実施例1の方法を用いて実施される、ヌクレオソーム ARアダクトELISAアッセイを使用してアッセイした。結果は、図7に示す。

【実施例5】

【0141】

Holdenrieder法に従い調製した(*Holdenriederらの文献;2001)ヌクレオソーム試料を使用して、使用されるビオチン化された抗体がアルファ型エストロゲン受容体(ER α)への結合を指向する以外は前記実施例1の方法によって、ヌクレオソーム ER α アダクトELISAアッセイを行った。結果は、図8に示す。

【実施例6】

【0142】

ヌクレオソーム試料を、MCF7細胞から抽出されたクロマチンの消化により調製し、ELISAによってヌクレオソーム ER α アダクトに対してアッセイした。アッセイは、異なる抗ヌクレオソーム抗体及びベータ型エストロゲン受容体(ER β)への結合を指向する抗体を使用してアッセイした以外は前記実施例1と同様の方法で行われた。アッセイは、2つの異なるフォーマットで行われた。第一のフォーマットでは、抗ヌクレオソーム抗体はウェル上で被覆され、抗ER β 抗体はビオチン化された。第二のフォーマットでは、抗ER β 抗体がウェル上で被覆され、抗ヌクレオソーム抗体がビオチン化された。アッセイは両方のフォーマットで成功した。興味深いことに、ChIP法中でしばしば行われるように、MCF7クロマチンを架橋すると、アッセイがあまり良く実施できなかった。結果は図9に示す。

【実施例7】

【0143】

(Holdenriederらの文献;2001)記載の方法に従い調製したヌクレオソーム試料を使用し、使用されたビオチン化された抗体はヒストン変種H2AZへの結合を指向するためH2AZを含むヌクレオソーム ER α アダクトのサブセットのみが検出される以外は、前記実施例6の、抗ER β 抗体がウェル上で被覆される方法によって、ヌクレオソームH2AZ ER α アダクトELISAアッセイを行った。この方法では、ヌクレオソーム又はヌクレオソーム成分バインダーは特定のエピジェネティックシグナル構造への結合特異性を有する。そのため、エピジェネティックシグナルのみを含むヌクレオソームアダクトの特定のサブセットを検出できる。結果は図10に示す。

【実施例8】

【0144】

血清試料を、対象健常者12名、対象結腸癌患者3名、対象乳癌患者6名、対象肺癌患者3

10

20

30

40

50

名、及び対象膵臓癌患者4名から採取した。ヒト血液中のヌクレオソーム調製品を、Holdenrieder法に従い調製し(Holdenriederらの文献;2001)、ウマ血清中に連続希釈した。これら試料及び調製品を、本発明の方法により、ヌクレオソーム ER アダクトのアッセイを二重反復した。組織培養内で使用するために調製された、未希釈の(neat)市販ウマ血清も又、ヌクレオソーム又はヌクレオソームアダクトを含まない陰性の対照試料としてアッセイした。アッセイは、使用される検出抗体がエストロゲン受容体(ER)への結合を指向する以外は、前記実施例1の方法を使用して行った。対象健常者の平均結果+2標準偏差として算出されたカットオフを使用して、結腸癌試料は3名患者中2名、乳癌試料は6名患者中3名、肺癌試料は3名患者中2名、膵臓癌試料は4名患者中4名が、ヌクレオソーム ER アダクト陽性であった。結果は図11に示す。

10

【実施例 9】**【0145】**

使用する検出抗体がステロイドエストロゲンに結合指向性を示す以外は、前記実施例6の方法を使用して、ヌクレオソーム エストロゲン受容体 ステロイドエストロゲンELISAアッセイを行う。従って、このアッセイでは、追加的にステロイドホルモンを含むヌクレオソーム エストロゲン受容体アダクトのみが検出される。

【実施例 10】**【0146】**

アッセイは、有機溶媒に耐性のあるマイクロタイタープレート又はチューブ内で行われ、続いて、ウェル表面上で、抗ヌクレオソーム抗体がヌクレオソーム エストロゲン受容体アダクトを捕獲し、ウェルの液体内容物はデカントされ、捕獲されたアダクト中に存在するステロイドを溶解するためにジエチルエーテルが添加されること以外は、前記実施例と同様の方法に従って、ヌクレオソーム エストロゲン受容体 エストロゲンアダクトのELISAアッセイが行われる。添加されるエーテルは、別のウェル又はチューブに移されて、乾燥される。乾燥した抽出物は、アッセイ緩衝液に再溶解され、従来のエストロゲン分析用競合的免疫アッセイ法を使用してエストロゲン濃度が決定される。従って、このアッセイでは、追加的にエストロゲンを含むヌクレオソーム エストロゲン受容体アダクトのみが検出される。

20

【実施例 11】**【0147】**

使用するステロイド競合的免疫アッセイは、レチノイン酸に結合指向性を示す以外は、前記実施例10の方法を使用して、ヌクレオソーム レチノイン酸受容体 レチノイン酸のELISAアッセイを行う。従って、このアッセイでは、追加的にステロイドレチノイン酸を含むヌクレオソーム レチノイン酸受容体アダクトのみが検出される。

30

【実施例 12】**【0148】**

使用する固相被覆抗体は、5-メチルシチジンに結合指向性を示す以外は、前記実施例1~10記載のものに類似の、ヌクレオソームアダクトアッセイを実施する。従って、これらアッセイでは、追加的にメチル化DNAと会合している、ヌクレオソーム ホルモン受容体アダクト及びヌクレオソーム ホルモン受容体 ホルモン複合体アダクトのみを検出する。

40

【0149】

(参考文献)

【化 1】

Allen *et al*, A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*: 32(3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032, 2004

Bawden *et al*, Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005

Cao *et al*, Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in Polycomb-Group Silencing *SCIENCE* 298, 1039-1043, 2002

10

Dai *et al*, Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA. <http://www.jove.com/details.php?id=2593> doi: 10.3791/2593. *J Vis Exp*. 50 (2011).

Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-298, 2007

Feinberg and Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*: 301, 89–92, 1983

20

Fullgrabe *et al*, Histone onco-modifications. *Oncogene*: 30, 3391-3403, 2011

Gerlitz *et al*, The dynamics of HMG protein-chromatin interactions in living cells. *Biochem Cell Biol*, 87, 127-137, 2009

Grutzmann *et al*, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay. *PLoS ONE* 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008

Herranz and Esteller, DNA methylation and histone modifications in subjects with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*. 361:25-62, 2007

30

Hervouet *et al*, Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells *PLoS ONE* 5(6): e11333. doi:10.1371/journal.pone.0011333, 2010

Holdenrieder *et al*, Nucleosomes in serum of subjects with benign and malignant diseases. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114–120, 2001

*Holdenrieder *et al*, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death. *Clin Chem Lab Med*; 39(7), 596–605, 2001

40

Holdenrieder *et al*, Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005

Holdenrieder and Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1–24, 2009

Ricke and Bielinsky, Easy detection of chromatin binding proteins by the histone association assay. *Biol Proced Online*; 7(1), 60-69, 2005

Rodriguez-Paredes and Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nature Medicine*: 17(3), 330-339, 2011

Salgame *et al*, An ELISA for detection of apoptosis. *Nucleic Acids Research*, 25(3), 680-681, 1997

10

Sims *et al*, HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu. Rev. Immunol.* 28, 367-388, 2010

Stoetzer *et al*, Circulating nucleosomes and biomarkers of immunogenic cell death as predictive and prognostic markers in cancer patients undergoing cytotoxic therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 12(Suppl. 1): S217-S224, 2012

Tang *et al*, High-mobility Group Box 1 [HMGB1] and Cancer. *Biochim Biophys Acta.* 1799(1-2) 131, 2010

20

Urbonaviciute *et al*, Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1 – nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med*, 205(13), 3007-3018, 2008

Urbonaviciute and Voll, High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus. *J Internal Medicine*, 270, 309-318, 2011

van Nieuwenhuijze *et al*, Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*; 62: 10–14, 2003

30

Yoshida and Shimura, Isolation of nonhistone chromosomal protein from calf thymus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*; 263(3), 690-695, 1972

【 図 1 】

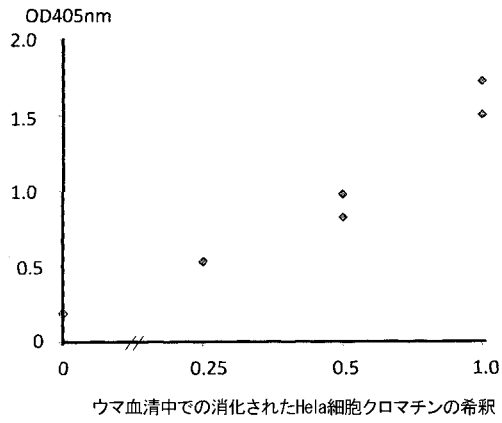


図 1

【 図 2 】

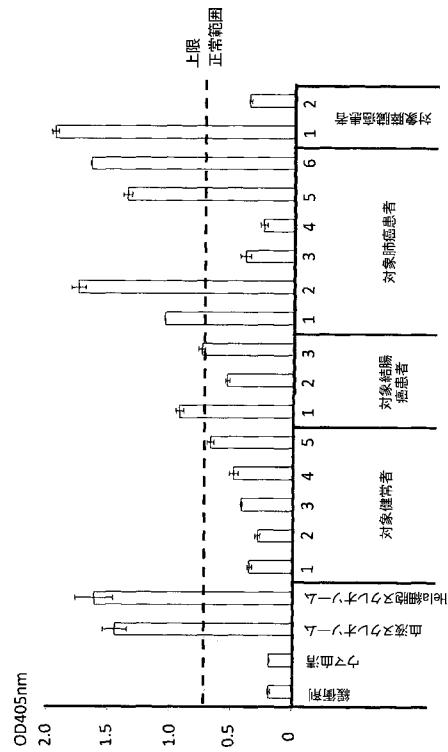


図 2

【 図 3 】

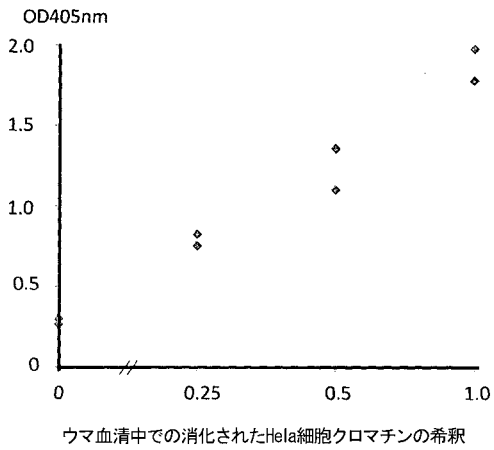


図 3

【 図 4 】

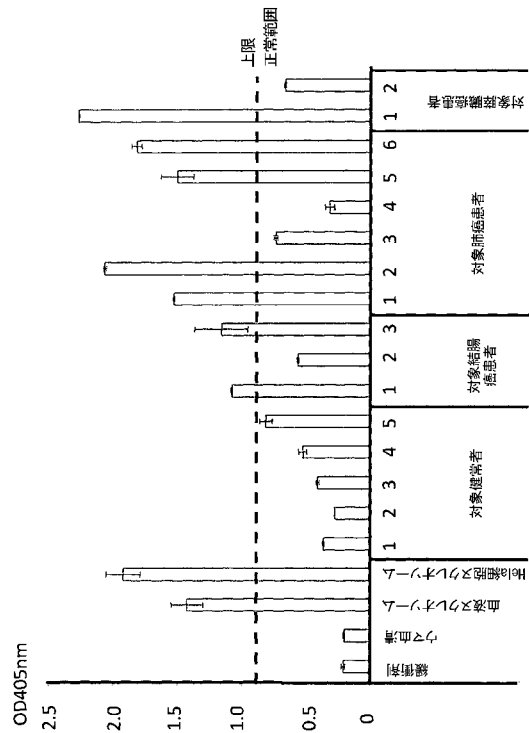


図 4

【 図 5 】

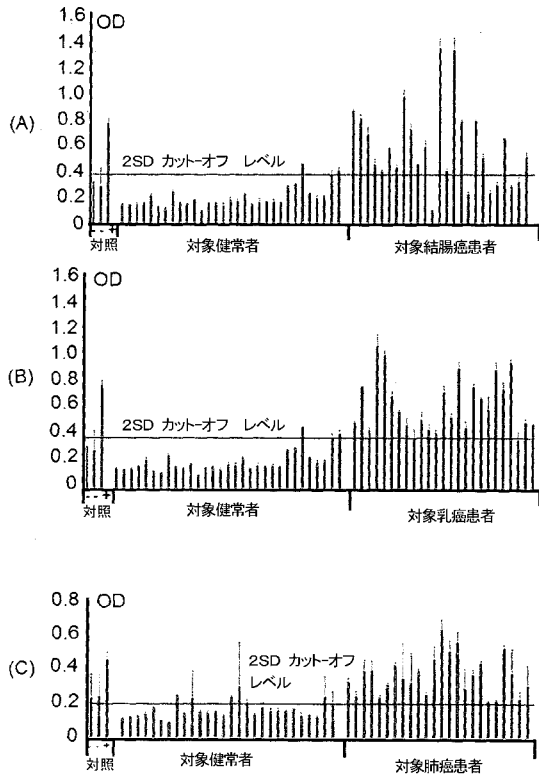


図 5

【 図 6 】

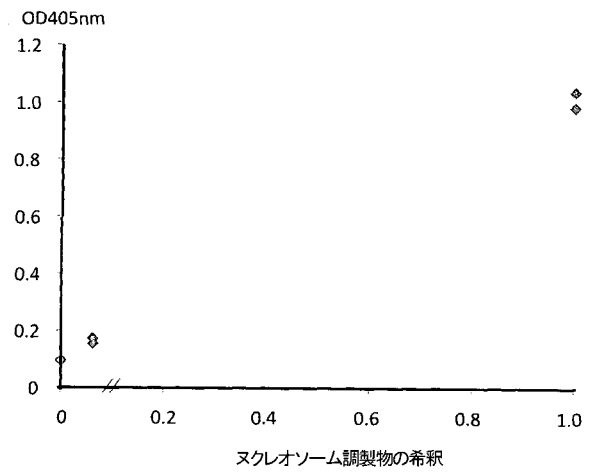


図 6

【 図 7 】

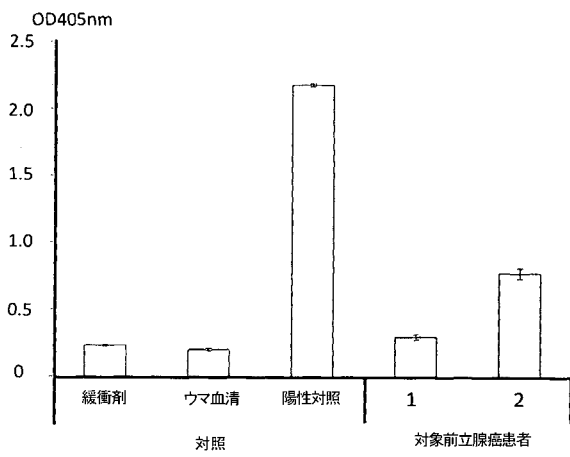


図 7

【 図 8 】

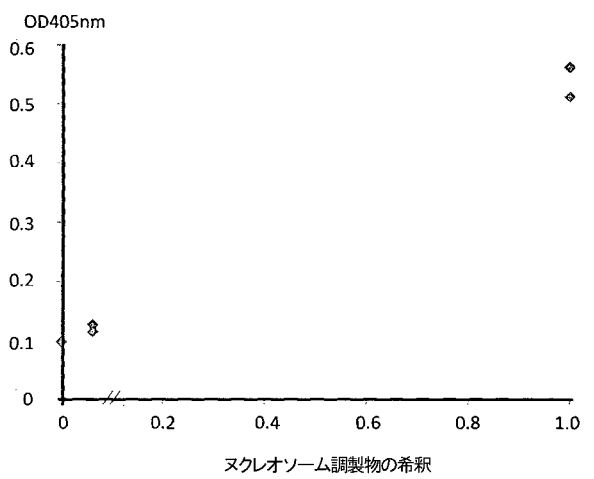


図 8

【 図 9 】

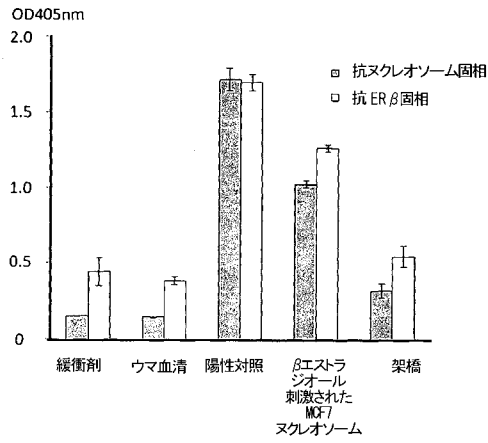


図 9

【 図 1 0 】

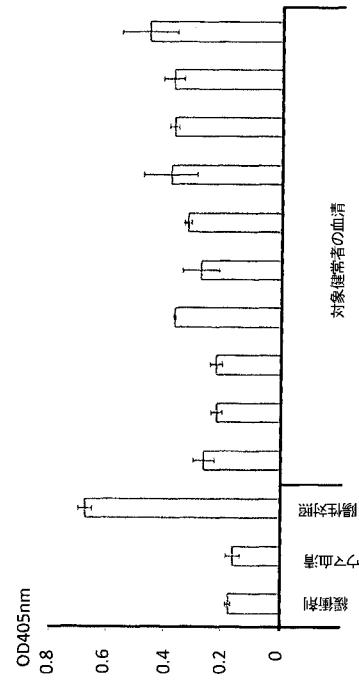


図 10

【 図 1 1 】

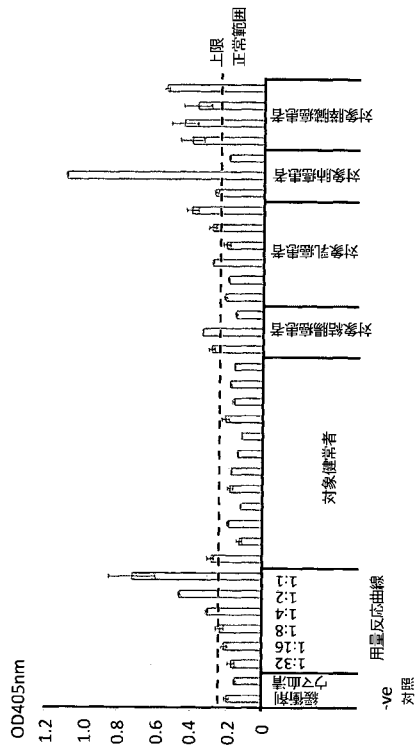


図 11

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/053057

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. URBOVICIUTE ET AL: "High-mobility group box 1 represents a potential marker of disease activity and novel therapeutic target in systemic lupus erythematosus", JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE, vol. 270, no. 4, 1 October 2011 (2011-10-01), pages 309-318, XP055053655, ISSN: 0954-6820, DOI: 10.1111/j.1365-2796.2011.02432.x cited in the application abstract	31
A	----- -/--	1-7
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 February 2013		Date of mailing of the international search report 10/07/2013
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Fleitmann, J

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/053057

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	V. URBONAVICIUTE ET AL: "Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE", JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 205, no. 13, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 3007-3018, XP055053902, ISSN: 0022-1007, DOI: 10.1084/jem.20081165	31
A	page 3008, right-hand column, paragraph 2 - page 3009, right-hand column, paragraph 1; figure 2	1-7
X	----- EP 1 668 368 A1 (CHROMA THERAPEUTICS LTD [GB]) 14 June 2006 (2006-06-14) paragraph [0083]; claim 1; example 1 paragraph [0033]	1,2,31
X	----- WO 2005/040814 A1 (CANCER REC TECH LTD [GB]; CALDAS CARLOS [GB]; OZDAG HILAL [GB]; BANNIS) 6 May 2005 (2005-05-06) page 4, line 5 - line 12; claim 15	1,2,31
X	----- J FÜLLGRABE ET AL: "Histone onco-modifications", ONCOGENE, vol. 30, no. 31, 4 August 2011 (2011-08-04), pages 3391-3403, XP055054538, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2011.121 abstract	1,2

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/GB2012/053057**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-7, 31(all partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2012/ 053057

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-7, 31(all partially)

Use of a nucleosome-protein adduct as a biomarker in blood for the diagnosis of cancer and a kit comprising a ligand for the protein in the adduct or component part thereof.

2-3. claims: 1-7, 31(all partially)

Use of a nucleosome-protein adduct as a biomarker in blood for the diagnosis of an autoimmune disease or inflammatory disease a kit comprising a ligand for the protein in the adduct.

4. claims: 8, 10-30(all partially)

A method for detecting the presence of a nucleosome-protein adduct in a sample which comprises the steps of claim 8 wherein the nucleosome-protein adduct includes HMGB1 and medical methods related thereto.

5-17. claims: 8, 10, 12-30(all partially)

A method for detecting the presence of a nucleosome-protein adduct in a sample which comprises the steps of claim 8 wherein the nucleosome-protein adduct includes a protein mentioned in claims 10,12-14 and medical methods related thereto.

18. claims: 9(completely); 10-30(partially)

A method for detecting the presence of a nucleosome adduct in a sample which comprises the steps of claim 9 and medical methods related thereto.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/053057

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1668368	A1	14-06-2006	AT 411525 T 15-10-2008
			DK 1668368 T3 23-02-2009
			EP 1668368 A1 14-06-2006
			ES 2315697 T3 01-04-2009
			SI 1668368 T1 30-04-2009
			US 2007160989 A1 12-07-2007
			WO 2005019826 A1 03-03-2005

WO 2005040814	A1	06-05-2005	NONE

フロントページの続き

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

(72)発明者 マーク エドワード エクレストン

英国 エヌダブリュー1 4 エスエヌ ロンドン パーク ロード 49 エイアンドビー ハノーバー ゲート マンションズ シーノオー シンガポール ポリション ピーティーイー リミテッド

(72)発明者 マリエレ ヘルゾグ

英国 エヌダブリュー1 4 エスエヌ ロンドン パーク ロード 49 エイアンドビー ハノーバー ゲート マンションズ シーノオー シンガポール ポリション ピーティーイー リミテッド

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA26 BB03 BB18 CA25 CA26 DA20 DA36 DA56 FB03

专利名称(译)	核小体加合物检测方法		
公开(公告)号	JP2015500478A	公开(公告)日	2015-01-05
申请号	JP2014545358	申请日	2012-12-07
申请(专利权)人(译)	新加坡意志私人有限公司		
[标]发明人	ジャコブビンセントミカレフ マークエドワードエクレストン マリエレヘルゾグ		
发明人	ジャコブ ビンセント ミカレフ マーク エドワード エクレストン マリエレ ヘルゾグ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/57496 G01N2800/52 G01N2800/56 C12Q1/6804 G01N33/57488 G01N33/6875 G01N33/574 G01N33/68 G01N2333/47		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/48.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA26 2G045/BB03 2G045/BB18 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA20 2G045 /DA36 2G045/DA56 2G045/FB03		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2011021040 2011-12-07 GB 61/568090 2011-12-07 US 2011021230 2011-12-12 GB		
其他公开文献	JP6263474B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及检测或测量核小体 - 蛋白质加合物存在的方法，以及这些测量用于检测和诊断疾病的用途。本发明还涉及鉴定用于检测和诊断疾病的核小体加合物生物标志物的方法，以及通过该方法鉴定的生物标志物。 点域1

