

(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2014-531573

(P2014-531573A)

(43) 公表日 平成26年11月27日(2014.11.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/68 (2006.01)	GO 1 N 33/68	2 G 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 46 頁)

(21) 出願番号	特願2014-527737 (P2014-527737)	(71) 出願人	514052210 シンガポール ポリション ピーティーイー 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
(86) (22) 出願日	平成24年8月31日 (2012.8.31)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成26年4月25日 (2014.4.25)	(72) 発明者	ジャコブ ピンセント ミカレフ 英国 ロンドン エヌダブリュー1 4エ スエヌ 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
(86) 国際出願番号	PCT/GB2012/052128	Fターム(参考)	2G045 AA25 CA25 CA26 DA12 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W02013/030577		
(87) 国際公開日	平成25年3月7日 (2013.3.7)		
(31) 優先権主張番号	1115095.0		
(32) 優先日	平成23年9月1日 (2011.9.1)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		
(31) 優先権主張番号	61/530, 295		
(32) 優先日	平成23年9月1日 (2011.9.1)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】ヌクレオチド含有ヌクレオソーム検出法

(57) 【要約】

本発明は、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソーム及び特定のヌクレオチドを含むヌクレオソーム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のヌクレオソームに会合されたヌクレオチド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】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌、心筋症、全身性紅斑性狼瘡、大腸炎、慢性閉塞性肺疾患、クローン病及び関節リウマチの診断用バイオマーカーとして使用するための、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有する、無細胞系ヌクレオソーム。

【請求項 2】

前記ヌクレオソームが、モノヌクレオソーム又はオリゴヌクレオソームである、請求項1記載の使用のためのヌクレオソーム。

【請求項 3】

前記DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有する無細胞系ヌクレオソームが、血液試料中で測定される、請求項1又は2記載の使用のためのヌクレオソーム。

10

【請求項 4】

前記癌が、膀胱、乳房、結腸、頸部、食道、腎臓、大腸、肺、口腔、卵巣、膵臓、前立腺、直腸、皮膚又は胃の癌である、請求項1～3のいずれか一項記載の使用のためのヌクレオソーム。

【請求項 5】

前記癌が、結腸、肺、口腔又は膵臓の癌である、請求項4記載の使用のためのヌクレオソーム。

【請求項 6】

試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

20

(i) 該試料を、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドに結合する結合剤と接触させる工程；

(ii) 該結合剤の、該試料中のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドへの結合を検出又は定量する工程；並びに

(iii) 該試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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 7】

試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

30

(i) 該試料を、ヌクレオソーム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、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドへの結合を検出又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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 8】

40

試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

(i) 該試料を、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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への結合を検出又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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；

50

を含む、前記方法。

【請求項 9】

前記DNA塩基が、ヌクレオソームそれ自身を試験するために、全ての又はほとんどのヌクレオソームにおいて生じる共通塩基である、請求項6~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記DNA塩基が、無細胞系DNAそれ自身を試験するために、全ての又はほとんどのヌクレオソームにおいて生じる共通塩基である、請求項6~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項 11】

前記DNA塩基が、5-メチルシトシン又は5-ヒドロキシメチルシトシンなどのシトシンである、請求項1~10のいずれか一項記載の使用又は方法。

10

【請求項 12】

前記結合剤が、抗体である、請求項6~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

前記試料が、生物学的液体である、請求項6~12のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

前記試料が、血液又は血清又は血漿である、請求項6~13のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

細胞中の、請求項6~14のいずれか一項記載のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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；

20

(ii)該クロマチンを消化するか、音波処理するか又は別様に破壊し、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)請求項6~14のいずれか一項記載の方法に従い、該ヌクレオソーム中のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドの存在を検出又は測定する工程；

を含む、前記方法。

【請求項 16】

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)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；並びに

30

(ii)該対象の疾患状態を同定するために検出された該ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドレベルを使用する工程；

を含む、前記方法。

【請求項 17】

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)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象に関する好適な治療の選択のためのパラメータとして、検出された該ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドレベルを使用する工程；

を含む、前記方法。

40

【請求項 18】

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)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；

(ii)1回以上にわたって該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの該検出又は該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、検出された該ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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 19】

50

前記ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドが、測定のパネルの一つとして検出又は測定される、請求項16～18のいずれか一項記載の方法。

【請求項20】

実際の又は推定される癌、良性腫瘍、炎症疾患、自己免疫疾患、子宮内膜症、感染症、敗血症、脳卒中又は心筋梗塞を伴う対象において使用するための、請求項16～19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

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DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドバイオマーカーを同定する方法であって：

(i) 該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；並びに

(iii) DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドが、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、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、前記方法。

【請求項22】

請求項21記載の方法により同定されたバイオマーカー。

【請求項23】

DNA塩基、ヌクレオチド若しくはヌクレオシド若しくはそれらの部分成分、又はDNA塩基、ヌクレオチド若しくは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、請求項6～21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と一緒に備える、ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドの検出のためのキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、モノヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソーム及び特定のヌクレオチドを含有するヌクレオソーム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に会合されたヌクレオチド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差次的発現によるものである。差次的遺伝子発現の制御は、完全には理解されていないが、その基本的機構は、ユークロマチン又はヘテロ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、メチル化、ヒドロキシメチル化及び他のDNAの修飾、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を含む、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。

【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のおよそ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、「ピ

10

20

30

40

50

ーズ-オン-ストリング」に似ていると言われることの多い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(open)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)。

【0004】

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、コアヒストンテールで起こり、一般的な修飾は、リジン残基のアセチル化、メチル化又はユビキチン化に加え、アルギニン残基のメチル化及びセリン残基のリン酸化及び多くのその他の修飾を含む。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わかっている(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., Baxeivanis, 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。

【0005】

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。通常の下条件下で、健康対象において認められる循環ヌクレオソームのレベルは、低いことが報告されている。多くの癌、自己免疫疾患、炎症状態、脳卒中及び心筋梗塞を含む様々な状態の対象において、上昇したレベルが認められる(Holdenreider及びStieberの文献、2009)。

【0006】

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。これらのアッセイを使用し、当該技術分野の研究者は、血清中のヌクレオソームのレベルは、同じ患者から採取した血漿試料中よりも(最大一桁だけ)より高いことを報告している。これはまた、PCRによる、生成されたDNAの血清及び血漿の測定値についても当てはまる(Holdenriederらの文献、2005)。このこと理由は不明であるが、前記著者らは、これは凝固過程におけるDNAの追加放出によるものであろうと仮説を立てている。しかし本発明者らは、現在の技術のヌクレオソームELISA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。リアルタイムPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)により測定された循環無細胞系ヌクレオソームレベルと循環DNAレベルのELISA結果の間の相関係数は、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)。

【 0 0 0 7 】

現在のヌクレオソーム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 Nieuwenhuijzeらの文献、2003)、且つ血清及び血漿中の循環無細胞系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無細胞系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、これは健常対象の正常範囲内であった。しかし悪性腫瘍を伴う患者は、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患者の一部は、健常対象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上昇したヌクレオソームレベル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、臨床上、癌のバイオマーカーとしては使用されない(Holdenrieder及びStieberの文献、2009)。驚くべきことに、本発明者らは、これらの現在の技術のヌクレオソームELISA法により測定されたその循環ヌクレオソームレベルが低いか又は検出不能である多くの癌対象は、実際には、循環無細胞系ヌクレオソームの上昇したレベルを有することを示した。本発明者らは、現在の技術のELISA法により検出されないヌクレオソームを検出するヌクレオソームに関する新規ELISA法をデザインし且つ明らかにしている。

10

20

【 0 0 0 8 】

ヒストンPTM検出のためのELISA法もまた、当該技術分野において公知である。遊離のヒストンタンパク質(ヌクレオソーム複合体中の他のヒストン及びDNAに結合していない)中のPTM検出のためのELISA法は、細胞溶解液から通常酸抽出により抽出されたヒストンにおけるPTMの検出のために使用される。循環無細胞系ヌクレオソーム中のPTMの検出のための免疫検定が、報告されている(Bawdenらの文献、2005)。マイクロタイターウェルに直接コートされた精製されたヌクレオソームにおけるヒストンPTMのELISA検出の方法が、最近報告された(Daiらの文献、2011)。この方法において、培養細胞からのクロマチン抽出物の消化により得られたヌクレオソームは、マイクロタイターウェルへ直接コートされ、且つ抗-PTM抗体と反応させられる。この方法は、比較的純粋なヌクレオソーム試料を必要とし、且つ血液、血漿又は血清などの複合生物学的媒体中のヒストンPTMの直接測定には適していないことは、当業者には明らかであろう。

30

【 0 0 0 9 】

特定のDNA配列に会合された無細胞系ヌクレオソーム内のヒストンPTM(H3K9Me、リジン残基K9でモノメチル化されたヒストンH3)の検出のための改変クロマチン免疫沈降(ChIP)法が、血漿中において報告されている。配列特異的ヒストンメチル化のレベルは、循環ヌクレオソームの濃度とは無関係であることが報告された(Deligezerらの文献、2008)。

【 0 0 1 0 】

ヒストン変種(ヒストンアイソフォームとしても公知)は、遺伝子発現のエピジェネティック調節因子であることがわかっている(Herranz及びEstellerの文献、2007)。ヒストン変種は、特定の変種をコードしている遺伝子のノックダウン試験(例えば、RNAiノックダウンを使用)、クロマチン免疫沈降、アミノ酸の安定した同位体標識及び定量的質量分析プロテオミクス、免疫組織化学及びウェスタンブロットを含む様々な技術を使用し、インビボ及びインビトロにおいて研究されている(Whittleらの文献、2008；Boulardらの文献、2010；Spornらの文献、2009；Kapoorらの文献、2010；Zeeらの文献、2010；Huaらの文献、2008)。

40

【 0 0 1 1 】

肺癌、乳癌及びメラノーマと診断された対象から手術時に摘出された又は生検による組織試料中のヒストン変種発現の免疫組織化学試験が、報告されている。これらの免疫組織

50

化学試験は、切除された癌組織試料中のヒストンmacroH2A(mH2A)変種及びH2AZ変種の染色は、これらの癌の予後判定で適用され得ることを報告している(Spornらの文献、2009、Huaらの文献、2008、Kapoorらの文献、2010)。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。免疫組織化学法の別の欠点は、通常生検又は組織切除が行われる前に、疾患の理にかなった予測が既に存在しなければならないので、これらは早期診断又はスクリーニング診断には適していないことである。最小の侵襲性の血液ELISA試験は、より広い範囲の適用に適しており、且つこれらの欠点を克服し、患者にとって好ましいことに加え、医療提供者にとってより高速、より低コスト、及びより高処理量であるであろう。

【0012】

しかし、無細胞系ヌクレオソーム内の無細胞系ヒストン変種は、血液又は他の媒体中では測定されていない。血液中の無細胞系ヌクレオソーム内のヒストン変種の存在又は非存在に関する試験は、報告されていない。現在、無傷の無細胞系ヌクレオソーム内のヒストン変種の検出又は測定の方法は存在せず、そのような測定は示唆も企図もされていない。

【0013】

ヌクレオソーム位置及びヌクレオソーム構造(構成的ヒストンタンパク質変種及びPTM構造の両方に関して)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、DNAのシトシンメチル化状態を含む、DNAヌクレオチドへの修飾により媒介される。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、一般から当該技術分野において公知である。5-メチルシトシンの形でメチル化されたDNAは、シトシンヌクレオチドがグアニンヌクレオチドの隣にあるDNA配列中の位置において起こることが報告されている。これらの位置は短縮して「CpG」と称される。脊椎動物においてCpG位置の70%よりも多くが、メチル化されていることが報告されている(Penningsらの文献、2005)。CpG部位を高い割合で含むゲノムの領域は、「CpGアイランド」と称されることが多く、ヒト遺伝子プロモーター配列のおよそ60%は、そのようなCpGアイランドに関連している(Rodriguez-Paredes及びEstellerの文献、2011)。活性遺伝子において、これらのCpGアイランドは、一般に低メチル化されている。遺伝子プロモーター配列のメチル化は、安定した遺伝子不活化に関連している。DNAメチル化はまた通常、Alu反復エレメントを含む反復エレメント及び長い散在性ヌクレオチドエレメントにおいて起こる(Herranz及びEstellarの文献、2007; Allenらの文献、2004)。

【0014】

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が報告されている。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; Estellerの文献、2007)。

【0015】

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亜硫酸水素塩脱アミノ化により検出され、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DNA一次配列変化に繋がる(Allenらの文献、2004)。

【0016】

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。細胞

10

20

30

40

50

又は他の媒体から抽出されたDNAの全般的メチル化の検出に関する数多くの方法が報告されており、これは、制限消化及び最短距離(nearest-neighbour)分析、クロルアセトアルデヒドを使用する蛍光アッセイ、非メチル化CpGの量を算出するためのトリチウム-標識されたS-アデノシルメチオニンと組合せてDNAメチル基転移酵素を使用する全てのCpG部位のメチル化によるインパース決定、並びに高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、又は液体クロマトグラフィーとそれに続く質量分析による分析のためのDNAの単独ヌクレオチドへの消化を含む。これらの方法の欠点は、これらは労働集約的であること、及び/又は品質の良い抽出されたDNAを大量に必要とすることである(Allenらの文献、2004)。亜硫酸水素塩脱アミノ化が関与するPCRベースの方法は、大量のDNAの必要性は克服しているが、5-メチルシトシンの全ゲノム含量の指標として、特定のゲノム領域、典型的には反復配列を増幅しなければならない(Allenらの文献、2004)。全般的DNAメチル化測定に関するこれらの方法は、様々な細胞及び組織から抽出されたDNAを試験するために使用されている。一部の研究者は、最小の侵襲的様式で入手することがより容易である全血中の白血球から抽出されたDNAを研究した(Mooreらの文献、2008; Ting Hsiungらの文献、2007; Mansourらの文献、2010)。質量分析を伴う液体クロマトグラフィーは、全般的DNAメチル化測定に関する最良の標準であると考えられるが、これは経費がかかり、且つそのDNAは、分析前に、単独のヌクレオチドレベルへ消化されなければならない(Vasserらの文献、2009)。

10

【 0 0 1 7 】

全般的DNAメチル化を概算する最新の方法は、組織から抽出された加水分解されたDNAの質量分析を伴う超高速液体クロマトグラフィー(Zhangらの文献、2011)、及びメチル化-特異的デジタルシーケンシング(MSDS)法(Ogoshiらの文献、2011)を含む。全般的DNAメチル化に関する古典的競合免疫検定(更には全般的5-ヒドロキシメチルシトシンメチル化に関する類似のアッセイ)が、説明されている。この方法において、細胞又は組織から抽出されたDNAは、5-メチル化されたシチジン複合体によりコートされたマイクロタイターウェルへ添加され、抗-5-メチルシチジン抗体が添加され、且つコートされた5-メチルシチジン複合体と抽出された試料中のメチル化されたDNAの間の抗体結合の分布が、既知の標準の分布と比較され、該試料中に存在する全般的DNAメチル化レベルが概算される(Cell Biolabs社の文献、2011)。別の免疫検定のような方法において、組織から又は血漿若しくは血清試料から抽出されたDNAは、マイクロタイターウェルへコートされ、且つメチル化されたDNAが、抗-5-メチルシトシン抗体を用いて検出される(Vasserらの文献、2009; Epigentek社の文献、2009)。これらの方法の欠点は、これらは、DNAからの全てのヌクレオソーム及びクロマチン構造の変性及び除去に関与するDNAの抽出を必要とすることである。従ってこれらは、ヌクレオソームに結合されたヌクレオチドを測定することはできず、且つ例えば; DNA抽出工程を伴わない、組織溶解液、血液、血漿又は血清などの生物学的液体中の全般的DNAメチル化の直接測定には適していない。

20

30

【 0 0 1 8 】

同じくDNA中のシトシン塩基の5-ヒドロキシメチル修飾も、報告されている。5-ヒドロキシメチル化の役割は、まだ十分に理解されていないが、これは遺伝子調節に関与しているように思われる(Stroudらの文献、2011)。

40

【 0 0 1 9 】

全般的DNAメチル化の検出のための現在の方法は、DNAの抽出又は精製を伴い、迅速で、高処理量で、低コストの、最小の侵襲性の診断方法には適していない。同様に、他の修飾された塩基又は稀な塩基(例えば、ウラシル、イノシン、キサントシン、ヒポキサントシン)に関するDNAの分析は、実質的に純粋な又は抽出されたDNAの分析によってのみ調べることができる。そのような分析は、組織溶解液、血液、血漿又は血清などの、複合生物学的媒体においては直接実行することができない。

【 0 0 2 0 】

5-メチルシトシン又は任意の他の特定のヌクレオチド又は修飾されたヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームは、血液又は任意の他の媒体中では測定されていない。血

50

液中の特定のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームの存在又は非存在に関する試験は、報告されていない。特定のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームに関するアッセイは、示唆も企図もされていない。現在、無細胞系ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドの検出又は測定に関する方法は存在しない。

【0021】

本発明者らはここで、抽出せずに生物学的試料中の、例えば5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンを含むヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを直接概算する単純な免疫検定法を報告する。驚くべきことに、本発明者らは、その中のヌクレオソームが現在の技術のELISA法では検出されない血液試料中で、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを検出することができることを示している。

10

【発明の概要】

【0022】

(発明の概要)

本発明の第一の態様に従い、癌、心筋症、全身性紅斑性狼瘡、大腸炎、慢性閉塞性肺疾患、クローン病及び関節リウマチの診断用バイオマーカーとして使用するための、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有する無細胞系ヌクレオソームが、提供される。

【0023】

本発明の第二の態様に従い、試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

(i) 該試料を、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドに結合する結合剤 (binding agent) と接触させる工程；

20

(ii) 該結合剤の、該試料中のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドへの結合を検出又は定量する工程；並びに

(iii) 該試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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；

を含む方法が、提供される。

【0024】

本発明の第三の態様に従い、試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

(i) 該試料を、ヌクレオソームに結合する第一の結合剤と接触させる工程；

30

(ii) 該ヌクレオソーム又は試料を、該DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドへの結合を検出又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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；

を含む方法が、提供される。

【0025】

本発明の第四の態様に従い、試料中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームの存在を検出する方法であって：

40

(i) 該試料を、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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への結合を検出又は定量する工程；並びに

(iv) 該試料中のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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；

を含む方法が、提供される。

【0026】

50

本発明の更なる態様に従い、細胞中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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するか、音波処理するか又は別様に破壊し、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)本発明の方法に従い、該ヌクレオソーム内のDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド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。

【0027】

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、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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に会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドのレベルを使用する工程；

を含む方法が、提供される。

【0028】

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)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；並びに

(ii)該対象に関する好適な治療の選択のためのパラメータとして、検出されたヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドのレベルを使用する工程；

を含む方法が、提供される。

【0029】

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)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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に会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドのレベルの何らかの変化を使用する工程；

を含む方法が、提供される。

【0030】

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DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドバイオマーカーを同定する方法であって：

(i)該対象の体液中の、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソーム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、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有するヌクレオソームを検出又は測定する工程；並びに

(iii)DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドが、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、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。

【0031】

本発明の更なる態様に従い、前記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。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明の更なる態様に従い、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシド若しくはそれらの部分成分、又は該DNA塩基、ヌクレオチド又は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(binder)を、該キットの使用説明書と一緒に備える、ヌクレオソームに会合されたDNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドの検出のためのキットが、提供される。

【図面の簡単な説明】

【0033】

(図面の簡単な説明)

【図1】図1は、ウシ血清へ希釈された、MCF7細胞から抽出された架橋され消化されたクロマチン内の無細胞系ヌクレオソーム中の5-メチルシトシンでメチル化されたDNAの検出のための、ELISA用量反応曲線である。

10

【図2】図2は、ウシ血清へ希釈された、A375細胞から抽出された架橋され消化されたクロマチン内の無細胞系ヌクレオソーム中の5-ヒドロキシメチルシトシンでメチル化されたDNAの検出のための、ELISA用量反応曲線である。

【図3】図3は、現在の技術のヌクレオソームELISA法を使用し、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出されたヌクレオソームレベルである。

【図4】図4は、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出された、ヒストン変種mH2A1.1の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図5】図5は、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出された、ヒストン変種mH2A2の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

20

【図6】図6は、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出された、ヒストン変種H2AZの無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図7】図7は、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出された、ヒストン修飾P-H2AX(Ser139)の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図8】図8は、本発明のELISAを使用し、健常志願者20名から採取した血清試料及びEDTA血漿試料について検出された、5-メチルシトシンでメチル化されたDNAの無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図9】図9は、本発明のELISAを使用し、健常志願者20名から採取した血清試料について検出された、5-ヒドロキシメチルシトシンでメチル化されたDNAの無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

30

【図10】図10は、結腸癌対象3名から採取したEDTA血漿試料について検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図11】図11は、肺癌対象13名から採取したEDTA血漿試料について検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図12】図12は、膵臓癌対象2名から採取したEDTA血漿試料について検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図13】図13は、口腔癌対象1名から採取したEDTA血漿試料について検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図14】図14は、本発明のELISA法を使用し検出されたヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンでメチル化されたDNAレベルの割合として規準化された、4種の異なる癌疾患から採取したEDTA血漿試料について検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。*Holdenriederらの文献(2001)の方法により作製された健常志願者由来のヌクレオソームを含有する試料に関する規準化されたレベルを、比較のために示している(mH2A2及び5-ヒドロキシメチルシトシンは、この試料については測定しなかった)。

40

【図15】図15は、本発明のELISA法を使用し、健常志願者から採取したEDTA血漿試料、クエン酸血漿試料及びヘパリン血漿試料中で検出された、5-メチルシトシン(5mc)、mH2A1.1、H2AZ及びP-H2AX(Ser139)の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルである。

【図16】図16は、本発明のELISA法を使用し、健常志願者3名及び結腸癌対象10名から採

50

取した血清試料について検出された、無細胞系ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルである。

【図17】図17は、健常志願者13名及び癌患者55名から採取したEDTA血漿試料について検出された、無細胞系ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルである。健常試料の平均値 + 該平均値の1又は2標準偏差として規定されたカットオフポイントが、示されている。

【図18】図18は、健常志願者10名及び癌患者61名から採取したEDTA血漿試料について検出された、無細胞系ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルである。健常試料の平均値 + 該平均値の2標準偏差として規定されたカットオフポイントが、示されている。

【図19】図19は、疾患の腫瘍サイズの増大、病期、及び結節顕在化による、肺癌及び結腸癌患者から採取したEDTA血漿試料について検出された、無細胞系ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルである。

【図20】図20は、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシン(5mc)でメチル化されたDNAレベルの割合として規準化され、且つ健常対象11名において認められた平均割合に対して表現された、10種の異なる癌疾患から採取したEDTA血漿試料に関する、本発明のELISA法を使用し検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルの平均である。

【図21】図21は、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシン(5mc)でメチル化されたDNAレベルの割合として規準化され、且つ健常対象11名において認められた平均割合に対して表現された、心筋症患者2名、全身性紅斑性狼瘡(狼瘡)患者10名、潰瘍性大腸炎患者12名、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者10名、クローン病患者8名及び関節リウマチ(RA)患者10名から採取したEDTA血漿試料について、本発明のELISA法を使用し検出された、ヌクレオチド及びヒストン型の無細胞系ヌクレオソームに会合されたレベルの平均である。

【発明を実施するための形態】

【0034】

(発明の詳細な説明)

本発明の第一の態様に従い、癌、心筋症、全身性紅斑性狼瘡、大腸炎、慢性閉塞性肺疾患、クローン病及び関節リウマチの診断用バイオマーカーとしての使用するための、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドを含有する無細胞系ヌクレオソームが提供される。

一実施態様において、前記ヌクレオソームは、モノヌクレオソーム又はオリゴヌクレオソームである。

【0035】

言及され得る本発明の一つの特定の態様に従い、癌の診断用バイオマーカーとしての、DNA塩基、ヌクレオチド又はヌクレオシドの使用が提供される。

一実施態様において、前記癌は、膀胱、乳房、結腸、頸部、食道、腎臓、大腸、肺、口腔、卵巣、膵臓、前立腺、直腸、皮膚又は胃の癌である。言及され得る一つの特定の実施態様において、癌は、結腸、肺、口腔又は膵臓の癌である。

【0036】

本発明者らは、DNA塩基5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンを含有するヌクレオソームを検出及び測定するためのELISA試験を開発した。本発明者らは、これらのアッセイの捕獲抗体として抗-ヒストン抗体を、好適な特異的抗-ヌクレオチド抗体と組合せて使用する。本発明者らは、特異的ヌクレオチドを含有するヌクレオソームは、癌の対象から採取した血液試料中で測定することができ、且つ非侵襲性の又は最小の侵襲性のバイオマーカーとしての使用で識別することを示すために、このアッセイを使用する。罹患対象から採取された血清試料及び血漿試料中で検出されたヌクレオソームに会合されたDNA 5-メチルシトシンのレベルは、他のヌクレオソームエピトープと比べ、健常対象由来の試料中で検出されたレベルとは異なる。加えて、異なる疾患を伴う対象から採取した試料中のヌクレオソーム内に検出されたヌクレオチドレベルのパターンは、異なることが認められ、従って特にヌクレオソームに会合されたヌクレオチドパターンが、異なるヒスト

10

20

30

40

50

ン変種及びヒストン修飾を含むヌクレオソームについて決定されたパターンと組合せて試験された場合に、疾患の鑑別診断が可能である。異なる又は追加のヌクレオチドを含有するヌクレオソームに関する試験の包含は、恐らくそのようなパターンを使用する鑑別診断の識別を改善するであろうことは、当業者には明らかであろう。

【0037】

現在の技術の方法を使用し健常対象において認められたヌクレオソームのレベルを調べるために、本発明者らは、健常対象20名から採取した血清試料及び血漿試料中のヌクレオソームを測定した。現在の技術の両方法は、健常対象から採取した血清試料中で、血漿試料中よりも、より高いシグナルを生じた。これらの結果は、図3に示している。このことは、ヌクレオソームレベルは、血漿中よりも血清中でより高いという公開されたデータと一致する(*Holdenriederらの文献、2001)。

10

【0038】

本発明の方法を使用し、健常対象において認められたヌクレオソームのレベルを調べるために、本発明者らは、健常対象20名の血清中及び健常ウシ血清中の、修飾されたヌクレオチド5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームを測定した。これらの血清の結果は、健常対象20名全てについて低いか又は検出不能であった。本発明者らはまた、健常対象20名から採取されたEDTA血漿試料中の修飾されたヌクレオチド5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームも測定し、驚くべきことに、より高いシグナルが認められた。図8に示したように、修飾されたヌクレオチド5-メチルシトシンを含有する無細胞系ヌクレオソームの高いレベルが、健常ヒトEDTA血漿中で本発明の方法により検出されたが、健常ヒト血清中ではより低いレベルが検出された。図4~9は、他のヌクレオソーム構造について類似した結果が得られたことを示している。この知見は予想外であり、且つ公開された結果(*Holdenriederらの文献、2001)及び現在の技術のヌクレオソームELISA法に関して本発明者らが認めた結果の両方と異なる。従って驚くべきことに、本発明の方法は、血清試料及びEDTA血漿試料中に生じるヌクレオソームの相対レベルについて、現在の技術の方法とは反対の結果を生じる。

20

【0039】

本発明者らは、ヌクレオソーム構造は、収集され得る血漿の様々な一般型の全てにおいて検出可能であるかどうかを調べた。本発明者らは、無細胞系ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンの高いレベルが、EDTA血漿中で本発明の方法により検出可能であり、且つ健常対象から採取したクエン酸血漿中でより低い程度であること、しかしヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンは、健常対象から採取したほとんどの(5中3)ヘパリン血漿試料中において、緩衝液又はウマ血清バックグラウンドシグナルよりも低いか又は検出不能であることを認めた。これらの結果は、図15に示している。まとめると、無細胞系ヌクレオソームは、本発明の方法を使用し、健常対象から採取したほとんど又は全てのEDTA血漿試料及びクエン酸血漿試料中で、比較的高濃度で認められるが、健常対象から採取した大半のヘパリン血漿試料又は血清試料中では、低いか又は存在しない。従って、試料型の正確な選択が、様々な適用にとって重要であることは明白である。

30

【0040】

本発明者らは、特定のヌクレオチド構造を含有する無細胞系ヌクレオソームの検出のための試料選択には、いくつかのパラメータが関与していることを示している。これらは、一般に健常対象から採取した血清試料及びヘパリン血漿試料中に存在する無細胞系ヌクレオソームの低いレベル、一般に健常対象から採取したEDTA及びクエン酸血漿試料中に存在するより高いレベル、無細胞系ヌクレオソームを含有する血清試料は、血餅からの血清の分離後のEDTA添加により安定化されるべきであるという推奨(*Holdenreiderらの文献、2001)、並びに血清サンプリングプロトコルを含む。他の安定化剤(例えば、プロテアーゼインヒビター)を使用してもよい。可能であるならば、本発明者らは、静脈穿刺(venepuncture)の1時間以内に遠心分離し、その後10mM EDTAを添加し、試料を凍結した、血清試料を使用した。

40

【0041】

50

臨床試料に関する血液試料型の選択は、特定の試験に関する最適な臨床の識別を基に行われなければならない。健常対象の血清中の本発明の方法による一貫して低いヌクレオソームレベルという本発明者らの知見に従い、本発明者らは、癌対象から採取した血清試料中のヌクレオチド5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームを測定した。図16に示したように、結腸癌試料について、最大100%の臨床感受性が、観察された。

【0042】

本発明者らはまた、様々な疾患を伴う対象から採取したEDTA血漿試料中の、ヌクレオチド5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシン並びに他のヌクレオソーム構造を含有する無細胞系ヌクレオソームの相対レベルを測定した。無細胞系ヌクレオソームのレベルは、健常対象及び罹患対象の両方から採取されたEDTA血漿試料中で高く、従ってEDTA血漿試料は、恐らく罹患対象と健常対象の感度の識別のための最良の試料選択であるように見えない。しかし本発明者らは、循環無細胞系ヌクレオソームのレベル及び組成は、異なるヌクレオチドを含有するヌクレオソーム(更には他のヌクレオソーム構造)の相対レベルに関して、罹患個体と健常個体の間で変動し、且つ異なる疾患間でも変動することを示している。従って本発明者らは、最初に、(i)高レベルの循環ヌクレオソームは、健常及び罹患の両対象から採取された全ての又はほとんどのEDTA血漿試料中に存在するが、これは全ての血液試料型には当てはまらないこと；並びに、同じく、(ii)驚くべきことに、疾患の検出及び疾患型の識別は、それにもかかわらず罹患対象及び健常対象の血漿中に存在するヌクレオソーム構造の1種以上の相対型のレベル及び構造プロファイルを基にした、これらのEDTA血漿ヌクレオソームの分析により行われ得ることの両方を報告する。

10

20

【0043】

本発明者らは、健常対象、並びに各々55名及び62名の癌対象からなる2つの実験において様々な癌型を伴う対象117名から採取したEDTA血漿中の無細胞系ヌクレオソームを測定した。全体で癌試料の78%(117中91)が、健常対象に関する結果の平均+該平均の2標準偏差のカットオフレベルを使い、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンに関する本発明の方法を使用し、癌について陽性と正確に同定された。

【0044】

これらの2つの実験の第一において、本発明者らは、健常対象13名、並びに胃、大腸、直腸、肺(小細胞癌及び様々な非小細胞癌)、乳房、卵巣、膵臓、前立腺、腎臓の癌及び様々な口腔癌(口腔、口蓋、咽頭及び喉頭)を伴う対象55名から採取したEDTA血漿中の無細胞系ヌクレオソームを測定した。健常対象由来の13試料全て及び癌患者は、ヌクレオソームについて陽性であった。しかし、癌対象から採取された試料中で検出されたレベルは、健常対象由来の試料中で認められたレベルよりもより高く、且つこれらの結果は、健常対象及び癌対象は識別できることを示した。例えば、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンに関する、平均±該平均の2標準偏差としてOD項目で計算された正常範囲は、0~1.41であった。このカットオフ値を使用し、13種全ての健常試料は陰性であり、且つ55種の癌試料中30種は陽性であり(全般的臨床感受性55%)、これは胃38%(8中3)、大腸60%(5中3)、直腸33%(3中1)、小細胞肺33%(6中2)、非小細胞肺64%(14中9)、乳房33%(6中2)、卵巣100%(1中1)、膵臓100%(1中1)、前立腺33%(6中2)、腎臓100%(1中1)及び口腔60%(5中3)の癌試料を含んだ。これらの結果は、図17に示している。

30

40

【0045】

同様に、ヌクレオソームに会合されたH2AZアッセイの正常範囲は、0~0.95であった。このカットオフレベル0.95を使用し；13名の健常対象全ては、上昇したヌクレオソームH2AZレベルに関して陰性であった。対照的に、上昇したヌクレオソームH2AZレベルに関する陽性結果が、癌試料の84%(55中46)で認められ(全般的臨床感受性84%)、これは胃100%(8中8)、大腸100%(5中5)、直腸67%(3中2)、小細胞肺83%(6中5)、非小細胞肺79%(14中1)、乳房50%(6中3)、卵巣100%(1中1)、膵臓100%(1中1)、前立腺80%(5中4)、腎臓100%(1中1)及び口腔100%(5中5)の癌試料を含んだ。

【0046】

本発明の一実施態様において、対照試料が提供され、且つ陽性結果と陰性結果の間を区

50

別するためのアッセイに関するカットオフレベルは、対照試料の結果に関して規定される。これは、対照試料結果のレベルと等しい又は上回る又は下回るのいずれかの割合であることができる。このレベルを下回る患者結果は、陰性であると考えられ、且つこのレベルを上回る患者結果は、陽性であると考えられる。カットオフレベルに非常に近い患者結果の「灰色領域」範囲も存在することがあり、それに関して決定は、不確定と考えられるか、及び/又は試験を繰り返すべきである。

【0047】

同様に、ヌクレオソームに会合されたmH2A1.1アッセイについて、正常範囲は、0~0.91であった。このカットオフ値を使用し、13種全ての健常試料は、陰性であり、癌試料の64% (55中35)は陽性であった。ヌクレオソームに会合されたP-H2AX(Ser139)アッセイについて、正常範囲は、0~1.08であった。このカットオフ値を使用し、13種全ての健常試料は、陰性であり、癌試料の60% (55中33)は陽性であった。従って一部のヌクレオソームアッセイは、他のものよりもより良い臨床感受性を示している。

10

【0048】

加えて、本発明の臨床上的有用性を改善するために、ヌクレオソーム構造のパターンを使用することが可能である。これは、例えば、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンアッセイのカットオフポイントを、最大1.01の範囲を生じる、平均+1標準偏差まで低下することにより行うことができる。この場合、健常対象から採取された試料に関する疑陽性結果が0%から23% (13中3)まで増加することを代償に、偽陰性の数は4まで減少され、改善された臨床感受性93% (55中51)を生じる。これらの結果は、図17に示されている。

20

【0049】

5-メチルシトシンが会合されたヌクレオソーム、又は任意のヌクレオソームに関して陽性と認められた試料は、ヌクレオソーム構造プロファイルについて調べることができる。このヌクレオソームプロファイルを使用し、図20及び図21に図示したように、健常者と罹患患者の間で区別することができ、ここで罹患患者における様々なヌクレオソーム構造の相対割合は、健常患者及び他の非癌疾患を伴う患者において認められたものに対して表されている。これは、試験パネル中の複数のヌクレオソーム構造の調査は、より良い臨床鑑別を促進することができることを示している。

30

【0050】

同様に、本発明の診断特異性及び/又は感受性は、比の形で2つ以上の試験のデータを組み合わせることにより、増大することができる。例えば、ヌクレオソームに会合されたP-H2AX:5-メチルシトシンの比の使用は、健常対象から採取された試料に関する陰性結果の100% (13中13)は維持しつつ、真の陽性の癌症例の検出を、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシン単独に関する55% (55中30)から、2標準偏差カットオフレベルでの67% (55中37)へ増大する。

【0051】

本発明者らは、結腸癌患者3名、肺癌患者13名、膵臓癌患者2名及び口腔癌患者1名から採取したEDTA血漿試料中の2種の異なるヌクレオチドを含有する循環無細胞系ヌクレオソームのレベルを測定し、且つこれらを、健常対象20名由来の血液試料中に存在するレベルに加え、文献(*Holdenreiderらの文献、2001)に記載されたように調製した健常対象由来の血清ヌクレオソームの人工的に作製した調製品中に存在するレベルと比較した。本発明者らはまた、一つの特定のヌクレオチドを含有するヌクレオソームのレベルの比として標準化された形で観察されたレベルを表し、そのような比又は比のパターンは、全般的癌の診断のため及び特異的癌型の鑑別診断のための両方に有用であることを示した。本発明者らはまた、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンのレベルは、疾患進行により変動するかどうかを調べた。本発明者らは、5-メチルシトシンを含有する無細胞系ヌクレオソームの平均レベルは、疾患の重症度により増加し、且つリンパ節への疾患の広がり増加と共に上昇することを認めた。このことは、検出されたヌクレオソームは、腫瘍に関連していることの証拠を提供する。

40

50

【 0 0 5 2 】

本発明者らはまた、現在の技術の2種のヌクレオソームELISA法を使用し、これらの19種の癌試料中に存在するヌクレオソームを測定した。試験した癌対象19名の大半は、現在の技術のヌクレオソームELISA 1及び2により決定されたように、低いEDTA血漿ヌクレオソームレベルを有することがわかった。この結果は、現在の技術のアッセイをルーチンの臨床目的には使用することができない理由の一つを例示している。

【 0 0 5 3 】

本発明者らは、同じ19種の試料中の5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンヌクレオチドを含有するヌクレオソームを測定するために、本発明のELISA法を使用した。驚くべきことに、高いレベルの5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームが、19種の試料全てにおいて検出可能であった。従って一実施態様において、本発明は、現在の技術のヌクレオソームアッセイにより検出されないヌクレオソームを検出することが可能である新規ヌクレオソームELISA法を提供する。

10

【 0 0 5 4 】

本発明者らはまた、癌対象から採取した同じ19種の試料に加え、文献(*Holdenriederらの文献、2001)に記載された方法により健常対象から作製したヌクレオソーム試料中の、3種の異なるヒストン変種及びヒストンPTMを含有するヌクレオソームのレベルを測定した。本発明者らは、これらの測定値を、4種の異なる癌型を伴う対象から採取した生物学的液体中に存在する多種多様な無細胞系ヌクレオソーム及び健常対象から作製したヌクレオソームのパネルとして、ここに記載のヌクレオソームに会合されたヌクレオチド測定値と一緒に使用した。驚くべきことに、調べた4種の癌型(肺、結腸、膵臓及び口腔)中に認められたヌクレオソームのパターンは、健常対象から作製されたヌクレオソーム試料中に認められたものから、全て区別可能であった。更に、異なる癌型も、対象の血液中に検出可能な無細胞系ヌクレオソームのパターンを基に、互いに区別可能であった。従って本発明の一実施態様において、対象の健康又は疾患状態の指標として、異なるDNA塩基又は1以上のDNA塩基及び1以上のヒストン変種及び/若しくは1以上のヒストン修飾の組合せを含有するヌクレオソームの2種以上の測定値、並びに/又はヌクレオソームそれ自身の測定値、或いはこれらの任意の組合せ又は比からなる異なるヌクレオソームエピトープのパネルに関して、試料を試験することにより、疾患の存在、型、再発若しくは重症度を検出若しくは診断する方法、又は最適な薬物若しくは他の治療選択肢を評価する方法が、提供される。

20

30

【 0 0 5 5 】

本発明者らは同様に、多種多様な癌疾患及び非癌疾患における循環無細胞系ヌクレオソームのヌクレオチド及びヒストン構造の変動性を検出するために、本発明のELISA法を使用し、且つこれらを健常対象において認められるヌクレオソームの構造と比較した。ヌクレオソームは、調べた全ての癌疾患及び非癌疾患において存在することが認められ、且つ健常対象のプロファイルとは異なるプロファイルを有することがわかった。

【 0 0 5 6 】

本発明者らは、心筋症患者2名、全身性紅斑性狼瘡(狼瘡)患者10名、潰瘍性大腸炎患者12名、慢性閉塞性肺疾患(COPD)患者10名、クローン病患者8名及び関節リウマチ(RA)患者10名から採取したEDTA血漿試料を試験し、且つ平均ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルの割合として検出された様々なヌクレオソーム構造のレベルを規準化し、且つこれらの結果を健常対象11名において認められた平均割合に対して表した。本発明者らは、これらの疾患は、健常対象又は癌対象のものとは異なるヌクレオソーム構造プロファイルと関連していることを認めた。従って、ヌクレオソーム構造プロファイルは、多種多様な非癌疾患における検出、予後予測、モニタリング及び治療的有効性予測のための診断ツールとして使用することができる。これらの結果は、図21に示している。

40

【 0 0 5 7 】

本発明者らはまた、10種の異なる癌疾患を伴う患者55名から採取したEDTA血漿試料に関して本発明のELISA法を使用し、検出されたヌクレオチド及びヒストンの型に関して、無

50

細胞系ヌクレオソームの構造の変動性を試験した。検出された様々なヌクレオソーム構造のレベルは、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシン(5mc)でメチル化されたDNAレベルの割合として規準化し、且つ健常対象11名において認められた平均割合に対して表した。本発明者らは、全ての対象において存在するヌクレオソーム、並びに癌疾患対象、非癌疾患対象及び健常対象の間で変動するヌクレオソーム構造プロファイルを認めた。従って、ヌクレオソーム構造プロファイルは、癌及び他の疾患における検出、予後予測、モニタリング及び治療的有効性予測のための診断ツールとして使用することができる。これらの結果は、図20及び図21に示している。

【0058】

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ので(Holdenriederらの文献、2001)、当該発明の方法はまた、血液、血清及び血漿を含む生物学的液体中において直接的に、無細胞系のメチル化されたDNAそれ自身(例えば;5-メチルシトシン又は5-ヒドロキシメチルシトシンを含む、ヌクレオソームに会合されたDNAとして)を検出又は測定するために利用することができることは、当業者には明らかであろう。このように利用される本発明の方法は、特にDNAの抽出は関わりないか又は必要ないので、現在の技術のメチル化されたDNAを測定する方法に優る、簡便性及び迅速性の利点を有する。

【0059】

本発明の方法は、ヌクレオソーム中の任意の核酸又はDNA塩基又は核酸類似体若しくは誘導体を検出又は測定するために使用することができることは更に明らかであろう。そのような塩基は、アデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、キサンチン、ヒポキサンチン、7,8-ジヒドロ-8-オキソ-グアニン及びこれらの任意の誘導体又は類似体を含むが、これらに限定されるものではない。一般的ヌクレオチド(例えば、非限定的に;グアニン、シトシン、チミン又はアデニン)は、全て又はほとんどのヌクレオソーム中に生じること、及び一般的ヌクレオチドに対する抗体を使用する本発明の方法は、試料中の事実上全てのヌクレオソームに結合し且つ検出する方法を提供することは、当業者には明らかであろう。従って一実施態様において、本発明は、一般的ヌクレオチドを含有するヌクレオソームが、全て又はほとんどのヌクレオソームが検出されることを確実にする様式で測定される、ヌクレオソームそれ自身の検出の新規方法を提供する。

【0060】

更なる実施態様において、本発明は、一般的ヌクレオチドを含有するヌクレオソームが、全て又はほとんどのヌクレオソームに結合されたDNAが検出されることを確実にする様式で測定される、全てのヌクレオソームに会合されたDNAの検出のための新規方法を提供する。更に、2種以上のDNA塩基の測定は、そのようなDNA塩基の相対DNA含量の比の測定のための基礎を提供するであろう。本発明者らは、試料中の5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンの相対レベルに関するそのような比を、図10~14に図示している。本発明者らのデータは、検出可能な5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンの相対レベルは、異なる癌型で異なり、且つこれを使用し、そのような癌を区別することができることを示している。他の類似した比も、当該技術分野において有用であろう。例えば;総ヌクレオソーム結合されたDNAの測定規準(metric)として適切なDNA塩基(又は塩基類)を測定するために本発明を使用し、且つ別の塩基(例えば;5-メチルシトシン)の相対レベルを決定することにより、本発明の方法は、いずれか特定の塩基を含むDNAの割合(例えば、試料中でメチル化されているDNAの百分率)を検出することができることは明らかであろう。従って、本発明の方法は、試料中の任意の塩基のDNA含量の百分率の測定に関する簡便且つ迅速な方法を提供する。本方法は、例えば血液試料などの、複数の試料中で素早く、簡便に使用することができる。本発明の方法を使用し、例えば細胞から抽出されたクロマチンの消化により得られた試料を含む、そのようなヌクレオソームが生じる任意の試料中のヌクレオソーム内のDNA塩基を検出及び測定することができる。本明細書における用語ヌクレオチドは、非限定的に、糖に会合されたか又はされていない、且つリン酸化を伴う又は伴わない、プリン、ピリミジン又は任意の他の核酸塩基及び類似分子を含み、且つ

10

20

30

40

50

これらの任意の類似体、誘導体又は模倣体を含むことが意図されていることは、当業者には明らかであろう。

【0061】

本発明者らは、本発明の方法は、特定のヌクレオチドを含むヌクレオソームに会合されたDNAの検出及び測定のための成功した方法であること、この方法はまた、ヌクレオソームそれ自身の検出のための方法として巧く使用することができること、並びにこれは、ヌクレオソームそれ自身の検出に関して現在の技術の方法よりも優れた方法であること、並びにこの方法はまた、無細胞系DNAそれ自身の及び無細胞系DNAそれ自身のヌクレオチド組成の直接検出のための方法として巧く使用することができること、並びにヌクレオソームに会合されたDNA及びそのヌクレオチド組成の検出に関して現在の技術の方法よりも優れた方法であることを結論付けている。本方法は、複合生物学的媒体及び液体における使用に関して、迅速で、低コストで且つ好適である。本発明者らは、当該発明の方法は、血液中のヌクレオソーム及びメチル化されたDNAを含有するヌクレオソームを検出するために使用することができること、並びにこれは、癌のバイオマーカーとして使用することができることを明らかにしている。当業者には、癌患者から採取された血液試料中に存在するバイオマーカーは、癌及び上昇した循環ヌクレオソームに関連する他の疾患に関する、広範な診断及び疾患スクリーニングの目的のための値を有することは、明らかであろう(Holdenriederらの文献、2001)。

10

【0062】

ヌクレオソームの上昇したレベルは、本発明の方法を用い、健常対象においては認められないことを確認するために、本発明者らは、健常対象20名の血清及び健常ウシ血清中のヌクレオチド5-メチルシトシン及び5-ヒドロキシメチルシトシンを含有するヌクレオソームを測定した。本発明の両方のELISA試験に関する血清循環ヌクレオソームの結果は、20名の健常対象全員について低いか又は検出不能であった。本発明者らはまた、同じ20名の健常対象から採取された血漿試料中で類似の試験を行い、驚くべきことに、より高いシグナルが認められた。この知見は、予想外であり、本発明者らが現在の技術のヌクレオソームELISA法について認めた結果とは全く異なっている。

20

【0063】

本発明は、多くの癌及び非癌疾患を試験し、且つ試験した全ての疾患の検出に有効であることがわかった。これは、現在の技術のヌクレオソームELISA試験により検出不能である前立腺癌症例(Holdenriederの文献、2001)の検出を含んでいる。本発明は、全て又はほとんどの癌の検出に有効であることは、明らかである。本発明の臨床成果は、更なるヌクレオソーム構造試験の包含、及び存在する異なるヌクレオソーム構造の比の検討により、更に改善され得ることは、当業者に明らかであろう。

30

【0064】

本発明の一態様に従い、試料中のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソーム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検定の方法が、提供される。この態様の一実施態様は：

- (i)ヌクレオソームを含有し得る試料を、ヌクレオソームに結合する一次抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (ii)ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオチドに結合する二次抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (iii)該二次抗体又は他のバインダーの、試料中のヌクレオチドへの結合を検出及び/又は定量する工程；並びに
 - (iv)試料中のヌクレオソームに会合されたヌクレオチド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、免疫検定である。

40

【0065】

第二の実施態様に従い、免疫測定的免疫検定により、試料中のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームを検出し且つ測定する方法であって：

50

- (i)ヌクレオソームを含有し得る試料を、ヌクレオチドに結合する一次抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (ii)ヌクレオソーム又は試料を、ヌクレオソームに結合する二次抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (iii)該二次抗体又は他のバインダーの、試料中のヌクレオソームへの結合を検出及び/又は定量する工程；並びに
 - (iv)試料中のヌクレオソームに会合されたヌクレオチド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；
- を含む方法が、提供される。

【0066】

10

多種多様な抗体又は他のバインダーを、ヌクレオソームへ結合するバインダーとして、本発明において利用することができる。これらは、無傷のヌクレオソーム中で生じ、且つ遊離のヒストン中では生じないエピトープに結合するよう指向されたバインダー(例えば；ヌクレオソーム内の2つのヒストンの間の接合部で認められたエピトープ)、及び同じく一般的ヌクレオソームタンパク質、ヒストン又は核酸のエピトープを含む、任意のヌクレオソーム成分へ指向されたバインダーを含む。

【0067】

説明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型の非標識アッセイを含む、多種多様な実施態様を含むことは、当業者には明らかであろう。免疫測定的免疫検定は、被検体に結合する抗体(又は他のバインダー)を利用する。従って結合した被検体は、当初の試験試料中のそのレベル又は濃度の直接測定として検出される。対照的に「競合」免疫検定は、ある割合の被検体に結合するはるかに少量の抗体(又は他のバインダー)を使用することが多く、且つ標識された被検体(又は被検体類似体)の調製品は、結合した被検体画分と遊離の被検体画分(試料被検体と共に)の間で分配するために利用される。結合した標識された被検体の量は、当初の試料中の被検体濃度の間接測定として測定される。「競合」免疫検定デザインの変形において、標識された抗体が、固相被検体(又は被検体類似体)の調製品と一緒に利用される。標識された抗体の結合は、試料被検体と固相被検体(又は被検体類似体)の間で分配される。固相被検体(又は被検体類似体)調製品に結合された抗体の量は、試料の被検体濃度の間接測定として使用される。

20

30

【0068】

本発明の第三の実施態様に従い、非標識免疫測定的免疫検定による、試料中のヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを含む、ヌクレオチドを検出及び測定する方法であって：

- (i)試料を、ヌクレオチドに結合する抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (ii)試料中のヌクレオチドへの該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
 - (iii)試料中のヌクレオチド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；
- を含む方法が、提供される。

40

【0069】

本発明の第四の実施態様に従い、競合免疫検定により、試料中のヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを含む、ヌクレオチドを検出及び測定する方法であって：

- (i)試料を、ヌクレオチドに結合する抗体又は他のバインダーと接触させる工程；
 - (ii)試料中のヌクレオチドへの該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
 - (iii)試料中のヌクレオチド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；
- を含む方法が、提供される。

【0070】

50

これらの本発明の免疫検定法は、DNAの抽出のいかなる必要性も伴わずに、直接ヌクレオチド及びヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを測定することは、当業者には明らかであろう。対照的に、現在の技術のヌクレオチド免疫検定法は、試料からDNAを抽出した後、(ヌクレオソームに会合されない)ヌクレオチドを検出する。本発明の方法は、血液又はその誘導体を含む、複合した生物学的試料における直接測定に関して、高速性、簡便性及び好適性の利点を有する。

【0071】

本発明の第五の実施態様に従い、試料中の特定のヌクレオチドを含む無細胞系DNAの割合を検出する方法であって：

(i) 試料中の無細胞系DNAのレベルを検出又は測定する工程；

(ii) 本発明の方法に従い、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(iii) 前記ヌクレオチドを含むDNAの割合を決定するために、2つの測定値を使用する工程；

を含む方法が、提供される。

【0072】

本発明のこの態様の一実施態様に従い；試料中の無細胞系DNAレベル及び関心対象のヌクレオチドの両方が、本発明の方法を用いて測定される。別の実施態様において、関心対象のヌクレオチドは、メチル化されたシトシンヌクレオチドであり、且つこのヌクレオチドを含むDNAの割合は、全般的DNAメチル化の測定を提供する。

【0073】

本発明者らは、対象から採取した血液中のヌクレオチドを含有するヌクレオソームの検出及び測定を、癌を伴う対象を同定し、且つこれらの対象を健常対象から鑑別する診断方法として使用することができることを示している。更に本発明者らは、異なるヌクレオチド、ヒストン変種及びヒストンPTMのパネルを含むヌクレオソームのパターンは、異なる癌の間の区別を使用することができることを示している。これは、対象における癌を検出し、且つ癌陽性対象において癌型間を区別するために使用することができる、癌血液試験を提供することは、当業者には明らかであろう。本発明の更なる態様に従い、体液中のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームの存在及び/又はレベル若しくは濃度を測定又は検出し、且つ検出されたレベルを、非限定的に、疾患の臨床診断、疾患型若しくは亜型の鑑別診断、又は疾患予後、又は疾患再発、或いは治療レジメンに対する対象の感受性の診断を含む、対象の疾患状態のバイオマーカーとして使用することにより、疾患の存在を検出又は診断する方法が、提供される。診断試験に使用した体液は、非限定的に、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に会合されたヌクレオチドのアッセイ反応、レベル、濃度又は量は、例えば、非限定的に、存在する総ヌクレオソームレベルの割合として、又は別のヌクレオチド若しくはヒストン変種若しくはヒストンPTMを含有するヌクレオソームのレベルに対する比、又は総DNAのレベルに対する比として、絶対項又は相対項として表すことができる。

【0074】

本発明の一実施態様において、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチド測定は、非限定的に、疾患の臨床診断、疾患型若しくは亜型の鑑別診断、又は疾患予後、又は疾患再発、或いは治療レジメンに対する対象の感受性の診断を含む、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一員として使用される。

【0075】

全て又はほとんどの循環無細胞系DNAは、ヌクレオソームに会合されたDNAとして存在することが報告されているので、疾患状態の診断又は検出は、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドの免疫検定よりもむしろ、又はこれに加えて、生物学的液体中のDNA抽出工程を伴わない本発明の直接ヌクレオチド免疫検定を使用することによる、ヌクレオチドそ

10

20

30

40

50

れ自身の検出又は測定により、実現され得ることは、当業者に明らかであろう。本発明の更なる態様に従い、体液中のヌクレオチドの存在及び／又はレベル若しくは濃度を測定又は検出し、且つ検出されたレベルを、非限定的に、疾患の臨床診断、疾患型若しくは亜型の鑑別診断、又は疾患予後、又は疾患再発、或いは治療レジメンに対する対象の感受性の診断を含む、対象の疾患状態のバイオマーカー（試験のパネルの一員としていずれか単独で）使用することにより、疾患の存在を検出又は診断するための、非抽出ヌクレオチド免疫検定法が提供される。診断試験に使用される体液は、非限定的に、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。体液中のヌクレオチドのアッセイ反応、レベル、濃度又は量は、例えば、非限定的に、存在する総ヌクレオソームレベルの割合として、又は別のヌクレオチド若しくはヒストン変種若しくはヒストンPTMのレベルに対する比、又は総DNAのレベルに対する比として、絶対項又は相対項として表すことができる。

10

20

30

40

50

【0076】

本発明の更なる態様に従い、細胞中のヌクレオチドを含有するヌクレオソームの存在及び／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) 本発明の免疫検定法により、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チド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。

【0077】

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作製する方法は、当該技術分野において周知であり、且つ酵素消化及び音波処理を含む(Daiらの文献、2011)。一実施態様において、本方法による検出のために選択されたヌクレオチドは、全ての又はほとんどの無傷のヌクレオソーム中に生じる、一般に生じるヌクレオチドであり、ヌクレオソームそれ自身の検出又は測定の方法を提供する。別の実施態様において、本方法による検出のために選択されたヌクレオチドは、全ての又はほとんどの無傷のヌクレオソーム中に生じる、一般に生じるヌクレオチドであり、ヌクレオソーム結合したDNAの検出又は測定の方法を提供する。

【0078】

説明された細胞又は組織中のヌクレオソームに会合されたヌクレオチドを検出する方法は、IHC、或いは制限消化及び最短距離分析、若しくはクロルアセトアルデヒドを使用する蛍光アッセイ、又は非メチル化CpGの量を算出するためのトリチウム-標識されたS-アデノシルメチオニンと組合せてDNAメチル基転移酵素を使用する全てのCpG部位のメチル化によるインパース決定、又は、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、若しくは液体クロマトグラフィーとそれに続く質量分析による分析のためのDNAの単独ヌクレオチドへの消化による、細胞から抽出されたDNA中のヌクレオチドの検出を含む、現在使用されている方法に優る利点を有することは、当業者により理解されるであろう。特定のヌクレオソームに会合されたヌクレオチドのレベル、濃度又は量は、例えば、存在する総ヌクレオソームレベルの割合として、又は別のヌクレオチド若しくはヒストン変種若しくはヒストンPTMを含有するヌクレオソームのレベルに対する比、又は総DNAのレベルに対する比として、絶対項又は相対項として表すことができる。

【0079】

本発明の任意の態様に関する用語抗体、バインダー又はリガンドは、限定されるものではないが、特定の分子又は実体に結合することが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することができることは、当業者に明らかであろう。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よう

なクロマチン断片を含むことが意図されていることも明らかであろう。

【0080】

本発明の別の態様に従い、ヌクレオチド若しくはそれらの部分成分、又はヌクレオソーム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、本明細書に規定したいずれかの方法に従うキットの使用説明書と一緒に備える、ヌクレオソームの検出又は測定のためのキットが提供される。

【0081】

本発明の更なる態様に従い、ヌクレオチド若しくはそれらの部分成分、又はヌクレオチ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、本明細書に規定したいずれかの方法に従うキットの使用説明書と一緒に備える、ヌクレオチドを含有するヌクレオソームの検出又は測定のためのキットが提供される。

10

【0082】

本発明の別の態様に従い、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に、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドバイオマーカー又はヌクレオチド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、ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソーム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、ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(iii)ヌクレオチドが、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。

20

【0083】

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、又は異なる疾患を伴う対象であってよい(例えば；鑑別診断の検査のために)など様々なことを基に選択され得ることは、当業者には明らかであろう。

【0084】

本発明の更なる態様に従い、罹患した動物又はヒト対象の予後の評価のために、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドバイオマーカー又はヌクレオチドバイオマーカーを同定する方法であって：

30

(i)罹患対象の体液中のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソーム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ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームのレベルを、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。

【0085】

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べきヌクレオチド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ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームのレベルを検出又は測定する工程；並びに

(ii)罹患対象の体液中のヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームのレベルを、それらの対象における治療レジメンの認められた有効性と関連させる工程；を含む方法が、提供される。

40

【0086】

本発明の更なる態様に従い、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べきヌクレオソームに会合されたヌクレオチドバイオマーカー又はヌクレオチド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、ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソーム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回以上にわたり、該検出又は測定を反復する工程；並びに

50

(iii)罹患対象の体液中に検出されたヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームのレベルを、対象における疾患進行と相関させる工程：
を含む方法が、提供される。

【0087】

本発明の更なる態様に従い、本明細書において規定された方法により同定されたバイオマーカーが提供される。

【0088】

免疫検定法により、他の部分を含む複合体の一部を構成する部分の存在を検出することができることは、当該技術分野において公知であろう。ヌクレオチドを含有する無細胞系ヌクレオソームは、生物学的液体中のヌクレオチド自身の直接免疫検定が関与する手順により、血液、血漿、血清及び尿を含む生物学的液体中に検出され得ることは、当業者には明らかであろう。この手順において、ヌクレオチド上に存在するエピトープに対する抗体を利用する単独抗体免疫検定、又はヌクレオチド上に存在する2つのエピトープに対する2つの抗体を利用する2-サイト免疫検定が、ヌクレオソーム内のヌクレオチドの存在を検出するために使用される。従って本発明の別の実施態様において、ヌクレオソーム内に含有されるヌクレオチドは、ヌクレオチドに関する免疫検定法の使用により、血液、血漿、血清及び尿を含む生物学的液体中で、直接検出される。

10

【0089】

従って本発明の一実施態様において、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチドは、ヌクレオチドに関する免疫検定を使用し、血液、血漿、血清及び尿を含む生物学的液体中に、予め抽出することなく、直接検出される。

20

【0090】

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、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を含んでよい。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である、モノクローナル抗体又はそれらの断片であることができる。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。

30

【0091】

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。

【0092】

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、本明細書記載のような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、本明細書記載のように生物学的試料について実行することができる。

40

【0093】

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含むであろう。

【0094】

50

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。

【0095】

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治療的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変更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。

10

【0096】

従って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、記載のようなバインダー又はリガンドの使用；或いは、バイオマーカーの生成を促進及び/又は抑制することが可能である物質を同定するための、本発明のバイオセンサー、又は本発明のアレイの使用；或いは、本発明のキットが提供される。

【0097】

同じく、対象におけるバイオマーカーの生成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、対象動物へ投与すること、並びに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、

20

【0098】

用語「バイオマーカー」は、プロセス、事象、又は状態の別個の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、診断、例えば臨床スクリーニング、及び予後判定の方法及び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反応する可能性がある患者の同定、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、新規薬物治療の同定にとって、及び薬物治療の新規標的の発見にとって価値がある。

【0099】

本明細書において使用される用語「検出する」及び「診断する」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、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、治療的恩恵の評価、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。

30

【0100】

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の減少)、且つ再発率を低下することにより、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(patient solutions)」を提供する。

40

【0101】

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従い、(i)腫瘍細胞に会合され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。

【0102】

増大した細胞代謝回転、細胞死及びアポトーシスは、増加した無細胞系ヌクレオソームの循環レベルに繋がることは公知である(Holdenriederらの文献、2001)。循環する無細胞系ヌクレオソームのレベルは、非特異的指標であり、且つ炎症疾患、非常に多様な良性及

50

び悪性の状態、自己免疫疾患に加え、外傷又は虚血に続発を含む、多種多様な状態において起こる(Holdenriederらの文献、2001)。本発明は、循環ヌクレオソームが対象において認められる多様な疾患領域における適用を有することは、当業者には明らかであろう。これらは、非限定的に、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)、脳卒中及び心臓発作、敗血症又は他の重篤な感染症及び子宮内膜症を含む。本発明者らは、ヌクレオソームレベルを測定し、且つ心筋症、全身性紅斑性狼瘡、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患、クローン病及び関節リウマチを含む、多様なそのような疾患におけるそれらのヌクレオチド及びヒストン構造の変動性を調べるために、本発明の免疫検定法を使用し、且つこれらを健常対象の結果と比較している。本発明者らは、これらの疾患全てにおいて、ヌクレオソームを検出し、且つそれらの相対構造(ヒストン及びヌクレオチド組成に関して)を決定することができる。当該発明の方法は、現在のヌクレオソームELISA法よりも広範なヌクレオソームの検出が可能であるので、本発明の方法は、多種多様な癌及び非癌疾患領域における適用を有する。

10

20

30

40

50

【0103】

本発明の免疫検定は、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検定法を含む競合免疫検定法を含む。該免疫検定法は全て、当該技術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。

【0104】

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することが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など調製することができ、且つ通常の様式で貯蔵される。

【0105】

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恩恵を提供するであろう。そ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。

【0106】

従って、本発明はまた、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、そのような疾患を有する疑われる対象における疾患状態に関する療法の有効性をモニタリングする方法を提供する。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、例えば療法の開始前に採取された、及び/若しくは療法の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よい。

【0107】

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療法の有効性をモニタリングする方法であって：

(i)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

(ii)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。

【0108】

試験試料中のバイオマーカ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前の試験試料中のレベルに対する変化は、障害又は疑われる障害に対する、該療法の、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よい。

【0109】

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、現存する療法及び新規療法の治療的効果をモニタリングするために使用することができる。これらのモニタリング法は、新規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、素早く作用する療法に起因した、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。

【0110】

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を同定する方法が提供される。本明細書において使用される用語「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の量の定量は、試料中に存在するバイオマーカ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。

【0111】

本発明の代替の態様において、バイオマーカの存在は、バイオマーカに反応して対象の体により生成される、バイオマーカに特異的に結合することが可能である、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、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。

【0112】

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の濃度を測定することにより実行することができる。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。

【0113】

バイオマーカの同定及び/又は定量は、バイオマーカ又はそれらの断片、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実行することができる。断片は、好適には、長さが4個よりも大きいアミノ酸、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。

【0114】

前記バイオマーカは、例えば、SELDI又はMALDI-TOFにより、直接的に検出されてよい。或いは、バイオマーカは、抗体若しくはそれらのバイオマーカ-結合断片、又は他のペプチドなどの、1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に特異的に結合することが可能であるアプタマ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。

【0115】

10

20

30

40

50

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。

【0116】

本発明に従う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。これらの方法は同じく、臨床スクリーニング、予後、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反応する可能性がある患者の同定、薬物スクリーニング及び創薬、並びに薬物治療に関する新規標的の同定に適している。

10

【0117】

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することが可能である抗体、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、サンドイッチ免疫検定；放射免疫測定(RIA)、直接的、間接的又は競合酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、酵素免疫検定(EIA)、蛍光免疫検定(FIA)、ウェスタンブロット、免疫沈降及び任意の粒子-ベースの免疫検定(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よい。

20

【0118】

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。

【0119】

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。

30

【0120】

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することが可能であるいずれかを意味する。バイオセンサーの例は、本明細書に記載されている。

40

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。

【0121】

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入れ技術を用いて検出することができ、そのような技術は特に「バーコード」又はアレイ構成に適している。

【0122】

50

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に繋がる。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あることができる。定性的及び半定量的適用のためには、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である場合は、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、試料の不透明性又は色は、このセンサーの操作とは干渉しない。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、且つ関心対象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。

10

【0123】

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。

【0124】

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-レーヤー干渉(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してよい。

20

【0125】

本発明の1種以上のバイオマーカーの同定及び/又は定量に関する方法は、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、収集されたデータが、解釈のために医師に電送されることを可能にす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。

30

【0126】

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、本明細書に説明されている。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；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。

【0127】

疾患状態に関する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、臨床試験への対象の参加前の、対象のスクリーニングに使用することができる。これらのバイオマーカーは、治療反応、反応不良、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、有害な薬物反応の警告を提供することができる。反応の評価は、用量の微調整、処方薬の数の最小化、有効な療法への到達の遅延の減少、及び有害薬物反応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、患者の管理(care)を、患者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作ることができ、従ってこのバイオマーカーを

40

50

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患者を同定することができる。

【0128】

バイオマーカーベースの試験は、「新規」患者の第一線の評価を提供し、且つ現在の測定を用いては達成され得ない、正確で迅速な診断のための客観的測定を提供する。

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、家族の一員又は患者を同定するために有用である。このことは、適切な療法の開始、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することができることが認められる。

【0129】

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、該障害の増悪に起因するかどうかを医師が決定することを可能にするための、患者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、療法を還元若しくは増加することができ；適切ならば、療法が変更される。これらのバイオマーカーが該障害の状態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。

【実施例】

【0130】

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)

ヌクレオソーム内のDNA及びタンパク質が安定のために架橋されている(その調製品中に存在する全てのヒストンが無傷のヌクレオソーム中に組み込まれていることを確実にするため)MCF7細胞から抽出されたクロマチンの消化により生成された市販のヌクレオソーム調製品を、無傷のヌクレオソームに結合する固相抗-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-5-メチルシトシン検出抗体を使用する、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチド5-メチルシトシンに関するELISA法を用い、メチル化されたDNAについてアッセイした。ヌクレオソーム試料を、ウシ胎仔血清中に連続希釈し、且つELISAにおいて2つ組で試験した。未希釈のウシ胎仔血清もまた、無細胞系ヌクレオソームを含有しない対照試料として、ELISAにおいて試行した。アッセイ法は、下記に従う：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に添加し(100 µL/ウェル)、4 で一晚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。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、室温で90分間、穏やかに攪拌しながらインキュベーションした。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-5-メチルシトシン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、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。ヌクレオソームに会合された抗-5-メチルシトシン

10

20

30

40

50

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、5-メチルシトシン非存在(ウシ胎仔血清)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、(i)この捕獲抗体は、試料中のヒストンに結合し、且つ(ii)検出抗体は、DNAの5-メチルシトシン成分に結合するので、ELISAにより検出された5-メチルシトシンは、ヒストンタンパク質及びDNAの両方を含有する無傷のヌクレオソーム内に組み込まれていることを指摘している。これらの結果は、図1に示している。

【0131】

(実施例2)

ヌクレオソーム内のDNA及びタンパク質が安定のために架橋されているA375細胞から抽出されたクロマチンの消化により生成された市販のヌクレオソーム調製品(その調製品中に存在する全てのヒストンが無傷のヌクレオソーム中に組み込まれていることを確実にするため)を、無傷のヌクレオソームに結合する固相抗-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-5-ヒドロキシメチルシトシン検出抗体を使用する、ヌクレオソームに会合されたヌクレオチド5-ヒドロキシメチルシトシンに関するELISA法を用い、5-ヒドロキシメチル化されたDNAについてアッセイした。ヌクレオソーム試料を、ウシ胎仔血清中に連続希釈し、且つELISAにおいて2つ組で試験した。未希釈のウシ胎仔血清もまた、無細胞系ヌクレオソームを含有しない対照試料として、ELISAにおいて試行した。アッセイ法は、下記に従う：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に添加し(100 µL/ウェル)、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。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置換体を含有する0.05M トリス/HCl(pH7.5))を、ウェルへ添加し、室温で90分間、穏やかに攪拌しながらインキュベーションした。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-5-ヒドロキシメチルシトシン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、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。ヌクレオソームに会合された5-ヒドロキシメチルシトシン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、5-ヒドロキシメチルシトシン非存在(ウシ胎仔血清)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、(i)この捕獲抗体は、試料中のヒストンに結合し、且つ(ii)検出抗体は、DNAの5-ヒドロキシメチルシトシン成分に結合するので、ELISAにより検出された5-ヒドロキシメチルシトシンは、ヒストンタンパク質及びDNAの両方を含有する無傷のヌクレオソーム内に組み込まれていることを指摘している。これらの結果は、図2に示している。

【0132】

(実施例3)

本発明者らは、健常対象20名から採取した血清及び血漿の血液試料の循環無細胞系ヌクレオソーム含量を測定するために、現在の技術の2つのヌクレオソームELISA法を使用した。第一の現在のELISA法(ELISA 1)は、ロッシュ細胞死検出ELISAであり、他方(ELISA 2)は、抗-ヒストン捕獲抗体及び抗-ヒストン-DNA複合体検出抗体を利用するELISAである。両

10

20

30

40

50

方の現在のヌクレオソームELISA法により検出したヌクレオソームレベルは、正常血漿中において、正常血清中よりもより低かった。ヌクレオソームの血清レベルに関する正常範囲(光学密度単位で表される)を計算し(20名の健常対象の血清の結果の平均±平均の2標準偏差)、ELISA 1に関して0~4.3 OD単位、及びELISA 2に関して0~1.4であった。血漿に関する各々の範囲は、0~0.95及び0~0.96であった。これらの結果は、図3に示している。

【0133】

本発明者らはまた、健常対象から採取した同じ20種の試料において、2種のヌクレオソームに会合されたヌクレオチドに加え、3種のヌクレオソームに会合されたヒストン変種及びヒストンPTMを含むヌクレオソームのレベルも測定した。これらの結果は、健常血清試料は、ヒストン変種又はPTM又はヌクレオチドを含有するヌクレオソームの、均一に低いレベルを有することを示している。ヒストン変種、PTM又はヌクレオチドを含有するヌクレオソームの血清レベルに関する正常範囲(光学密度で表される)は以下であった；(a)mH2A1.1について、0~0.36、(b)mH2A2について、0.05~0.78、(c)H2AZについて、0.11~0.58、(d)P-H2AX(Ser139)について、0.06~0.61、(e)5-メチルシトシンについて、0.06~0.36、及び(f)5-ヒドロキシメチルシトシンについて、0.03~0.36。測定したEDTA血漿の結果は、健常対象20名全てについてより高かった。これらの結果は、図4、5、6、7、8及び9に示している。

【0134】

(実施例4)

本発明者らは、健常対象13名、並びに胃、大腸、直腸、肺(小細胞癌及び様々な非小細胞癌)、乳房、卵巣、膵臓、前立腺、腎臓の癌及び様々な口腔癌(口腔、口蓋、咽頭及び喉頭)を伴う対象55名から採取したEDTA血漿中の5-メチルシトシンを含有する無細胞系ヌクレオソームを測定した。健常対象由来の13種の試料全て、1種以上の無細胞系ヌクレオソーム型について陽性であった。癌患者由来の55種の試料全て、アッセイした無細胞系ヌクレオソーム型全てについて陽性であった。しかし、癌対象から採取した試料中で検出されたレベルは、健常対象由来の試料において認められたレベルよりもより高く、これらの結果は、健常対象と癌対象を識別することができることを示した。例えば、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンに関する、平均±該平均の2標準偏差としてのOD項目において算出された正常範囲は、0~1.41であった。このカットオフ値を使用すると、13種の健常試料は全て陰性であり、且つ55種の癌試料の30種は陽性であり(全般的臨床感受性55%)、これは胃癌試料の38%(8中3)、大腸癌試料の60%(5中3)、直腸癌試料の33%(3中1)、小細胞肺癌試料の33%(6中2)、非小細胞肺癌試料の64%(14中9)、乳癌試料の33%(6中2)、卵巣癌試料の100%(1中1)、膵臓癌試料の100%(1中1)、前立腺癌試料の33%(6中2)、腎臓癌試料の100%(1中1)及び口腔癌試料の60%(5中3)であった。これらの結果は、図17に示している。

【0135】

本発明者らはまた、本発明の方法を使用し、同じ試料中の様々な他のヌクレオソームに会合された構造を測定した。これらの免疫検定の結果を集計し、5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームの検出されたレベルに対し規準化された、癌患者から採取した試料中のヌクレオソーム構造のプロファイルを提供した。本発明者らは、得られたプロファイルを、健常対象から採取した試料のヌクレオソーム構造と比較した。無細胞系ヌクレオソームのヌクレオソーム構造プロファイルは、健常対象のプロファイルとは異なることがわかった。これらの結果は、図20に示している。本発明者らは同様に、様々な非癌疾患から採取した試料に関するヌクレオソーム構造プロファイルを集計し、これらを、癌患者から及び健常対象から採取した試料中のヌクレオソームのプロファイルと比較した。これらの結果は、図21に示している。

【0136】

次に本発明者らは、健常対象10名由来の試料及び更なる様々な癌型を伴う患者62名由来の試料を含む、別の類似実験を行った。これらの結果は、最初の実験に類似している。例えば、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンに関する結果及び健常対象に関する

結果の平均 + 該平均の2標準偏差のカットオフを使用し、陰性結果が、健常対象10名全員について得られ、陽性結果が、癌患者の95% (62中61) について得られ、これは前立腺癌患者の9名中9名、皮膚癌患者5名中5名、食道癌患者8名中8名、膀胱癌患者13名中12名、頸部癌患者2名中2名及び結腸癌患者1名中1名、乳癌患者4名中4名、卵巣癌患者7名中7名、喉頭癌患者7名中7名、肺癌患者3名中3名及び腎臓癌患者3名中3名を含んだ。これらの結果は、図18に示している。この結果は、特に5-メチルシトシンを含む、血清ヌクレオチドレベル及びヌクレオソームに会合されたヌクレオチドレベルは、癌の臨床感受性のあるバイオマーカーであることを指摘している。

【0137】

(実施例5)

本発明者らは、現在の技術の2種のヌクレオソームELISA法を使用し、Holdenriederの方法(*Holdenriederらの文献、2001)に従い、結腸癌対象3名、肺癌対象13名、膵臓癌対象2名、口腔癌対象1名から採取した試料、及び健常対象から生成されたヌクレオソーム試料の循環無細胞系ヌクレオソーム含量を測定した。第一の現在のELISA法(ELISA 1)は、ロッシュ細胞死検出ELISAであり、他方(ELISA 2)は、抗-ヒストン捕獲抗体及び抗-ヒストン-DNA複合体検出抗体を利用するELISAである。

【0138】

本発明者らはまた、癌対象から採取した同じ19種の試料中の、ヌクレオチド5-メチルシトシンと5-ヒドロキシメチルシトシンに加え、3種の変種ヒストン及びヒストンPTMを含有するヌクレオソームのレベルも測定した。これらの結果は、ほとんどの対象について、特に膵臓癌及び口腔癌の患者について、現在の技術のELISA法について低いヌクレオソーム結果が検出されたが、これらの試料のほとんどは、1種以上のヌクレオソームに会合されたヌクレオチド又は変種ヒストンを含むヌクレオソームのより高い検出可能なレベルを有したことを示している。結腸癌対象3名、肺癌対象13名、膵臓癌対象2名、及び口腔癌対象1名から採取した試料に関する結果は、各々、図10、図11、図12、及び図13に示している。有意なヌクレオソームに会合されたヒストン変種レベル及びヒストンPTMレベルが、癌試料19種中16(3種の肺癌試料以外全て)において検出された。加えて、有意なヌクレオソームに会合された5-ヒドロキシメチルシトシンレベルが、癌試料19種中12において検出された。更に有意なヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルが、19種の癌試料全てにおいて検出された。

【0139】

更に、異なるヌクレオチド、ヒストン変種及びヒストンPTMレベルを含有するヌクレオソームレベルのパターンは、全ての対象に関して均一ではないが、試験した異なる癌について異なるパターンを示している。同じ癌又は異なる癌を伴う対象の結果間の比較を促進するために；ヌクレオソーム試験(macroH2A1.1、macroH2A2、H2AZ、P-H2AX(Ser139)、5-メチルシトシン、5-ヒドロキシメチルシトシンを含有するヌクレオソームに関して)の結果を、5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームに関して観察されたODシグナルの割合として規準化した。これらの規準化された結果(2以上の対象由来の試料を試験した場合の結果の標準偏差を示すエラーバーを伴う)を、各癌について図14に示し、更に健常対象から生成されたヌクレオソーム試料に関する同じ結果を示した(mH2A2及び5-ヒドロキシメチルシトシンは、この試料について測定しなかった)。図14は、調べた4種の癌全てにおいて、異なる規準化されたヌクレオチド、ヒストン変種又はPTMを含有するヌクレオソームの分布パターンは、健常対象から調製した試料中のヌクレオソームの分布とは極めて顕著に異なることを示している。例えば、健常ヌクレオソーム試料中のmacroH2A1.1を含有するヌクレオソームの相対レベルは、いずれかの癌型の試料において検出されたレベルとは異なる。従って本発明は、単純な血液ベースのスクリーニング試験において癌を検出する方法として使用することができる。本発明は、腫瘍又は他の疾患起源の循環無細胞系ヌクレオソーム間の更なる又はより良い識別のために、他の更なるヌクレオチド及び/又はヒストン変種及び/又はヒストン修飾を含有するヌクレオソームの試験を含むことは、当業者には明らかであろう。

10

20

30

40

50

【0140】

更に、観察されたヌクレオソーム型のパターンは、異なる癌型について異なる。例えば；結腸癌、膵臓癌及び口腔癌を伴う対象から採取した試料は、ヌクレオソームに会合されたH2AZ及び5-ヒドロキシメチルシトシンの異なる規準化されたレベルにより、区別することができる。同様に口腔癌は、他の3種の癌型のいずれとも異なるmH2A2又はP-H2AX(Ser139)を含有する両ヌクレオソームの規準化されたレベルを有し、且つ膵臓癌の対象由来の試料は、変種macroH2A1.1を含有するヌクレオソームの異なる相対レベルを基に、結腸癌の対象由来の試料から区別することができる。従って本発明は、一般に癌を診断し、且つ特定の癌型を区別する方法として使用することができる。本発明は、様々な特異的腫瘍起源の又は他の疾患起源の循環無細胞系ヌクレオソームの間を更に又はより良く識別するために、他の更なるヒストン変種及び/又はヒストン修飾及び/又はヌクレオチドを含有するヌクレオソームを試験することを含むことは、当業者には明らかであろう。

10

【0141】

(実施例6)

本発明者らは、健常対象3名及び結腸癌患者10名から採取した血清試料において、本発明の方法を試験した。本発明者らは、これらの試料中の5-メチルシトシンを含有するヌクレオソームを測定し、且つ図16に示したように、癌の結果は、健常対象について得られた結果よりも一様に上昇した。

【0142】

(実施例7)

本発明者らは、肺癌及び結腸癌患者から採取したヒトEDTA血漿試料のヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルを測定した。検出したレベルを、患者の疾患進行と相関させた。図19に示した結果は、ヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルは、サイズ、病期、結節の播種に関する疾患の重篤度と共に増加し、且つヌクレオソームに会合された5-メチルシトシンレベルは、疾患進行の指標として、単独で又は診断パネルの一部として、使用することができることを指摘している。

20

【0143】

(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
- Bawden *et al*, Detection of histone modification in cell-free nucleosomes. WO 2005/019826, 2005
- Boulard *et al*, Histone variant macroH2A1 deletion in mice causes female-specific steatosis. *Epigenetics & Chromatin*: 3(8), 1-13, 2010 Cell Biolabs, Inc. Product Manual for “Global DNA Methylation ELISA Kit (5'-methyl-2'-deoxycytidine Quantitation”, 2011
- 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).
- Deligezer *et al*, Sequence-Specific Histone Methylation Is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma. *Clinical Chemistry* 54(7), 1125–1131, 2008
- Epigentek Group Inc, Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit, User Guide, Version 2.0802, 2009
- 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
- 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
- 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
- Hua *et al*, Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression. *Molecular Systems Biology* 4; Article number 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008
- Herranz and Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets. *Methods Mol Biol*.361:25-62, 2007
- Holdenrieder *et al*, Nucleosomes in serum of patients 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
- Holdenrieder *et al*, Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR. *Clinical Chemistry*: 51(8), 1544-1546, 2005
- Holdenreider and Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46(1): 1–24, 2009
- Kapoor *et al*, The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8. *Nature*: 468, 1105-1111, 2010 10
- Mansour *et al*, The Prognostic Significance of Whole Blood Global and Specific DNA Methylation Levels in Gastric Adenocarcinoma. *PLoS ONE* 5(12): e15585. doi:10.1371/journal.pone.0015585, 2010
- Moore *et al*, Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case—control study. *The Lancet Oncology*: 9(4), 359 - 366, 2008
- Ogoshi *et al*, Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics*: In Press, 2011 20
- Pennings *et al*, DNA methylation, nucleosome formation and positioning. *Briefings in functional genomics and proteomics*: 3(4), 351-361, 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 30
- Sporn *et al*, Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence. *Oncogene*: 28(38), 3423-8, 2009
- Stroud *et al*, 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biology*: 12:R54, 2011
- Tachiwana *et al*, Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants. *Acta Cryst*: D67, 578-583, 2011
- Ting Hsiung *et al*, Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*: 16(1), 108-114, 2007 40
- 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
- Vasser *et al*, Measurement of Global DNA Methylation. *Genetic Engineering and Biotechnology News*: 29(7), 2009

Whittle *et al*, The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis. PLoS Genet 4(9): 1-17, 2008

Zee *et al*, Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells Epigenetics & Chromatin. 3(22): 1-11, 2010

Zhang *et al*, Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. Analytical Biochemistry: 413(2), 164-170, 2011

【 図 1 】

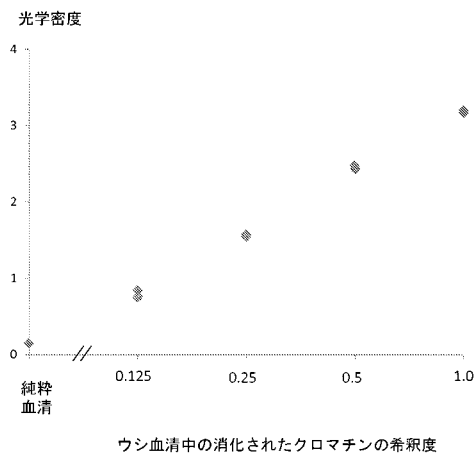


図 1

【 図 2 】

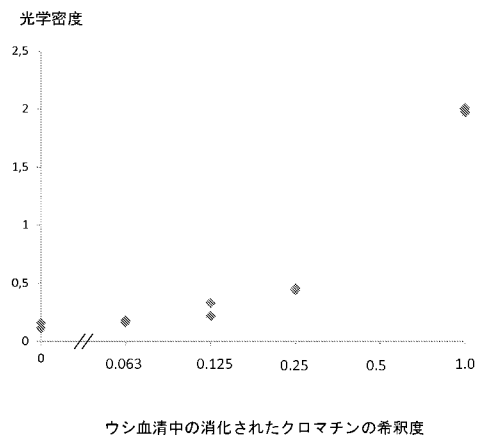


図 2

【 図 3 】

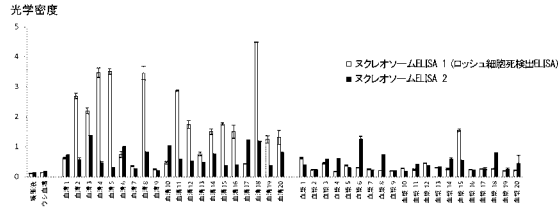


図 3

【 図 5 】

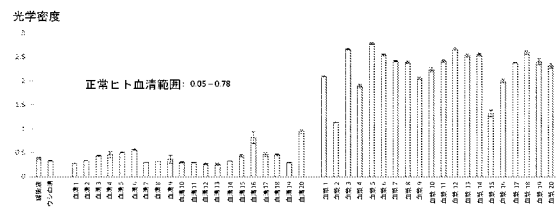


図 5

【 図 4 】

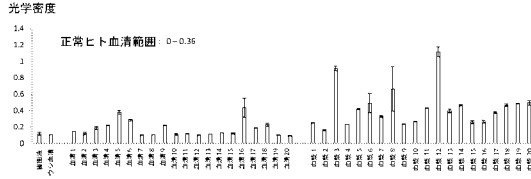


図 4

【 図 6 】

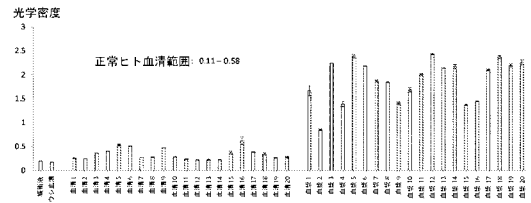


図 6

【 図 7 】

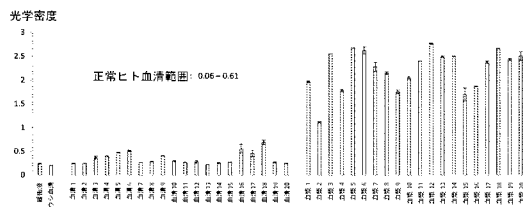


図 7

【 図 9 】

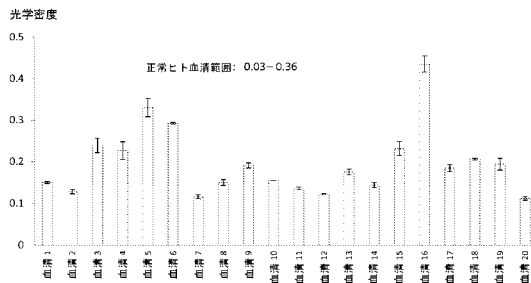


図 9

【 図 8 】

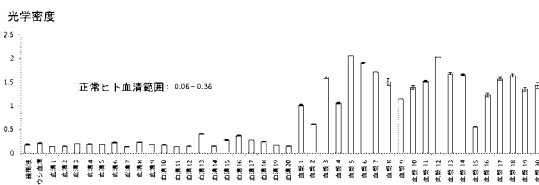


図 8

【 図 10 】

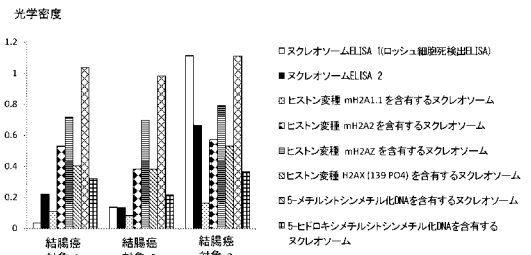


図 10

【 図 1 1 】

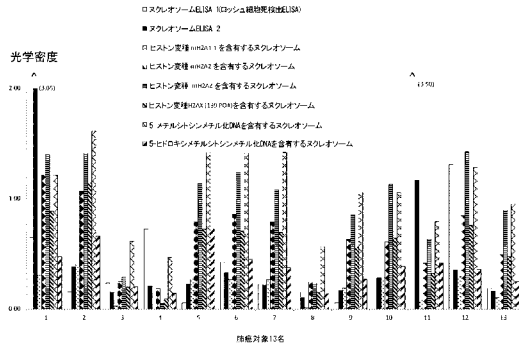


図 11

【 図 1 3 】

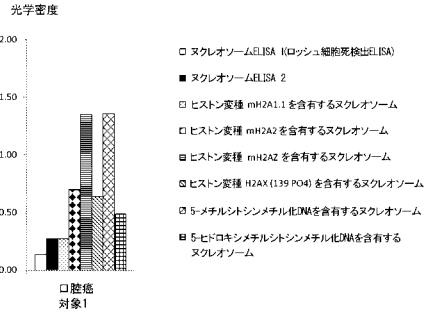


図 13

【 図 1 2 】

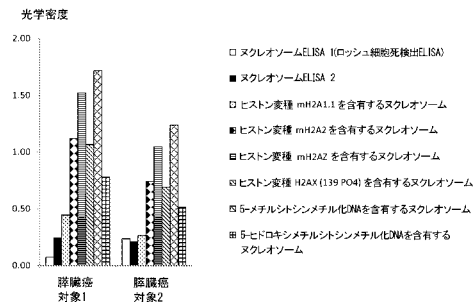


図 12

【 図 1 4 】

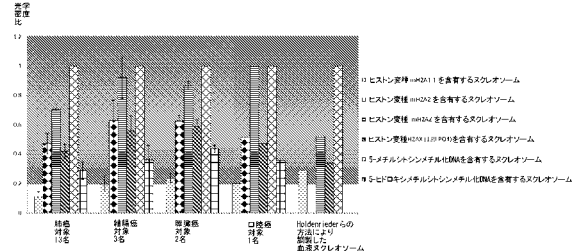


図 14

【 図 1 5 】

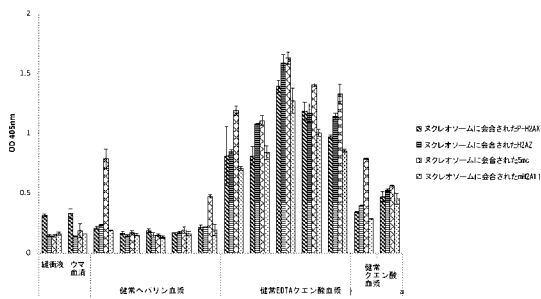


図 15

【 図 1 7 】

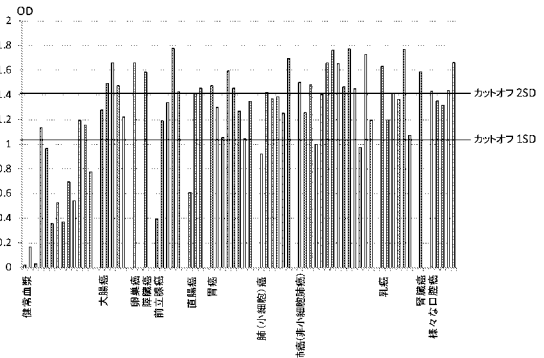


図 17

【 図 1 6 】

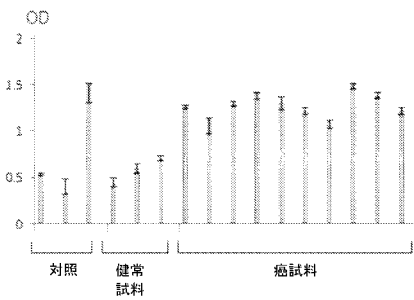


図 16

【 図 1 8 】

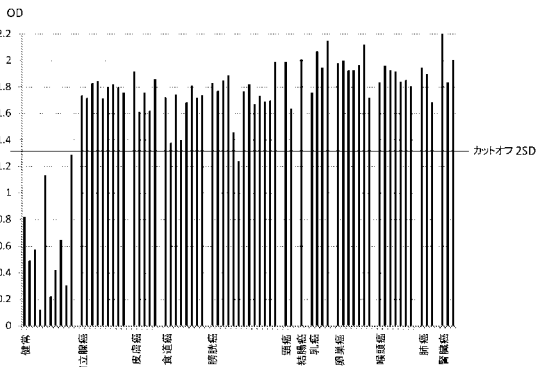


図 18

【 図 19 】

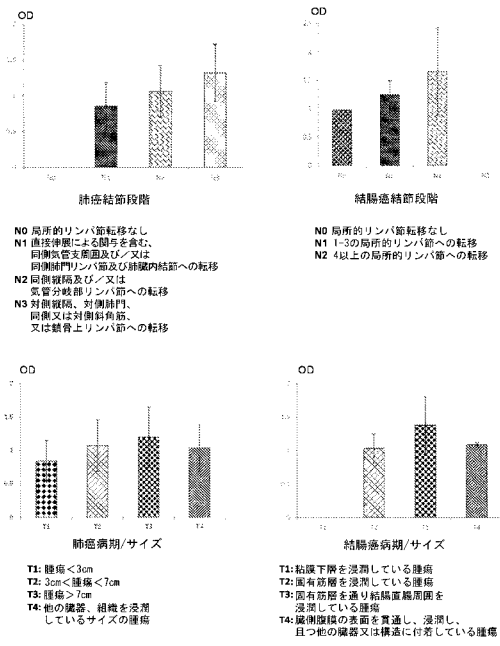


図 19

【 図 20 】

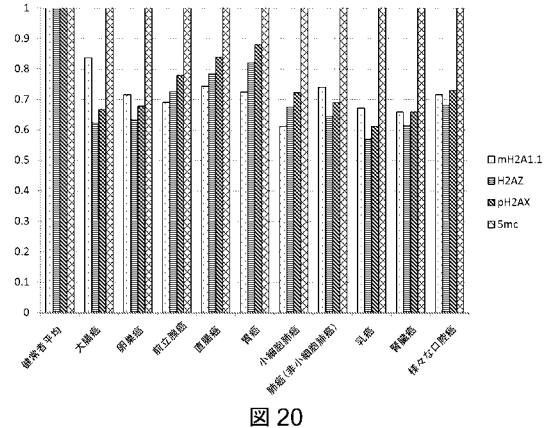


図 20

【 図 21 】

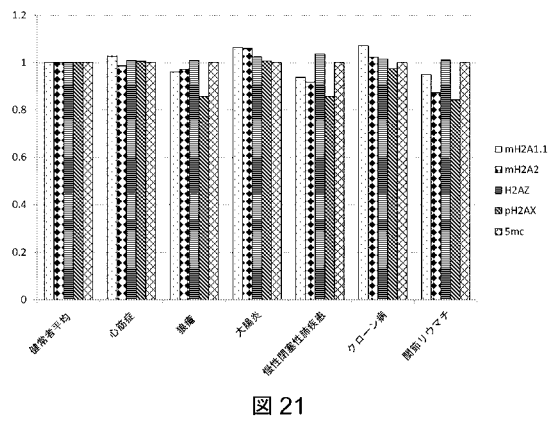


図 21

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/052128

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/574 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, WPI Data, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/019826 A1 (CHROMA THERAPEUTICS LTD [GB]; BAWDEN LINDSAY JANE [GB]; BONE ELIZABETH) 3 March 2005 (2005-03-03) cited in the application	1-10, 12-14, 16-22
Y	pg 1, l 1-7; pg 3, l 15-20; pg 7, l 26-pg 8, l 28; pg 11, l 11-pg 12, l 5; pg 22, l 24-26; pg 23, l 4-10; cl 1-3, 6-15, 20-29, 41,-42, 44.	11,15
X	WO 99/47924 A1 (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOLDENRIEDER STEFAN [DE]; BUSCH MARTIN [D] 23 September 1999 (1999-09-23)	6-10, 12-14, 16-18, 20,23
Y	pg 1, first par; pg 6, second par-pg 7, last par; pg 11, sec par; cl 1-9. ----- -/--	11,15
<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 6 December 2012		Date of mailing of the international search report 11/02/2013
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 Motrescu-Hateley, E

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/GB2012/052128**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.:

6-10, 12-23(completely); 1-4, 11(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 SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2012/052128

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WO 2005/040814 A1 (CANCER REC TECH LTD [GB]; CALDAS CARLOS [GB]; OZDAG HILAL [GB]; BANNIS) 6 May 2005 (2005-05-06) pg 1, l 1-3; pg 3, l 14-29; pg 12, l 10-pg 13, l 21; pg 14, l 13-20; pg 17, l 12-31.</p> <p>-----</p>	1-10, 12-14, 16-22
Y	<p>WO 2008/130516 A1 (ESTELLER MANEL [ES]; FRAGA MARIO [ES]; BALLESTAR ESTEBAN [ES]; GUERRER) 30 October 2008 (2008-10-30) pg 6, l 29-pg7, l 4; pg 65, l 24-pg 66, l 25.</p> <p>-----</p>	11
Y	<p>SUZANNE H PARKER ET AL: "The roles of translation initiation regulation in ultraviolet light-induced apoptosis", MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 293, no. 1-2, 20 June 2006 (2006-06-20), pages 173-181, XP019452576, ISSN: 1573-4919, DOI: 10.1007/S11010-006-9239-Y pg 174.</p> <p>-----</p>	15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/052128

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005019826 A1	03-03-2005	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 9947924 A1	23-09-1999	AT 329264 T	15-06-2006
		AU 2934299 A	11-10-1999
		EP 1064549 A1	03-01-2001
		ES 2265682 T3	16-02-2007
		JP 3517642 B2	12-04-2004
		JP 2002507722 A	12-03-2002
		US 2008108094 A1	08-05-2008
		WO 9947924 A1	23-09-1999
WO 2005040814 A1	06-05-2005	NONE	
WO 2008130516 A1	30-10-2008	CA 2683854 A1	30-10-2008
		EP 2147124 A1	27-01-2010
		US 2010151468 A1	17-06-2010
		WO 2008130516 A1	30-10-2008

International Application No. PCT/GB2012/052128

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 6-10, 12-23(completely); 1-4, 11(partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of cancer wherein the cancer is cancer of the bladder. Methods for detecting the presence of a nucleosome containing a DNA base, nucleotide or nucleoside in a sample. Methods for detecting the presence of a nucleosome containing a DNA base, nucleotide or nucleoside in a cell. Methods for detecting or diagnosing as well as monitoring a disease status in an animal or a human subject. A biomarker and a method for identifying a DNA base, nucleotide or nucleoside biomarker for detecting or diagnosing a disease status in an animal or a human subject. A kit for detection of a nucleosome associated DNA base, nucleotide or nucleoside.

2. claims: 1-4, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of cancer wherein the cancer is a cancer of the breast.

3. claims: 1-5, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is the one the colon.

4-7. claims: 1-4, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is one of the following: cervix, esophagus, kidney, large intestine.

8-9. claims: 1-5, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is one of the following: lung, oral cavity.

10. claims: 1-4, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is the the one of ovary.

11. claims: 1-5, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is

International Application No. PCT/GB2012/052128

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

the one of pancreas.

12-15. claims: 1-4, 11(all partially)

The same as the invention 2 wherein the type of cancer is one of the following: rectum, skin , stomach.

16. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of cardiomyopathy.

17. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of systemic lupus erythematosus.

18. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of colitis.

19. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of chronic obstructive pulmonary disorder.

20. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of Crohn's disease.

21. claims: 1-3, 11(all partially)

A cell free nucleosome comprising a DNA base, nucleotide or nucleoside for use as a biomarker for the diagnosis of rheumatoid arthritis.

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, 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, VN

Fターム(参考) 4B024 AA11 CA01 CA09 CA20 HA15
4B063 QA01 QA19 QQ42 QQ79 QR48 QR51 QS33 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2014531573A5	公开(公告)日	2015-09-24
申请号	JP2014527737	申请日	2012-08-31
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		
发明人	ジャコブ ビンセント ミカレフ		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 C12Q1/68 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/57488 G01N33/585 G01N33/6875 G01N33/57411 G01N33/57415 G01N33/57419 G01N33/57423 G01N33/5743 G01N33/57434 G01N33/57438 G01N33/57446 G01N33/57449 G01N33/577 C12Q1/6804 G01N2400/10		
FI分类号	G01N33/68 G01N33/53.D C12Q1/68.A C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/DA12 4B024/AA11 4B024/CA01 4B024/CA09 4B024/CA20 4B024/HA15 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QS33 4B063/QX02		
代理人(译)	石川彻		
优先权	2011015095 2011-09-01 GB 61/530295 2011-09-01 US		
其他公开文献	JP6322845B2 JP2014531573A		

摘要(译)

本发明涉及检测或测量单核小体和寡核小体以及含有特定核苷酸的核小体的存在的方法，以及这种测量在检测和诊断疾病中的用途。本发明还涉及鉴定用于检测和诊断疾病的核小体相关核苷酸生物标记的方法，以及通过该方法鉴定的生物标记。 [选择图]无