

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517431

(P2005-517431A)

(43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/68 Z	4 B O 2 9
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
G O 1 N 37/00	G O 1 N 37/00 1 O 2	4 H O 4 5
// C O 7 K 1/22	C 1 2 N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-569787 (P2003-569787)
 (86) (22) 出願日 平成15年2月19日 (2003. 2. 19)
 (85) 翻訳文提出日 平成16年10月5日 (2004. 10. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/004661
 (87) 国際公開番号 W02003/070894
 (87) 国際公開日 平成15年8月28日 (2003. 8. 28)
 (31) 優先権主張番号 60/358, 325
 (32) 優先日 平成14年2月20日 (2002. 2. 20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/365, 459
 (32) 優先日 平成14年3月19日 (2002. 3. 19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 501149684
 ユニバーシティ オブ バージニア パテ
 ント ファウンデーション
 アメリカ合衆国, バージニア 22903
 -2442, シャルロットビル, スイート
 1-110, ウエスト メイン ストリ
 ート 1224
 (71) 出願人 305003368
 クローマ・セラピューティクス・リミテッ
 ド
 CHROMA THERAPEUTICS
 LTD.
 イギリス、オーエックス14・4アールワ
 イ、アビングドン、ミルトン・パーク92
 番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストン修飾マーカーを利用した非侵襲的診断検査

(57) 【要約】

本発明は、疾病または先天的欠陥の診断指標としての、ヒストンアミノ末端修飾に特異的な抗体の使用に関する。1つの実施態様において、ヌクレオソームが、ヒストン特異的抗体を用いて患者の血液または血清試料から単離され、そして付随するDNAが、診断およびスクリーニング上の目的で、精製され、分析される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

個体中の活性な遺伝子配列を検出する方法であって、
 該個体由来の体液試料を用意すること；
 該試料を、活性な遺伝子配列と結合する修飾されたヒストンと結合する抗体と接触させること；
 該抗体と結合したヌクレオソームを単離すること；
 該ヌクレオソームと結合したDNAを精製すること；および
 該個体中の活性な遺伝子配列を検出するために、精製DNAによりコード化される遺伝子を同定すること、
 の段階を含む、方法。

10

【請求項 2】

抗体が、
 Ala Arg Thr Lys (M) Gln Thr Ala Arg (配列番号：1)、
 Ser Gly Arg (M) Gly Lys (配列番号：2)、
 Ser Gly Arg Gly Lys (A) (配列番号：3)、
 Ser Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号：4)、および
 Ser (P) Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号：5)、
 からなる群から選択されるペプチドと特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 3】

遺伝子を同定する段階が精製DNAをシーケンスすることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

精製DNAが該シーケンス段階の前に増幅される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

遺伝子を同定する段階が、相補鎖のハイブリダイゼーションに適した条件下で、該精製DNAを既知の核酸配列と接触させることを含む（ここで、その相補体への精製DNAのハイブリダイゼーションが当該遺伝子を同定するものである）、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

精製DNAが、それを既知のDNA配列と接触させる前に標識される、請求項 5 に記載の方法。

30

【請求項 7】

既知のDNA配列が固体表面に固定化される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

体液が、尿、血液、リンパ液、血漿、または血清からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

体液が血液、血漿、または血清である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

個体中の不活性な遺伝子配列を検出する方法であって、
 該個体由来の体液試料を用意すること；
 該試料を、不活性な遺伝子配列と結合する修飾されたヒストンと結合する抗体と接触させること；
 該抗体と結合したヌクレオソームを単離すること；
 該ヌクレオソームと結合したDNAを精製すること；および
 該個体中の不活性な遺伝子配列を検出するために、精製DNAによりコード化される遺伝子を同定すること、
 の段階を含む、方法。

40

【請求項 11】

50

抗体が、
G l n T h r A l a A r g L y s (M) S e r T h r G l y V a l (配列番号：6)、

G l n T h r A l a A r g L y s (M) S e r T h r G l y G l y (配列番号：8)、および

A l a A l a A r g L y s (M) S e r A l a P r o (配列番号：9)、
からなる群から選択されるペプチドと特異的に結合する、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

遺伝子を同定する段階が、精製DNAをシーケンスすることを含む、請求項10に記載の方法。

10

【請求項13】

精製DNAが、該シーケンス段階の前に増幅される、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

遺伝子を同定する段階が、相補的配列のハイブリダイゼーションに適した条件下で、該精製DNAを既知の核酸と接触させることを含む(ここで、その相補体への精製DNAのハイブリダイゼーションが遺伝子を同定するものである)、請求項10に記載の方法。

【請求項15】

精製DNAが、それを既知のDNA配列と接触させる前に標識される、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

既知のDNA配列が固体表面に固定化される、請求項15に記載の方法。

20

【請求項17】

既知のDNA配列が固定化されたDNAマイクロアレイを含み、該固定化DNAとその相補体との結合が検出可能なシグナルを発生させる、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

体液が血液または血清である、請求項10に記載の方法。

【請求項19】

個体のアポトーシス細胞から放出されるヌクレオソームを単離する方法であって、
血液または血清試料を用意すること；

該試料を、アミノ酸配列 S e r A l a P r o A l a P r o L y s L y s G l y S e r (P) L y s L y s (配列番号：7) を含むペプチドと特異的に結合する抗体を含む組成物と接触させること；

30

アポトーシス細胞から放出されたヌクレオソームを回収するために、該抗体と結合したヌクレオソームを単離すること、
の段階を含む、方法。

【請求項20】

疾病状態と関係する染色質の変化を検出する方法であって、

ヒストタンパク質に特異的な抗体の使用により、健常個体および罹病個体から採取された試料から、ヌクレオソームの第1および第2のプールをそれぞれ作成するために、無細胞のヌクレオソームを単離すること；

40

精製DNAの第1および第2のプールを作成するために、該単離されたヌクレオソームの第1および第2のプールと結合したDNAを精製すること；

相補配列間のハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、DNAの第1および第2のプールを同一セットのDNAマイクロアレイと接触させること(ここで、精製されたプールのDNA中の配列と、マイクロアレイの核酸配列とのハイブリダイゼーションが、検出可能なシグナルを発生させるものである)；

疾病状態と関係する染色質の変化を検出するために、精製DNAの第1のプールで得られるハイブリダイゼーションパターンを、精製DNAの第2のプールに対して比較すること；

の段階からなる、方法。

50

【請求項 21】

ヒストン特異的抗体が、
 Ala Arg Thr Lys (M) Gln Thr Ala Arg (配列番号 : 1)、
 Ser Gly Arg (M) Gly Lys (配列番号 : 2)、
 Ser Gly Arg Gly Lys (A) (配列番号 : 3)、
 Ser Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 4)、
 Ser (P) Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 5)、
 Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Val (配列番号 : 6)、
 Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Gly (配列番号 : 8)、および
 Ala Ala Arg Lys (M) Ser Ala Pro (配列番号 : 9)、
 からなる群から選択されるペプチドと特異的に結合する、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

該精製 DNA が、それをマイクロアレイと接触する段階の前に増幅される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

該精製 DNA が、それをマイクロアレイと接触させる段階の前に標識される、請求項 20 に記載の方法。

20

【請求項 24】

疾病状態を検出する方法であって、
 修飾されたヒストンに特異的な抗体の使用により、個体から無細胞のヌクレオソームを単離すること；および
 単離されたヌクレオソームと結合した核酸配列の同一性を決定すること（ここで、特定の核酸配列の同定が、疾病状態の診断的特徴となるものである）；
 の段階を含む、方法。

【請求項 25】

抗体が、アミノ酸配列 Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser (P) Lys Lys (配列番号 : 7) を含むペプチドと特異的に結合する、請求項 24 に記載の方法。

30

【請求項 26】

該核酸配列が核酸をシークエンスすることにより同定される、請求項 24 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

米国政府の権利

本発明は、国立衛生研究所により授与された助成金番号 GM 40922 および GM 53512 の下、米国政府の援助で成された。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【0002】

関連出願

本出願は、2002年2月20日に出願された仮特許出願番号 60/358,325、および2002年3月19日に出願された仮特許出願番号 60/365,459（これらの記載は引用により全体として本明細書に取り込まれる）に基づき、米国特許法第119(e)条の規定による優先権を主張する。

40

【0003】

発明の分野

本発明は、様々な疾病状態を診断するための組成物および方法に関する。より具体的には、該方法は、個体の血液、血漿、または血清から無細胞のヌクレオソームを単離するために、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾により作り出される固有のヒストンエピトープに

50

特異的な抗体を用いる。

【0004】

発明の背景

真核生物において、DNAは、繰り返し染色質サブユニットであるヌクレオソームを形成するために、ヒストンタンパク質と複合体を形成する。DNAのこのパッケージングは、転写または複製の様なDNAを鋳型とするプロセスのため、DNAへアクセスしようとしているタンパク質に対して厳しい制限を設けている。ヒストンアミノ末端の翻訳後修飾は、真核生物の細胞ゲノムの染色質構造の決定、ならびに細胞遺伝子の発現の制御において、重要な働きをすることが急速に明らかになりつつある。

【0005】

ヒストンのアミノ末端「テール」ドメインで生じるアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化、およびADPリボシル化を含む、多くのヒストンの共有結合性修飾が報告された。該修飾型の多様性、および該修飾を受ける残基の顕著な特異性は、複雑な序列および組合せられた機能が不明確なままであることを示す。ヒストンアミノ末端で生じると知られている共有結合性修飾のうち、アセチル化がおそらく最も研究されており、かつ理解されている。最近の研究により、染色質中のプロモーターを標的とするための動員に回答して、ヒストンのリジン残基をそれぞれ特異的にアセチル化、または脱アセチル化する、既に特徴付けられた活性化補助因子および抑制補助因子が同定された (Berger (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11,336-341参照)。該研究は、染色質リモデリングがヌクレオソームの鋳型からの転写の制御において基礎的な働きをするという、説得力のある証拠を提供する。

10

20

【0006】

特異的な翻訳後修飾を生じるヒストンを特異的に認識する抗体の使用により、本発明者は「ヒストンコード」を解明しつつある。特に、ヒストンタンパク質、およびそれに関係する共有結合性修飾が、染色質構造を変えることができる機序 (これにより、転写の「オン・オフ」状態における遺伝的相違、あるいは特定された高次構造を定義することにより、染色体の安定的な伝播を導く) に関与するという証拠が明らかになりつつある。従って、該特異的な修飾が、結合するDNAの転写状態を示すマーカーとして働き得る。

【0007】

ヌクレオソームは、健常個体 (Stroun et al., *Annals of the New York Academy of Sciences* 906: 161-168 (2000))、ならびに罹患個体の血清で検出され得ると最近報告された。さらに、血清ヌクレオソーム濃度は、良性および悪性疾病に罹患している患者で相当高いと報告された (Holdenrieder et al., *Int J Cancer*, 95 (2): 114-120 (Mar 20, 2001))。腫瘍発生患者でのヌクレオソームの高濃度は、増殖中の腫瘍で自然発生的に生じるアポトーシス由来であると推測される。従って、患者血中のヌクレオソームの上昇した濃度の存在が、増加した細胞死と関係する疾病の診断的特徴 (diagnostic) となり得る (Holdenrieder et al., *Anticancer Res*, 19 (4A): 2721-2724 (1999))。

30

【0008】

本発明に先立ち、発明者は、検出されたヌクレオソームを含むヒストンの種類を特徴付けることなく、個体の血中に存在するヌクレオソームの総数を単純にモニターした。血中を循環しているヌクレオソームは、固有に修飾されたヒストン (ここで、固有のヒストンエピトープおよび/または結合するDNAが、特定の疾病状態と相関し得る) を含有すると予測される。従って、本発明の1つの態様は、修飾されたヒストンタンパク質と特異的に結合する抗体の使用による無細胞のモノまたはオリゴヌクレオソームの同定に関する。該修飾されたヒストンの同定は、疾病および先天的欠陥の診断マーカーとなり得る。

40

【0009】

発明の要約

本発明は、個体の体液中に存在するヌクレオソーム (ここで、ヌクレオソームは1以上の修飾されたヒストンを含む) を検出する、非侵襲的診断方法に関する。より具体的には、抗体がヒストンのアミノ末端の特異的翻訳後修飾に対して作成され、そして該抗体を用

50

いて、事前に選択された修飾されたヒストンを含有する無細胞ヌクレオソームが検出される。異なる種類の修飾されたヒストンの総数および/または割合の変化が、診断目的上用いられ得る。さらに、特定の核酸配列と結合する種類の修飾されたヒストンが、疾病状態の診断に用いられ得る。

【0010】

図面の簡単な説明

図1は、ヒトヒストンタンパク質H2A、H2B、H3、およびH4のアミノ末端で見出される翻訳後修飾を表す図である。

【0011】

発明の詳細な説明

定義

本発明の明細書および請求項において、次の用語は、以下で説明する定義にのっとり用いられる。

本明細書で用いられる用語「核酸」は、RNA、ならびに1本鎖および2本鎖DNAおよびcDNAを包含する。さらに、用語「核酸」、「DNA」、「RNA」、および同類の用語は、核酸類似体、すなわちリン酸ジエステルバックボーン以外を有する類似体も含む。例えば、当該技術分野で知られており、かつバックボーンにリン酸ジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する、いわゆる「ペプチド核酸」が本発明の範囲内であると意図されている。

【0012】

本明細書で用いられる用語「相補的」または「相補性」は、塩基対規則により関連するポリヌクレオチド(すなわち、ヌクレオチド配列)に関して用いられる。例えば、配列「A-G-T」は、配列「T-C-A」に相補的である。

【0013】

本明細書で用いられる用語「ハイブリダイゼーション」は、相補的核酸の対形成に関して用いられる。ハイブリダイゼーション、およびハイブリダイゼーションの強さ(すなわち、核酸間の結合の強さ)は、核酸間の相補性の程度、関与条件のストリンジェンシー、形成された結合の長さ、および核酸中のG:C比の様な因子により影響される。

【0014】

用語「ペプチド」は、3個のアミノ酸(ここで、アミノ酸は、天然に存在するかまたは合成(非天然に存在する)アミノ酸である)配列を包含する。ペプチド模倣物は、次の修飾のうち1つ以上を有するペプチドを含む:

1. 1個以上のペプチジル $-C(O)NR-$ 結合(ボンド)が、 $-CH_2-$ カルバメート結合($-CH_2OC(O)NR-$)、ホスホン酸塩結合、 $-CH_2-$ スルホンアミド($-CH_2-S(O)_2NR-$)結合、尿素($-NHCO)NH-$)結合、 $-CH_2-$ 第2アミン結合の様な非ペプチジル結合により、またはアルキル化ペプチジル結合($-C(O)NR-$)(ここで、Rは C_1-C_4 アルキルである)で置き換えられた、ペプチド;

2. N末端が、 $-NRR_1$ 基、 $-NRC(O)R$ 基、 $-NRC(O)OR$ 基、 $-NRS(O)_2R$ 基、 $-NHCO)NHR$ 基(ここで、Rおよび R_1 は水素であるか、または C_1-C_4 アルキルである(ただし、Rおよび R_1 は共に水素ではない)に誘導体化されている、ペプチド;

3. C末端が、 $-C(O)R_2$ (ここで、 R_2 は、 C_1-C_4 アルコキシからなる群から選択される)、および $-NRR_3R_4$ (ここで、 R_3 および R_4 は、水素および C_1-C_4 アルキルからなる群から独立して選択される)に誘導体化されている、ペプチド。

【0015】

ペプチド中の天然に存在するアミノ酸残基は、次の通り、IUPAC-IUB生化学命名法連合(Biochemical Nomenclature Commission)により推奨された方法で省略される: フェニルアラニン、PheまたはFであり; ロイシン、LeuまたはLであり; イソロイシン、IleまたはIであり; メチオニン、MetまたはMであり; ノルロイ

10

20

30

40

50

シンは、N l eであり；バリンは、V a lまたはVであり；セリンは、S e rまたはSであり；プロリンは、P r oまたはPであり；トレオニン、T h rまたはTであり；アラニン、A l aまたはAであり；チロシン、T y rまたはYであり；ヒスチジンは、H i sまたはHであり；グルタミンは、G l nまたはQであり；アスパラギンは、A s nまたはNであり；リシンは、L y sまたはKであり；アスパラギン酸は、A s pまたはDであり；グルタミン酸は、G l uまたはEであり；システインは、C y sまたはCであり；トリプトファンは、T r pまたはWであり；アルギニンは、A r gまたはRであり；グリシンは、G l yまたはGであり、そしてXは任意のアミノ酸である。他の天然に存在するアミノ酸は、例えば、4 - ヒドロキシプロリン、5 - ヒドロキシリジン等を含む。

【0016】

本明細書で用いられる用語「保存的アミノ酸置換」は、次の5つの群のうち1つとの交換として、本明細書で定義される：

I . 小さい、脂肪族、非極性、またはわずかに極性の残基：

A l a、S e r、T h r、P r o、G l y；

II . 極性、負に荷電した残基、およびそのアミド：

A s p、A s n、G l u、G l n；

III . 極性、正に荷電した残基：

H i s、A r g、L y s；

IV . 大きい、脂肪族、非極性の残基：

M e t、L e u、I l e、V a l、C y s；

V . 大きい、芳香族性残基：

P h e、T y r、T r p。

【0017】

本明細書で用いられる用語「精製された」および類似の用語は、天然環境中の分子または化合物と一般的に関係する他の要素が実質的にない（少なくとも60%ない、好ましくは75%ない、そして最も好ましくは90%ない）形態の分子または化合物の単離に関する。

【0018】

用語「疾病状態」は、先天的欠陥、癌の様な病的状態、および環境因子および病原菌（細菌、ウイルス等）に対する応答性を含む、生きている動物または植物の正常状態の障害と関係するいずれかの状態を包含することが意図されている。

【0019】

「治療薬剤」、「医薬剤」、または「薬剤」は、患者の疾患、苦痛、疾病、または傷害の処置（予防、診断、緩和、または治療を含む）において用いられる任意の治療、または予防薬剤を意味している。

【0020】

本明細書で用いられる用語「処置すること」は、特異的な疾患または状態と関係する症状を緩和すること、および/または該症状を予防または除去することを含む。例えば、癌を処置することは、癌細胞の成長および/または分裂を予防すること、または遅延させること、ならびに癌細胞を殺すことを含む。

【0021】

本明細書で用いられる用語「医薬的に許容される担体」は、リン酸緩衝食塩水溶液、および油/水または水/油乳濁液の様な水および乳濁液、および様々な種類の湿潤剤の様な、任意の標準的な医薬担体を包含する。

【0022】

本明細書で用いられる用語「抗体」は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、またはF a b、F (a b ')₂、およびF vフラグメントの様なその結合フラグメントを意味している。

本明細書で用いられる用語「非経腸」は、皮下、静脈内、または筋肉内投与を含む。

【0023】

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる用語「修飾されたヒストン」は、H2A、H2B、H3、およびH4からなる群から選択されるヒストンタンパク質（ここで、アミノ末端の少なくとも30個以上のアミノ酸残基のうち1個以上が、アセチル化、メチル化、リン酸化、またはユビキチン化により翻訳後修飾されている）を意味している。

【0024】

本明細書で用いられる用語「修飾されたアミノ酸」は、アミノ酸と共有結合した1個以上の修飾基を含むアミノ酸残基を含む。例えば、それぞれの修飾されたリジン残基は、モノ-、ジ-、またはトリ-メチル化されるためのキャパシティーを有し、そして一般的にメチル化リジンについては、該可能性の3つ全てを包含することが意図されている。

【0025】

本明細書で用いられる用語「活性な遺伝子配列」は、転写活性に適任である遺伝子を意味している。

本明細書で用いられる用語「不活性な遺伝子配列」は、転写活性に適任でない遺伝子を意味している。

【0026】

発明

ヌクレオソームが患者の血中で検出され得ること、および血液ヌクレオソーム濃度レベルの上昇が癌の診断的特徴となることが、最近報告された。しかしながら、この先行研究はヌクレオソーム集団の総数を単純にモニターし、ヒストンの中身に基つき、互いに異なるヌクレオソームの部分集団を説明していない。本発明者は、ヒストンの特定の翻訳後修飾が、染色質構造を変化させ得る機序に寄与することを発見した。そして、該染色質リモデリングは、ヌクレオソームの鋳型からの転写の制御において基礎的な働きをすると信じられている。さらに、本発明者は、ヌクレオソームがアポトーシスの過程を通じて、翻訳後修飾を維持することを最初に証明した。具体的には、実施例1に記載のアポトーシスを経験した乳腺癌細胞由来のヌクレオソームは、そのメチル化、リン酸化、またはアセチル化修飾を維持し、そして該修飾が、該修飾に対して生じた特異的抗体を用いて検出され得る。

【0027】

本発明は改良された疾病の診断検査に関し、これは、無細胞の修飾されたヌクレオソーム集団の上昇、または変更された染色質構造の存在について、温血動物の血液をスクリーニングすることを含む。より具体的には、本発明は、ヒストンペプチドのアミノまたはカルボキシ末端の翻訳後修飾と特異的に結合する抗体の使用に関する。検出されたヌクレオソーム上の固有のヒストンの存在は、染色質構造、および修飾されたヒストンタンパク質と結合する核酸配列の転写活性に関する情報を提供する。

【0028】

従って、本発明は、哺乳類、より好ましくはヒトの血液（および、他の体液）からヌクレオソームを単離するために、コアヒストンタンパク質のフレキシブルなN末端およびC末端テール上の翻訳後修飾により形成された固有のエピトープに対して特異的な抗体を用いる、改良された診断スクリーニングに関する。本発明で用いる固有のエピトープとして働くヒストンアミノ酸残基の適当な翻訳後修飾が、図1に記載されている。個体血中の特異的なヒストン修飾を1個以上検出することは、特定の疾病状態の診断的特徴となる。

【0029】

本発明の1つの実施態様をに従って、活性な遺伝子配列（真性染色質）、または不活性な遺伝子配列（異質染色質）と結合する固有のヒストンマーカーに対する抗体を用いて、疾病状態を示す不適当な遺伝子発現を検出可能である。例えば、個体の血中または他の体液中に存在するヌクレオソーム集団のスクリーニングは、腫瘍抑制遺伝子の不活性化、あるいは癌遺伝子の活性化を明らかにする。

【0030】

個体中の該活性化または不活性化遺伝子配列の検出方法は、個体から体液試料を得る段階、および修飾されたヒストンに特異的な抗体を用いて、該試料からヌクレオソームを単

10

20

30

40

50

離する段階を含む。該ヌクレオソームは、尿、血液、リンパ液、血漿、または血清を含む 1 以上の患者体液から回収可能である。従って、疾病状態を診断するための最小限に侵襲性のスクリーニングを提供する。1つの実施態様において、該ヌクレオソームは、個体の血液、血漿、または血清から回収される。体液中に存在するヌクレオソームの安定性を増強するために、該試料は好ましくは 10 mM EDTA で処理され、そして -20 で保存される。修飾されたヒストンを標的とする抗体との免疫沈降の前処理 (precursor) として、血液、血漿、または血清中のヌクレオソームは、ポリ-リジンまたはストレプトアビジンでコートされた固体支持体への集積により、まず濃縮され得る。後者の方法は、ストレプトアビジンでの捕獲に先立ち、ヒストンを優先的にビオチン化するために、血中に存在するビオチン化トランスフェラーゼ活性を利用する (Hymes & Wolf, J. Nutr. 129, 485S-489S, 1999)。

10

【0031】

本発明で用いられる抗修飾ヒストン抗体は、ヒストンテールの翻訳後修飾により形成される既知のヒストンエピトープを標的とする抗体のいずれからでも選択され得る。本発明で用いられる抗体のエピトープとして使用され得る、ヒストンテールのいくつかの翻訳後修飾のリストが、図 1 で提供される。該抗体をそれぞれ用いて、対応する修飾されたヒストンを含有する患者血中に存在するヌクレオソームを単離できる。血中の修飾されたヒストンの同定は、特定の疾病または疾患を示し得る。個体中の該抗体により検出された無細胞のヌクレオソーム数の有意な増加 (野生型レベルと比べて)、および / または別のヒストン修飾と比べて、1 以上の特定のヒストン修飾の割合の変化は、特定の疾病状態を示し得る。

20

【0032】

1つの実施態様において、活性な遺伝子配列と結合すると知られている修飾されたヒストンと結合するか、あるいは不活性な遺伝子配列と結合する修飾されたヒストンと結合する抗体が、選択される。遺伝子活性化と関係するものとして同定されたヒストンエピトープは、次のものを含む：

30

Ala Arg Thr Lys (M) Gln Thr Ala Arg (配列番号 : 1)、

Ser Gly Arg (M) Gly Lys (配列番号 : 2)、

Ser Gly Arg Gly Lys (A) (配列番号 : 3)、

Ser Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 4)、および

Ser (P) Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 5)、

ここで、「Ser (P)」、「Arg (M)」、および「Lys (A)」は、それぞれ、修飾されたアミノ酸であるリン酸化セリン、メチル化アルギニン、およびアセチル化リジンを表す。1つの実施態様において、抗体は、配列番号 : 1 を含むペプチド配列 (ここで、リジン残基はジメチル化されている) に特異的である。遺伝子不活性化と関係するものとして同定されたヒストンエピトープは、次のものを含む：

Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Val (配列番号 : 6)、

Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Gly (配列番号 : 8)、

40

Ala Ala Arg Lys (M) Ser Ala Pro (配列番号 : 9)。

【0033】

1つの実施態様において、抗体は、配列番号 : 8 を含むペプチド配列 (リジン残基がジメチル化されている) に特異的である。該抗体を用いて、疾病状態を示す如何なる異常遺伝子発現も検出できる。

【0034】

または、ヌクレオソームと結合する核酸配列 (ヒストン修飾の 1 つの特異的な抗体を用いた免疫沈降により、血液から単離される) は、疾病状態または疾病の可能性の診断を補助するための標準的な技術 (すなわち、潜在ウイルスの同定、または他の遺伝子前提条件

50

)を用いて分析され得る。

【0035】

本発明の1つの実施態様に従って、個体の体液由来のヌクレオソームが、本発明の修飾されたヒストンに特異的な抗体のうち1以上を用いた免疫沈降により単離される。または、本発明の修飾されたヒストンに特異的な抗体は、試料から無細胞のヌクレオソームを単離する方法を提供するための不溶性支持体に結合され得る。該支持体は、粒子または固体形であり、プレート、試験管、ビーズ、球、フィルター、または膜を含み得るが、これらに限られない。不溶性支持体に抗体を固定する方法は、当該技術分野の技術者に既知である。1つの実施態様において、本発明の抗体は、アフィニティークロマトグラフィーで用いるのに適当な不溶性支持体に固定される。標的とする抗原との抗体の特異的な結合を可能とするのに適した条件下で、試料が修飾されたヒストンに特異的な抗体と接触させられた後、修飾されたヒストンを含むヌクレオソームが、当該技術分野の技術者に知られた標準的技術を用いて単離され得る。

10

【0036】

ヌクレオソームが試料から単離されると、ヌクレオソームと結合したDNAが、PCRまたは他の増幅技術により、標準的な技術(回収されたDNAを必要に応じて増幅することを含む)を用いて回収され得る。1つの実施態様に従って、免疫沈降されたヌクレオソームと結合したDNAが精製され、そして該DNAによりコード化される遺伝子が同定される。体液試料からヌクレオソームをまず単離するために用いられた特異的な抗体に依存して、該方法は、個体中の活性または不活性な遺伝子のいずれかを同定することが可能となる。

20

【0037】

単離されたヌクレオソームと結合したDNAによりコード化される遺伝子を同定するために用いられる段階は、当該技術分野の技術者に既知の分析的方法のいずれかを含む。1つの実施態様に従って、該遺伝子配列は、精製されたDNAを直接マイクロシーケンスすることにより同定される。または、1つの実施態様において、精製されたDNAは、PCR技術または他の増幅技術を用いてまず増幅され、その後配列分析の様なDNA分析がさらになされる。

【0038】

1つの実施態様において、単離されたヌクレオソームと結合したDNAによりコード化される遺伝子は、相補的配列のハイブリダイゼーションに適した条件下で、既知の核酸配列と精製されたDNAを接触させることにより同定され得る(ここで、その相補鎖への精製DNAのハイブリダイゼーションが当該遺伝子を同定するものである)。例えば、既知のDNA配列または精製されたDNAのいずれかが標識プローブとして働き、そして非標識配列が固体表面に固定される、サザンロット分析が行われ得る。

30

【0039】

核酸プローブは、当該技術分野で既知の標準的技術(本発明は、特定の検出システムまたは標識のいずれかに制限されることを意図していない)を用いて検出可能なマーカで標識され得る。例えば、核酸プローブは、フルオロフォア、放射性同位元素、またはビオチンまたはジコキシゲニンの様な非同位体標識物質で標識され得る。

40

【0040】

1つの実施態様に従って、重要な種々の遺伝子を表す既知の核酸配列が、固体表面に固定化される。好ましくは、該配列はマイクロアレイ(既知の配列それぞれが固体表面上の位置を決められている)の形で固定化される。該方法において、相補鎖と精製されたヌクレオソームDNA配列のハイブリダイゼーションにより固体表面の特定の領域で形成されたシグナルによって、該配列によりコード化される遺伝子を同定する。1つの実施態様において、精製されたヌクレオソームDNAが標識され(そして、1つの実施態様においては、DNAが増幅され、続いて標識される)、続いて、相補的配列とのハイブリダイゼーションに適した条件下で、既知の配列のマイクロアレイと接触させられる。事前に決めた時間をおいた後、未結合および非特異的結合物質が該マイクロアレイから洗い出され、そ

50

して該アレイが検出可能なシグナルについてスクリーニングされる。

【0041】

本発明は、アポトーシスを介した細胞死の増加により特徴付けられる疾病状態（例えば、癌）を診断するためのアポトーシスマーカーを利用する方法も包含する。個体中の新生物細胞の存在は、該新生物細胞のアポトーシスの結果として血中のヌクレオソームレベルを上昇させることが示された。従って、本発明者は、ヌクレオソームの分析をアポトーシス細胞から放出されたものに限ることにより、診断スクリーニングの感度を上昇させることを意図している。ひとつのヒストンエピトープが、アポトーシスマーカーとして働くことが同定された（国際特許出願番号PCT/US02/24405を参照。この記載は本明細書に取り込まれる）。該エピトープに対する抗体が、様々な人工的な刺激で刺激されて、アポトーシス細胞死経路に入った細胞を同定する。該抗体は、ヒストンH2Bのアミノ末端ペプチドSer Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser (P) Lys Lys (配列番号：7) (ここで、「Ser (P)」はリン酸化セリンを表す) に対するものである。該抗体を用いて、アポトーシス細胞から放出されたヌクレオソームを選択的に単離できる。

10

【0042】

従って、本発明の1つの態様において、該「アポトーシス抗体」を用いて、アポトーシス/増幅された細胞死と関係する疾病の診断指標として、患者の体液中に存在するヌクレオソームを検出できる。H2Bのアミノ末端から14番目の位置にあるセリンアミノ酸 (Ser 14) は、アポトーシス過程をこれから経験するかまたは既に始まった細胞において、生体内で選択的にリン酸化されるので、該抗体は、疾病を有するかまたは生じるリスクのある個体のアポトーシス細胞から放出された、血中に存在するヌクレオソームを検出するために高感度となる。それゆえ、該抗体は、個体の疾病状態を検出するための特に有効な診断的特徴となる。該診断方法は、血液、血漿、または血清試料を得る段階、該試料を、ペプチドSer Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser (P) Lys Lys (配列番号：7) の様なSer 14の位置でリン酸化されるヒストンH2Bアミノ末端ペプチドに特異的な抗体を含む組成物と接触させる段階、およびアポトーシス細胞から放出されたヌクレオソームを回収するために該抗体と結合したヌクレオソームを免疫沈降する段階を含む。アポトーシスマーカーの抗体で免疫沈降されたヌクレオソームの閾値が、アポトーシス/増幅された細胞死と関係する疾病状態を予測する

20

30

【0043】

1つの実施態様に従って、患者から単離された無細胞のヌクレオソームと結合したDNAを分析することにより、患者の腫瘍関連遺伝子を検出する方法が提供される。該実施態様に従って、無細胞のヌクレオソームが、ヒストンタンパク質と特異的に結合する1以上の抗体を用いて、体液から単離される。該ヌクレオソームは免疫沈降され、結合DNAが精製され、精製されたDNA配列によりコード化される遺伝子を同定するための分子分析技術の対象とされる。1つの実施態様において、免疫沈降されたヌクレオソームから回収されたDNAは、PCRを介して必要に応じて増幅され、続いて該DNAが、相補的な核酸配列のハイブリダイゼーション (ここで、核酸2本鎖の形成により検出可能なシグナルが生じる) に適した条件下で、核酸マイクロアレイと接触させられる。該方法において、無細胞のヌクレオソームと結合したDNAによりコード化される遺伝子が、同定され得る。無細胞のヌクレオソームと結合したDNAによりコード化される特定の遺伝子を同定することは、処置に起因する好ましい効果ならびに副作用についてモニターすることを含む、治療上の処置をモニターするのに特に有用である。さらに、ヒストンのアミノおよびカルボキシテルの翻訳後修飾により作成される、ある種のヒストンエピトープを標的とする抗体を選択することにより、無細胞のヌクレオソームのある種のサブセットが免疫沈降され、そして結合DNAが分析される。

40

【0044】

1つの実施態様に従って、腫瘍関連遺伝子を検出すること、または成人女性中の胎児D

50

NAを同定する方法が提供される。該方法は、対象の胎児または腫瘍遺伝子と結合した固有に修飾されたヒストンタンパク質を利用して、胎児のDNAか、または原発腫瘍のDNAを単離する段階を含む。例えば、国際特許出願番号PCT/US01/26283で既に記載された抗体は、リジン9でアセチル化されたヒストンと結合するDNAを特異的に沈殿させる。母親のDNAと比べて、胎児中の対象の遺伝子と結合したヒストンの異なるアセチル化が、胎児DNAの単離および同定を可能とする。具体的には、ヌクレオソームを生じる胎児DNAが選択的に沈殿され、そして該DNAがPCRまたは別の増幅技術により回収される。免疫沈降されたヌクレオソームから回収されたDNAのシーケンスは、胎児遺伝子、または腫瘍細胞と関係する核酸配列中の変異の存在または不存在の同定を可能とする。従って、該技術は、胎児の遺伝子欠陥のスクリーニング、ならびに早期癌のスクリーニングのための重要な非侵襲的技術となり得る。 10

【0045】

本発明の1つの重要な態様において、該方法を用いて、胎児が特定の遺伝子欠陥のヘテロ接合体、あるいはホモ接合体であるかを決定できる。それゆえ、1つの態様において、本発明は、母親がその病気のキャリアーであるときでさえ適切であるという利点を有する、遺伝子疾病および形質の非侵襲的出生前診断を可能とする。さらに、該出生前診断は、家族調査を必要とせずに行われ得る。

【0046】

1つの実施態様において、本発明の抗体が標識される。本発明が特定の検出システムまたは標識に限られることは意図されていない。抗体は、フルオロフォア、放射性同位元素、またはビオチンまたはジコキシゲニンの様な非放射性標識試薬で標識される；ビオチンを含む抗体は、蛍光色素の様な任意の検出可能な標識と結合した「検出試薬」（例えば、アビジン）を用いて検出される。1つの実施態様において、本発明のヒストン特異的抗体は、2次抗体（ここで、2次抗体は標識され、かつ1次（ヒストン特異的）抗体に特異的である）の使用により検出される。または、該ヒストン特異的抗体は、放射性同位元素、またはFITCまたはローダミンの様なフルオロフォアで直接標識され；かかる場合、2次検出試薬は、標識プローブの検出に必要とされない。続いて、血中の修飾されたヒストンの存在が、関連標識抗体の使用により検出され得る。 20

【0047】

1つの実施態様に従って、疾病状態と関連する染色質変化を検出する方法が提供される。該方法は、ヌクレオソームの第1および第2のプールをそれぞれ作り出すために、健常個体および罹病個体から採取された生物学的試料から、無細胞のヌクレオソームを単離する段階を含む。典型的には、該生物学的試料は、血液試料またはその派生物（例えば、血清または血漿）を含むが、リンパ液、尿、唾液の様な、細胞外DNAを含む他の体液も用いられ得る。1つの好ましい実施態様において、ヌクレオソームは、1以上のヒストン特異的抗体の使用により、生物学的試料から回収される。1つの実施態様において、ヒストン特異的抗体は、図1で示されるヒストンのアミノおよびカルボキシテールの翻訳後修飾の1つにより、作られるエピトープと結合する抗体である。1つの実施態様において、ヒストン特異的抗体は、 30

Ala Arg Thr Lys (M) Gln Thr Ala Arg (配列番号 : 1)、 40

Ser Gly Arg (M) Gly Lys (配列番号 : 2)、

Ser Gly Arg Gly Lys (A) (配列番号 : 3)、

Ser Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 4)、

Ser (P) Gly Arg (M) Gly Lys (A) (配列番号 : 5)、

Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Val (配列番号 : 6)、

Gln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Gly (配列番号 : 8)、および

Ala Ala Arg Lys (M) Ser Ala Pro (配列番号 : 9)、 50

からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むペプチドと結合する抗体である。

【0048】

1つの実施態様において、該ヒストン特異的抗体は、ペプチドAla Arg Thr Lys (M) Gln Thr Ala Arg (配列番号：1)、またはGln Thr Ala Arg Lys (M) Ser Thr Gly Gly (配列番号：8)と結合する抗体である。

【0049】

生物学的試料からヌクレオソームを単離後、該単離されたヌクレオソームと結合したDNAが、精製されたDNAの第1および第2のプール(健常個体から回収されたDNAのセット、および特定の疾病状態に罹患している個体から回収されたDNAのセット)を作成するために、ヌクレオソームの第1および第2のプールから精製される。続いて、該精製されたDNAが、DNAシーケンス、核酸ハイブリダイゼーション分析(サザンブロット分析を含む)、PCR増幅、または別のスクリーニング法の様な標準的分子技術を用いて分析され、精製されたDNA配列の2つのプール間の違いが同定される。核酸配列の2つのプールのうち1つにだけ存在する核酸配列が、疾病状態と関係する可能性のある発現/抑制遺伝子(ヌクレオソームを単離するために用いられた抗体に依存する)を表す。

10

【0050】

1つの実施態様に従って、健常および非健常個体の無細胞ヌクレオソームから回収されたDNAの2つのプールは、相補的配列間のハイブリダイゼーションを可能とする条件下で、同一セットのDNAマイクロアレイとそれぞれ別々に接触させられる。該マイクロアレイは、特定の疾病と関係するDNAのサブセットを含有するか、あるいは1以上の特定の細胞種類および発生ステージで発現する配列の全セットを含有する。該既知配列は、固体表面、またはマイクロアレイを形成するための「チップ」上に固定化され得る。該マイクロアレイは、当該技術分野の技術者に知られた技術を用いて用意され得る。該マイクロアレイは、精製されたDNAのプール由来のヌクレオソーム中の配列とマイクロアレイの核酸配列とのハイブリダイゼーションが、検出可能なシグナルを発生するように設計される。

20

【0051】

1つの実施態様において、精製されたヌクレオソームDNAの2つのプール(すなわち、健常および非健常供給源由来)が標識され、マイクロアレイと接触させられる。そして1つの実施態様においては、該DNA配列がPCRにより増幅され、標識され、そして該配列がマイクロアレイと接触させられる。続いて、未結合および非特異的結合物質を除去するための該アレイの洗浄により、マイクロアレイ上に存在する既知の配列と特異的に結合する標識配列の検出が可能となり、従って、標識配列の同一性(identity)が明らかとなる。さらに、精製DNAの第2のプールと、精製DNAの第1のプールで得られたハイブリダイゼーションパターンの比較により、疾病状態と潜在的に関係する染色質変化が明らかとなる。

30

【0052】

ある種の遺伝子が特定の疾病状態と関係するとして同定されると、続いて該遺伝子配列が本方法論を用いる診断検査のための基礎を形成し得る。1つの実施態様に従い、病変をスクリーニング/検出する方法は、修飾されたヒストンに特異的な抗体の使用により、個体から無細胞のヌクレオソームを単離する段階、および単離されたヌクレオソームと結合した核酸配列の同一性を決定する段階を含む。該配列の同一性は、配列分析によるか、または既知の配列とのハイブリダイゼーションにより決定され得る。事前に選択された特定の核酸配列の同定が、疾病状態の診断的特徴となる。例えば、癌と関係すると既に明らかな癌遺伝子または遺伝子変異の存在は、事前に選択される特定の配列を決定する。

40

【0053】

染色質免疫沈降DNAを現在のゲノムマイクロアレイ技術と組み合わせることにより(チップ上)、「ヒストンコード」と関連する配列と結合する固有の修飾されたヒストンと関連するヒト(または他の)ゲノムの任意の位置を調べることが可能である。例えば、メ

50

チル (K 4) H 3 抗体 (配列番号 : 1 の配列に特異的) を用いて免疫沈降された D N A が、固体表面または「チップ」上に固定化され、従って、転写に適する与えられた細胞の全核酸配列を表す。同様に、メチル (K 9) H 3 抗体 (配列番号 : 6 の配列に特異的) を用いて免疫沈降された D N A が、固体表面または「チップ」に固定化され、従って、転写に適さない与えられた細胞の全核酸配列を表す。個体の血液からヌクレオソームを収集すること、結合した D N A を回収すること、該 D N A を標識すること、続いて標識された D N A を、固定化された D N A マイクロアレイとハイブリダイゼーションさせることで、遺伝子の異常発現を明らかにする。相違は、定性的ならびに定量的に測定され得る。該情報を知ることは、様々なヒト癌において、鍵となる腫瘍抑制遺伝子または癌遺伝子のタンパク質のオン / オフ状態を決定する際に非常に有益である。

10

【 0 0 5 4 】

1 つの実施態様において、染色質の免疫沈降を用いて、マイクロアレイの使用により、広範囲のゲノムでの活性な遺伝子の位置を決定する。例えば、1 つの好ましい実施態様において、免疫沈降された染色質の 2 つのプール (すなわち、疾病および健常組織由来の免疫沈降された染色質) を含む方法は、当該技術分野の技術者に知られた標準的技術を用いる遺伝子チップ、D N A マイクロアレイ、またはプロテオミクスチップの使用を含む。例えば、W O 0 1 / 1 6 8 6 0、W O 0 1 / 1 6 8 6 0、W O 0 1 / 0 5 9 3 5、W O 0 0 / 7 9 3 2 6、W O 0 0 / 7 3 5 0 4、W O 0 0 / 7 1 7 4 6、および W O 0 0 / 5 3 8 1 1 (これらの記載は、本明細書に特に取り込まれる) で記載されるシステムのいずれかが、本発明での使用に適している。好ましくは、チップの特定の位置での免疫沈降された染色質の相互作用が明らかとなり、該チップは、免疫沈降された染色質と結合した D N A 配列の単離が可能となるように、既知の D N A 配列の様な既知化合物の所定アレイを含有する。

20

【 0 0 5 5 】

様々な修飾がヒストンコードと関連するので、該技術の鍵は、それらに特異的な抗体を使用することである。ヒトおよび他のゲノムに対してのこの適用は、エピゲノムの基礎となる。本発明は、それぞれのオン / オフ抗体として、L y s 4 / L y s 9 メチル H 3 抗体の使用を詳述したが、この概念は、「ヒストンコード」に対して形成される抗体の全てに対してより一般的に適用される。例えば、L y s 9 メチル対 S e r 1 0 ホスホ H 3 抗体は、分化対増殖を制御する「メチル / ホスホ」スイッチもある。本発明は、H 3 リジン 2 7 および 3 6、および H 4 リジン 2 0 を含む H 3 および H 4 ヒストンのアミノ末端の別のメチル化領域に対する抗体も包含する。該抗体を生成するために用いられるペプチドは、次に挙げられる：

30

H 3 リジン 2 7 : A A R K (M) S A P V C G (配列番号 : 1 0)

H 3 リジン 3 6 : S G G V K (M) K P H K C G (配列番号 : 1 1)

H 4 リジン 2 0 : R H R K (M) I L R D C G (配列番号 : 1 2)

(ここで、K (M) はメチル化されたリジン残基を表し、下線を引いた G C は、該抗体の生成のため、H 3 配列に加えられたアミノ酸を意味している) 。

【 0 0 5 6 】

実施例 1

アポトーシス細胞由来のオリゴヌクレオソームの検出

M D A - M B - 4 6 8 ヒト乳腺癌細胞を、1 0 % ウシ胎児血清を添加した Leibovitz 培地中に 1.75×10^6 細胞 / 25 cm^2 で播種した。対数増殖中である 4 8 時間後に、3 つのフラスコの細胞を、0 . 1 ~ 0 . 3 M タキソールまたは D M S O (ビークル、最終濃度 0 . 0 0 2 %) で、3 7 にて 8 または 1 8 時間刺激した。

40

【 0 0 5 7 】

続いて細胞を、ダルベッコリン酸緩衝食塩水 $2 \times 10 \text{ ml}$ でそっと洗浄し、続いて最小容量 ($200 \text{ L} / 25 \text{ cm}^2$) の可溶化バッファー：

5 0 m M T r i s - H C l、p H 7 . 4、

1 5 0 m M N a C l、

50

1% トリトン - X 100、
 2.5 mM ピロリン酸ナトリウム、
 10 mM グリセロリン酸塩、
 中で、室温にて30分間可溶化した。

【0058】

これに、最終濃度：

10 mM EDTA、
 200 ng/ml トリコスタチン A、
 2 M スタウロスポリン、
 1 M オカダ酸、
 0.5 M シベルメトリン、
 500 M AEBSF (PMSFに代わる安定なもの)、
 1 g/ml アプロチニン、
 1 M E-64、
 1 M ロイペプチン、

10

となる様に設計された阻害剤カクテルを添加して、直ちに使用した。

【0059】

続いて、洗剤に不溶性(非分画)の染色質、未変性の核および細胞をペレットとするために、細胞溶解物を4にて325gで10分間遠心した。必要に応じて生成されたモノおよびオリゴヌクレオソームの濃縮物を含有する上清を回収し、等分して-80で保存した。続いて、試料を、ELISA (Roche diagnosticのキット：カタログ番号1774425)でヌクレオソームの中身について、およびリン酸化、アセチル化、またはメチル化ヒストンに特異的な抗体シリーズを用いるウエスタンブロット(Upstate)により、タンパク質レベルでの「マークした」ヌクレオソームの存在について分析した。

20

【0060】

ELISAは、ピークルと比べて、8時間タキソールで処理した細胞上清中で約40~45倍濃縮したヌクレオソームを示す。最大添加量(16L/ウェル)の細胞溶解物含有ヌクレオソームを、MESバッファースystem (Novex)を用いたNuPAGE 12% Bis-Trisゲル(還元)での電気泳動により、分離した。ニトロセルロース膜に移した後、4で一晩、メチル化ヒストンH3(Lys-4)、リン酸化ヒストンH3(Ser-10)、およびアセチル化ヒストンH3(Lys-14)に特異的なポリクローナルウサギ抗体で、ブロットにプローブ結合させた。続いて、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-1-リン酸塩/ニトロブルーテトラゾリウム色素生産性基質(Invitrogen)と結合した、アルカリホスファターゼ結合抗ウサギヤギ抗体を用いて、タンパク質を目に見えるようにした。ヌクレオソームがアポトーシス過程を通じて、リン酸化、アセチル化、およびメチル化ヒストン成分を維持していることを示す陽性結果を、「マークしたヒストン特異的」抗体の両方で得た。

30

【図面の簡単な説明】

【0061】

【図1】図1は、ヒトヒストンタンパク質H2A、H2B、H3、およびH4のアミノ末端で見出される翻訳後修飾を表す図である。

40

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> The University of Virginia Patent Foundation
 Allis, C. David
 5 Bruns, David E.
 Drummond, Alan H

<120> A Non-Invasive Diagnostic Test Utilizing Histone Modification
 Markers
 10

<130> 00753-02

<150> US 60/358,325
 <151> 2002-02-20
 15

<150> US 60/365,459
 <151> 2002-03-19

<160> 10
 20

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 8
 25 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 30 <222> (4)..(4)
 <223> METHYLATION

<400> 1
 35
 Ala Arg Thr Lys Gln Thr Ala Arg
 1 5

	<210> 2		
	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
5			
	<220>		
	<221> MOD_RES		
	<222> (3)..(3)		
	<223> METHYLATION		
10			10
	<400> 2		
	Ser Gly Arg Gly Lys		
15	1	5	
	<210> 3		
	<211> 5		
20	<212> PRT		20
	<213> Homo sapiens		
	<220>		
	<221> MOD_RES		
25	<222> (5)..(5)		
	<223> ACETYLATION		
	<400> 3		
30			30
	Ser Gly Arg Gly Lys		
	1	5	
	<210> 4		
35	<211> 5		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
			40

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> METHYLATION

5

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> ACETYLATION

10

10

<400> 4

15 Ser Gly Arg Gly Lys
1 5

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

20

20

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> PHOSPHORYLATION

25

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> ACETYLATION

30

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> METHYLATION
 5

 <400> 5

 Ser Gly Arg Gly Lys
 10 1 5 10

 <210> 6
 <211> 9
 15 <212> PRT
 <213> Tetrahymena thermophila

 <220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (5)..(5) 20
 <223> METHYLATION

 <400> 6
 25
 Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Val
 1 5

 30 <210> 7 30
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Phosphorylation
 40

<400> 7

 Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys Lys
 1 5 10
 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens 10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 15 <223> methylation

<400> 8

 Gln Thr Ala Arg Lys Ser Thr Gly Gly
 1 5
 20

<210> 9
 25 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220> 30
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> methylation

35 <400> 9

 Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro
 1 5
 40

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
10 <223> methylation 10

<400> 10

15 Ala Ala Arg Lys Ser Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10

<210> 11
20 <211> 11 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
25 <221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> methylation

30 <400> 11 30

Ser Gly Gly Val Lys Lys Pro His Lys Cys Gly
1 5 10

35

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> methylation

10

<400> 12

Arg His Arg Lys Ile Leu Arg Asp Cys Gly

15

1

5

10

10

【 図 1 】

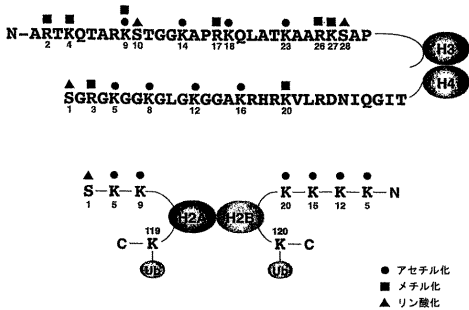


図 1

【手続補正書】

【提出日】平成16年10月5日(2004.10.5)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

2005517431000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/04661
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/68; G01N 33/53 US CL : 435/6, 7.1 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) U.S. : 435/6, 7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) West Dialog Embase Biosis Medline WPID		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	US 6,468,537 B1 (DATTA et al) 22 October 2002 (22.10.2002), see entire document.	1-26
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 September 2003 (29.09.2003)	Date of mailing of the international search report 12 DEC 2003	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer Patrick J. Nolan Telephone No. 703-308-0196	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18	C 1 2 N 15/00	F
C 1 2 M 1/00	C 0 7 K 1/22	
	C 0 7 K 16/18	
	C 1 2 M 1/00	A

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

(74) 代理人 100062144

弁理士 青山 稜

(74) 代理人 100067035

弁理士 岩崎 光隆

(74) 代理人 100064610

弁理士 中嶋 正二

(74) 代理人 100072730

弁理士 小島 一晃

(72) 発明者 シー・デイビッド・アリス

アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、イースト・6 3 ストリート 5 0 4 番、ア
パートメント 2 3 - ピー

(72) 発明者 デイビッド・イー・ブランズ

アメリカ合衆国 2 2 9 4 3 バージニア州グリーンウッド、グリーンウッド・ステーション・ロード
7 6 2 1 番

(72) 発明者 アラン・エイチ・ドラモンド

イギリス、オーエックス 2 9 ・ 7 アールワイ、オックスフォードシャー、ウィットニー、スタンド
レイク、ハイ・ストリート 1 4 番

F ターム(参考) 4B024 AA12 CA02 CA05 CA09 HA14

4B029 AA07 FA12

4B063 QA13 QA19 QQ03 QQ43 QR40 QR55 QR62 QR84 QS25 QS34

4H045 AA11 CA42 DA75 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	使用组蛋白修饰标记的无创诊断测试		
公开(公告)号	JP2005517431A	公开(公告)日	2005-06-16
申请号	JP2003569787	申请日	2003-02-19
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚大学专利基金会 色品疗法有限公司		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚专利大学基金会 色度治疗有限公司		
[标]发明人	シーデイビッドアリス デイビッドイーブランス アランエイチドラモンド		
发明人	シー・デイビッド・アリス デイビッド・イー・ブランス アラン・エイチ・ドラモンド		
IPC分类号	C07K1/22 C07K16/18 C12M1/00 C12N15/09 C12P19/34 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68 G01N37/00		
CPC分类号	G01N33/6842 C12Q1/6809 G01N33/5308 G01N33/68 G01N33/6875		
FI分类号	C12Q1/68.ZNA.A C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N15/00.A C12N15/00.F C07K1/22 C07K16/18 C12M1/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA12 4B024/CA02 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/FA12 4B063/QA13 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ43 4B063/QR40 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR84 4B063/QS25 4B063/QS34 4H045/AA11 4H045/CA42 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/358325 2002-02-20 US 60/365459 2002-03-19 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及组蛋白氨基末端修饰特异性抗体作为疾病或出生缺陷的诊断指标的用途。在一个实施方案中，使用组蛋白特异性抗体从患者的血液或血清样品中分离核小体，并纯化和分析所附的DNA用于诊断和筛选目的。

特表2005-517431 (P2005-517431A) (43) 公表日 平成17年6月16日(2005.6.16)			
(51) Int. Cl. ⁷	F I	ターマコード (参考)	
C12Q 1/68	C12Q 1/68 Z N A A	4B024	
C12N 15/09	C12Q 1/68 Z	4B029	
G01N 33/53	G01N 33/53 M	4B063	
G01N 37/00	G01N 37/00 I O 2	4H045	
// C07K 1/22	C12N 15/00 A		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号	特願2003-569787 (P2003-569787)	(71) 出願人	501149684
(86) (22) 出願日	平成15年2月19日(2003.2.19)		ユニバーシティ オブ バージニア パテ
(85) 翻訳文提出日	平成16年10月5日(2004.10.5)		ント ファウンダーション
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/004661		アメリカ合衆国、バージニア 22903
(87) 国際公開番号	W02003/070894		-2442, シャルロットビル, スイート
(87) 国際公開日	平成15年8月28日(2003.8.28)		1-110, ウェスト メイン ストリ
(31) 優先権主張番号	60/358,325		ート 1224
(32) 優先日	平成14年2月20日(2002.2.20)	(71) 出願人	305003368
(33) 優先権主張国	米国 (US)		クロマ・セラピューティクス・リミテッ
(31) 優先権主張番号	60/365,459		ド
(32) 優先日	平成14年3月19日(2002.3.19)		CHROMA THERAPEUTICS
(33) 優先権主張国	米国 (US)		LTD.
			イギリス、オーエックス14・4アールワ
			イ、アビンドン、ミルトン・パーク92
			番
			最終頁に続く