

(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2019-521953
(P2019-521953A)

(43) 公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A	4 C O 7 6
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 D	4 C O 8 5
C07K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 H O 4 5
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A61K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 120 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-555492 (P2018-555492)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月20日 (2017. 4. 20)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年12月20日 (2018. 12. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/028686
 (87) 国際公開番号 W02017/184895
 (87) 国際公開日 平成29年10月26日 (2017. 10. 26)
 (31) 優先権主張番号 62/325, 392
 (32) 優先日 平成28年4月20日 (2016. 4. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/325, 408
 (32) 優先日 平成28年4月20日 (2016. 4. 20)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 517423671
 エアラン セル テクノロジーズ, イン
 コーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
 07, サンフランシスコ, サード ス
 トリート 665, スイート 280
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

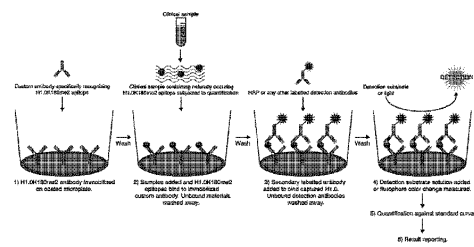
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K180ジメチル化H1.0タンパク質に関連する組成物および方法

(57) 【要約】

H1.0K180me2抗体、H1.0K180me2タンパク質、およびH1.0K180me2ペプチド、ならびに診断および治療のための使用方法が本明細書において提供される。これらのH1.0K180me2抗体等は、個体のメチル化H1.0関連疾患または状態の処置において使用してもよい。これらの抗体等は、リン残基180においてジメチル化リシンを含むヒストンH1.0タンパク質またはその断片(H1.0K180me2)の検出および定量化のためにも使用されてよく、このような組成物および方法は、複製老化、DNA損傷、遺伝毒性ストレス、放射線曝露、アルツハイマー病を検出するのに有用であり、治療レジメン、患者の階層化、薬物スクリーニングをモニタリングするのに有用であり、系内の生物学的老化のマーカースとしての役割を果たす場合がある。

FIG. 5A Sandwich ELISA method for detection and quantification of naturally occurring H1.0K180me2 epitope in samples of bodily fluids.



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、前記ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 の K 1 8 0 に対応し、前記ジメチル化リシン残基が結合のために必要とされる抗体。

【請求項 2】

前記ジメチル化抗原が、メチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗原が、ヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、および / または K 1 7 7 に対応するリシン残基においてジメチル化リシン残基を含む場合、結合しないか、または最小限に結合するにすぎない、請求項 1 に記載の抗体。

10

【請求項 4】

前記抗原が、ヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および / または K 1 8 0 に対応するリシン残基においてモノメチル化リシン残基を含む場合、結合しないか、または最小限に結合するにすぎない、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 5】

前記抗原が、ヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および / または K 1 8 0 に対応するリシン残基においてトリメチル化リシン残基を含む場合、結合しないか、または最小限に結合するにすぎない、請求項 1 に記載の抗体。

20

【請求項 6】

モノメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも 2 倍特異的であり、前記モノメチル化抗原がモノメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 8 0 に対応する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 7】

トリメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも 2 倍特異的であり、前記トリメチル化抗原がトリメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 8 0 に対応する、請求項 1 に記載の抗体。

30

【請求項 8】

標識を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

ビオチン化されている、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

固体表面に付着されている、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 11】

ビーズ、カラム、樹脂、またはマイクロプレートに付着されている、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、および二次抗体からなる群から選択される少なくとも 1 種の治療剤にコンジュゲートされている、請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 13】

試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を取り除くことができる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 14】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を含む細胞を取り除くことができる、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 15】

老化細胞を取り除くことができる、請求項 1 に記載の抗体。

50

【請求項 16】

ジメチル化リシン残基を含む合成ヒストンH1.0ペプチド、またはジメチル化リシン残基を含む合成ヒストンH1.0タンパク質であって、前記ジメチル化リシン残基がヒトヒストンH1.0のK180に対応する、合成ヒストンH1.0ペプチドまたは合成ヒストンH1.0タンパク質。

【請求項 17】

前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 18】

前記タンパク質またはペプチドが、ビオチン化されている、請求項16に記載のペプチド。

10

【請求項 19】

前記タンパク質またはペプチドが、ジメチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 20】

前記タンパク質またはペプチドが、メチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 21】

前記タンパク質またはペプチドが、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 22】

配列番号3～35の配列のうちのいずれか1つを含む、請求項16に記載のペプチド。

20

【請求項 23】

配列番号3の配列を含む、請求項22に記載のペプチド。

【請求項 24】

前記タンパク質が、配列番号2の配列を含む、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 25】

前記タンパク質またはペプチドが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、siRNA、および二次抗体からなる群から選択される少なくとも1種の治療剤にコンジュゲートされている、請求項16に記載のペプチド。

30

【請求項 26】

前記タンパク質またはペプチドが、H1.0K180me2自己抗体を取り除くかまたは遮断することができる、請求項16に記載のペプチド。

【請求項 27】

前記タンパク質またはペプチドが、H1.0K180me2 IgG自己抗体を取り除くかまたは遮断することができる、請求項26に記載のペプチド。

【請求項 28】

前記タンパク質またはペプチドが、H1.0K180me2 IgM自己抗体を取り除くかまたはブロックすることができる、請求項26に記載のペプチド。

40

【請求項 29】

個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項1に記載の抗体と接触させるステップと、

(b) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度を決定するステップであって、対照に対する前記濃度の低下が、前記個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあることを示すステップと

を含む方法。

【請求項 30】

ヒストンH1.0タンパク質の血清濃度が5.61nmol/ml未満である、または

50

それより低い場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記低下が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を下回る、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 32】

PLR (LR+) が 3.6 である、またはそれより大きい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 33】

NLR (LR-) が 0.26 である、またはそれより小さい場合、前記個体がアルツハイマー病を発症するリスクを有さない、請求項 44 に記載の方法。

10

【請求項 34】

前記個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合、アルツハイマー病薬またはレジメンで前記個体を処置するステップをさらに含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 35】

アルツハイマー病と診断され、前記アルツハイマー病に対する処置を受けている個体が、前記処置から利益を得るかまたは前記処置から利益を得続けるかどうかを決定する方法であって、

- (a) 前記個体由来の生体試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させるステップと、
 - (b) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度を決定するステップと、
 - (c) 対照に対する前記濃度の上昇が存在する場合、前記個体が前記処置から利益を得るかまたは前記処置から利益を得続けると決定するステップと
- を含む方法。

20

【請求項 36】

前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記個体が前記処置から利益を得るかまたは利益を得続けると決定された場合、アルツハイマー病薬またはレジメンで前記個体を処置するステップをさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

30

【請求項 38】

アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法であって、前記個体が前記処置をまだ開始しておらず、前記方法が、

- (a) 候補処置を前記個体に投与するステップと、
 - (b) 前記候補処置の投与後の前記個体由来の生体試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させるステップと、
 - (c) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度および / または細胞内局在を決定するステップと、
 - (d) 対照に対する前記濃度の上昇または細胞質への細胞内局在の低下が存在する場合、前記個体が前記候補処置から利益を得ると決定するステップと
- を含む、方法。

40

【請求項 39】

前記濃度の前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記個体が前記処置から利益を得ると決定された場合、アルツハイマー病薬またはレジメンで前記個体を処置するステップをさらに含む、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 41】

アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法

50

であって、前記個体が前記処置をまだ開始しておらず、前記方法が、

(a) 前記個体由来の生体試料を候補処置と接触させるステップと、

(b) 前記生体試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させるステップと、

(c) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度および / または細胞内局在を決定するステップと、

(d) 対照に対する前記濃度の上昇または対照に対する細胞質への細胞内局在の低下が存在する場合、前記個体が前記候補処置から利益を得ると決定するステップとを含む、方法。

【請求項 4 2】

前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである、請求項 4 1 に記載の方法。

10

【請求項 4 3】

前記個体が前記処置から利益を得ると決定された場合に、アルツハイマー病薬またはレジメンで前記個体を処置するステップをさらに含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記処置が、A P P 合成阻害剤、ベータ - セクレターゼ阻害剤、ガンマ - セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、A 凝集阻害剤、A 免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N - メチル D - アスパラギン酸 (N M D A) アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質の S - ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド - 1 受容体アゴニスト、ラパマイシン、ラパログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小 R N A 分子、ペプチド、および超音波療法からなる群から選択される、請求項 3 8 から 4 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 4 5】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項 2 9 から 4 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 6】

前記個体が、6 0 歳またはそれより高い年齢である、請求項 2 9 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 4 7】

前記抗体が、標識を含む、請求項 2 9 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記抗体が、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 2 9 から 4 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記濃度が、E L I S A によって決定される、請求項 2 9 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 5 0】

前記抗体が、モノメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも 2 倍特異的であり、前記モノメチル化抗原がモノメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 8 0 に対応する、請求項 2 9 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記抗体が、トリメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも 2 倍特異的であり、前記トリメチル化抗原がトリメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 8 0 に対応する、請求項 2 9 から 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

50

【請求項 5 2】

個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項 1 6 に記載のタンパク質またはペプチドと接触させるステップと、

(b) 前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の自己抗体の濃度を決定するステップであって、対照に対する前記濃度の上昇が、前記個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあることを示すステップとを含む方法。

【請求項 5 3】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g G 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 5】

総 I g G レベルに対して正規化した I g G 自己抗体の血清濃度が、 9.69 ug/ml より高いかまたはそれに等しい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 6】

血清体積に対して正規化した I g G 自己抗体の血清濃度が、 8.23 ug/ml より高いかまたはそれに等しい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 7】

血清体積に対して正規化した I g M 自己抗体の血清濃度が、 409 fMol/ml より高いかまたはそれに等しい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 8】

総 I g M 濃度に対する I g M 自己抗体の濃度の比が 26.6×10^{-6} より大きい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 0】

PLR (LR+) が I g G 自己抗体について 2.4 もしくはそれより大きい場合、または PLR (LR+) が I g M 自己抗体について 3.5 もしくはそれより大きい場合、前記個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップと、その測定値を前記試料中の総 I g M 濃度と比較するステップとを含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合に、アルツハイマー病薬またはレジメンで前記個体を処置するステップをさらに含む、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 6 3】

アルツハイマー病と診断され、前記アルツハイマー病に対する処置を受けている個体が、前記処置から利益を得るかまたは前記処置から利益を得続けるかどうかを決定する方法

10

20

30

40

50

であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項 16 に記載のタンパク質またはペプチドと接触させるステップと、

(b) 前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、

(c) 対照に対する前記濃度の低下が存在する場合、前記個体が前記処置から利益を得るかまたは前記処置から利益を得続けると決定するステップとを含む方法。

【請求項 64】

前記低下が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を下回る、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 65】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 66】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g G 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 67】

アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法であって、前記個体が前記処置をまだ開始しておらず、前記方法が、

(a) 候補処置を前記個体に投与するステップと、

(b) 前記個体由来の生体試料を請求項 16 に記載のタンパク質またはペプチドと接触させるステップと、

(c) 前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、

(d) 対照に対する前記濃度の低下が存在する場合、前記個体が前記候補処置から利益を得ると決定するステップとを含む、方法。

【請求項 68】

前記低下が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を下回る、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 70】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の I g G 自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 71】

前記処置が、A P P 合成阻害剤、ベータ - セクレターゼ阻害剤、ガンマ - セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、A 凝集阻害剤、A 免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N - メチル D - アスパラギン酸 (N M D A) アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質の S - ニトロシル化の遮断剤、グルカゴン様ペプチド - 1 受容体アゴニスト、ラパマイシン、ラパログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小 R N A 分子、ペプチド、および超音波療法からなる群から選択される、請求項 63 から 70 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 72】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、

10

20

30

40

50

腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項 5 2 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

前記個体が、60歳またはそれより高い年齢である、請求項 5 2 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項 5 2 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記タンパク質またはペプチドが、ビオチン化されている、請求項 5 2 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 7 6】

前記タンパク質またはペプチドが、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 5 2 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 3 5 の配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 5 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 5 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 7 9】

前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 5 2 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 0】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に特異的な自己抗体の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

I g G 自己抗体の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

I g M 自己抗体の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 8 3】

I g G および I g M 自己抗体の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

総 I g G および / または I g M の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

総 I g G の濃度に対する I g G 自己抗体の濃度の比が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8 6】

総 I g M の濃度に対する I g M 自己抗体の濃度が決定される、請求項 5 2 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 7】

個体が DNA 損傷剤に曝露されたかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させるステップと、

(b) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度を決定するステップであって、対照に対する前記濃度の上昇が、前記個体が DNA 損傷剤に曝露されたことを示すステップと

50

を含む方法。

【請求項 8 8】

前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記 DNA 損傷剤が、放射線である、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髓穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項 8 7 に記載の方法。

10

【請求項 9 1】

前記抗体が、標識を含む、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記抗体が、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記濃度が、ELISAによって決定される、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記抗体が、モノメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、前記モノメチル化抗原がモノメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する、請求項 8 7 に記載の方法。

20

【請求項 9 5】

前記抗体が、トリメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、前記トリメチル化抗原がトリメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する、請求項 8 7 に記載の方法。

【請求項 9 6】

個体がDNA損傷剤に曝露されたかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項 1 6 に記載のタンパク質またはペプチドと接触させるステップと、

(b) 前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の自己抗体の濃度を決定するステップであって、対照に対する前記濃度の上昇が、前記個体がDNA損傷剤に曝露されたことを示すステップと

30

を含む方法。

【請求項 9 7】

前記上昇が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中のIgM自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中のIgG自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項 9 6 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 0】

前記DNA損傷剤が、放射線である、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髓穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項 9 6 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項 9 6 に記載の方法。

50

【請求項 103】

前記タンパク質またはペプチドが、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 104】

前記濃度が E L I S A により決定される、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 105】

前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 35 の配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 106】

前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 105 に記載の方法。

10

【請求項 107】

前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 96 に記載の方法。

【請求項 108】

ラパログによる処置を受けている個体がこのような処置に応答性であるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項 1 に記載の抗体と接触させるステップと、

(b) 前記抗体に結合する前記試料中のジメチル化抗原の濃度を決定するステップと、

(c) 前記個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップであって、対照に対する前記濃度の低下が、前記個体が応答性であることを示すステップとを含む方法。

20

【請求項 109】

前記低下が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を下回る、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記ラパログが、ラパマイシン、シロリムス、Rapamune、エベロリムス、RA001、Afinitor、Zortress、テムシロリムス、CCI-779、Torisel、リダフォロリムス、AP23573、MK-8669、デフォロリムス、ゾタロリムス、ABT-578、AZD8055、AZD2014、OSI-027、MLN0128、WYE-132、Torin1、PI-103、P7170、PF-04691502、PF-05212384、PKI-587、GNE477、PKI-180、WJD008、XL765、SAR245409、NVP-BEZ235、BGT226、SF1126、GSK2126458、Ku-0063794、WYE-354、NVP-BEZ235、PF-05212384、XL765、Torin2、WYE-125132、および OSI-027 からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

30

【請求項 111】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

前記抗体が、標識を含む、請求項 108 に記載の方法。

40

【請求項 113】

前記抗体が、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 114】

前記濃度が、E L I S A によって決定される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 115】

前記抗体が、モノメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも 2 倍特異的であり、前記モノメチル化抗原がモノメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストン H1.0 タンパク質の K180 に対応する、請求項 108 に記載の方法。

50

【請求項 1 1 6】

前記抗体が、トリメチル化抗原よりも前記ジメチル化抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、前記トリメチル化抗原がトリメチル化リシン残基を含み、前記リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する、請求項108に記載の方法。

【請求項 1 1 7】

ラパログによる処置を受けている個体がこのような処置に応答性であるかどうかを決定する方法であって、

(a) 前記個体由来の生体試料を請求項16に記載のタンパク質またはペプチドと接触させるステップと、

(b) 前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、

(c) 前記個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップであって、対照に対する自己抗体の濃度の変化が、前記個体が応答性であることを示すステップを含む方法。

10

【請求項 1 1 8】

前記変化が、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中のIgM自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項117に記載の方法。

20

【請求項 1 2 0】

前記タンパク質またはペプチドに結合する前記試料中のIgG自己抗体の濃度を決定するステップを含む、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記ラパログが、ラパマイシン、シロリムス、Rapamune、エベロリムス、RA001、Afinitor、Zortress、テムシロリムス、CCI-779、Torisel、リダフォロリムス、AP23573、MK-8669、デフォロリムス、ゾタロリムス、ABT-578、AZD8055、AZD2014、OSI-027、MLN0128、WYE-132、Torin1、PI-103、P7170、PF-04691502、PF-05212384、PKI-587、GNE477、PKI-180、WJD008、XL765、SAR245409、NVP-BEZ235、BGT226、SF1126、GSK2126458、Ku-0063794、WYE-354、NVP-BEZ235、PF-05212384、XL765、Torin2、WYE-125132、およびOSI-027からなる群から選択される、請求項117に記載の方法。

30

【請求項 1 2 2】

前記生体試料が、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項117に記載の方法。

40

【請求項 1 2 4】

前記タンパク質またはペプチドが、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記濃度がELISAにより決定される、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記ペプチドが、配列番号3~35の配列のうちのいずれか1つを含む、請求項117に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

50

- 前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 1 2 6 に記載の方法。
- 【請求項 1 2 8】
前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。
- 【請求項 1 2 9】
請求項 1 6 に記載のタンパク質またはペプチドを含む診断キット。
- 【請求項 1 3 0】
前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 3 5 からなる群から選択される配列を含む、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 1】
前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項 1 3 0 に記載のキット。 10
- 【請求項 1 3 2】
前記タンパク質またはペプチドが、ビオチン化されている、請求項 1 3 1 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 3】
前記タンパク質またはペプチドが、固体表面に付着されている、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 4】
前記タンパク質またはペプチドが、ビーズ、マイクロプレート、カラム、または樹脂に付着されている、請求項 1 3 3 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 5】
前記タンパク質またはペプチドが、試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体の検出のために提供される、請求項 1 2 9 に記載のキット。 20
- 【請求項 1 3 6】
前記タンパク質またはペプチドが、参照標準として提供される請求項 1 3 0 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 7】
H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体をさらに含む、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 3 8】
アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性物質への曝露、または DNA 損傷剤への曝露の検出のために使用される、請求項 1 2 9 に記載のキット。 30
- 【請求項 1 3 9】
薬物スクリーニングのために使用される、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 4 0】
患者の階層化のために使用される、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 4 1】
処置選択のために使用される、請求項 1 2 9 に記載のキット。
- 【請求項 1 4 2】
皮下組織標的分子の濃度を測定するための経皮吸収パッチであって、
(a) (1) 請求項 1 に記載の抗体、または (2) 請求項 1 6 に記載のタンパク質もしくはペプチドのいずれかを含む基質、および
(b) 複数のマイクロニードル
を含む経皮吸収パッチ。 40
- 【請求項 1 4 3】
前記基質が、請求項 1 に記載の抗体を含む、請求項 1 4 2 に記載のパッチ。
- 【請求項 1 4 4】
前記抗体が、標識を含む、請求項 1 4 3 に記載のパッチ。
- 【請求項 1 4 5】
前記基質が、請求項 1 6 に記載のタンパク質またはペプチドを含む、請求項 1 4 2 に記載のパッチ。
- 【請求項 1 4 6】 50

前記ペプチドが、標識を含む、請求項 1 4 5 に記載のパッチ。

【請求項 1 4 7】

前記ペプチドが、ビオチン化されている、請求項 1 4 6 に記載のパッチ。

【請求項 1 4 8】

前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 3 5 の配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 4 5 に記載のパッチ。

【請求項 1 4 9】

前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 1 4 8 に記載のパッチ。

【請求項 1 5 0】

前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 1 4 2 に記載のパッチ。

10

【請求項 1 5 1】

経皮吸収マイクロニードルアレイパッチである、請求項 1 4 2 に記載のパッチ。

【請求項 1 5 2】

前記基質が、弾性伸縮性である、請求項 1 4 2 に記載のパッチ。

【請求項 1 5 3】

個体が、放射線または DNA 損傷剤に曝露されたかどうかを決定するためのポータブルな装置であって、

(a) 試料採取装置、

(b) 読み取り機、

(c) (1) 請求項 1 に記載の抗体、または (2) 請求項 1 6 に記載のタンパク質もしくはペプチドのいずれかを含むアッセイモジュール、および

20

(d) 複数のマイクロニードル

を含む装置。

【請求項 1 5 4】

基質が、請求項 1 に記載の抗体を含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

【請求項 1 5 5】

前記抗体が、標識を含む、請求項 1 5 4 に記載の装置。

【請求項 1 5 6】

基質が、請求項 1 6 に記載のタンパク質またはペプチドを含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

30

【請求項 1 5 7】

前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

【請求項 1 5 8】

前記タンパク質またはペプチドが、ビオチン化されている、請求項 1 5 7 に記載の装置

。

【請求項 1 5 9】

前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 3 5 の配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

【請求項 1 6 0】

前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

40

【請求項 1 6 1】

前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 1 5 3 に記載の装置。

【請求項 1 6 2】

分析物のラテラルフローアッセイに適する試験片であって、試料受容ゾーンを含み、前記試料受容ゾーンが、(1) 請求項 1 に記載の抗体、または (2) 請求項 1 6 に記載のタンパク質もしくはペプチドのいずれかを含む、試験片。

【請求項 1 6 3】

前記受容ゾーンが、請求項 1 に記載の抗体を含む、請求項 1 6 2 に記載の試験片。

【請求項 1 6 4】

前記抗体が、標識を含む、請求項 1 6 3 に記載の試験片。

50

- 【請求項 165】
前記受容ゾーンが、請求項 16 に記載のタンパク質またはペプチドを含む、請求項 16 2 に記載の試験片。
- 【請求項 166】
前記タンパク質またはペプチドが、標識を含む、請求項 16 2 に記載の試験片。
- 【請求項 167】
前記タンパク質またはペプチドが、ビオチン化されている、請求項 16 2 に記載の試験片。
- 【請求項 168】
前記ペプチドが、配列番号 3 ~ 35 の配列のうちのいずれか 1 つを含む、請求項 16 2 に記載の試験片。 10
- 【請求項 169】
前記ペプチドが、配列番号 3 の配列を含む、請求項 16 8 に記載の試験片。
- 【請求項 170】
前記タンパク質が、配列番号 2 の配列を含む、請求項 16 2 に記載の試験片。
- 【請求項 171】
個体のメチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体を前記個体に投与するステップを含む方法。
- 【請求項 172】
前記疾患または状態が、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患または状態、および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドのレベル上昇が伴う疾患または状態からなる群から選択される、請求項 17 1 に記載の方法。 20
- 【請求項 173】
個体のメチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の請求項 16 から 28 に記載のタンパク質またはペプチドのうちのいずれか 1 つを前記個体に投与するステップを含む方法。
- 【請求項 174】
前記疾患または状態が、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患もしくは状態、または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体のレベル上昇が伴う疾患もしくは状態からなる群から選択される、請求項 17 3 に記載の方法。 30
- 【請求項 175】
個体の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を取り除く方法であって、治療有効量の請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体を前記個体に投与するステップを含む方法。
- 【請求項 176】
前記個体が、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性物質への曝露、DNA 損傷剤への曝露、および老化細胞の蓄積を含む状態からなる群から選択される疾患または状態に罹患している、請求項 17 5 に記載の方法。
- 【請求項 177】
個体の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体を取り除くか、ブロックするか、または中和する方法であって、治療有効量の請求項 16 から 28 に記載のタンパク質またはペプチドのうちのいずれか 1 つを前記個体に投与するステップを含む方法。 40
- 【請求項 178】
前記個体が、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患または状態、ならびに H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体のレベル上昇が伴う疾患および状態からなる群から選択される疾患または状態に罹患している、請求項 17 7 に記載の方法。
- 【請求項 179】
請求項 1 から 28 に記載の抗体、タンパク質またはペプチドのうちのいずれか 1 つ、お 50

よび薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 180】

無菌である、請求項 179 に記載の組成物。

【請求項 181】

請求項 1 から 28 または 179 から 180 に記載の抗体、タンパク質、ペプチド、または組成物のいずれか 1 つを含むキット。

【請求項 182】

請求項 1 から 28 または 179 から 181 に記載の組成物のいずれか 1 つを含む製品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2016年4月20日に提出された米国仮出願番号第62/325,392号、2016年4月20日に提出された米国仮出願番号第62/325,362号、2016年4月20日に提出された米国仮出願番号第62/325,408号、2016年6月27日に提出された米国仮出願番号第62/355,265号、および2016年6月27日に提出された米国仮出願番号第62/355,277号に基づく優先権を主張しており、これら仮出願の各々はそれらの全体が参考として本明細書中に援用される。

【背景技術】

【0002】

20

背景

細胞のクロマチンは、多くの立体構造を可能とし、生理学的に関連するインプットを受けようリモデリングおよび再構成される傾向がある動的な高分子である。ヒストンタンパク質はクロマチンの主要なタンパク質構成成分であり、二本鎖DNAはヒストンタンパク質に絡みつく。ヒストンタンパク質が変化すると、他の遺伝子へのアクセスはインタクトなまま、一部の遺伝子への転写装置へのアクセスを差次的に変更することが可能となる。ヒストンの翻訳後修飾（PTM）によって達成される差別的なクロマチン凝縮は、クロマチンのパッケージングの基礎となる（LunyakおよびRosenfeld 92008）Hum. Mol. Genet.、17巻：R28～36頁；JenuweinおよびAllis（2001年）Science、293巻：1074～1080頁）。ヒストンPTM、例えば、メチル化は、エピジェネティックコードとして作用し、発生、傷害、疾患および老化に密接に関連する細胞応答の多くの態様で重要な役割を果たす。

30

【0003】

ヒストンの5つの主要なファミリーとして、H1、H2A、H2B、H3およびH4が存在する。ヒストンH2A、H2B、H3およびH4は、コアヒストンとして知られているが、ヒストンH1およびH5はリンカーヒストンとして知られている。近年、複数の研究によって特定された多数のH1.0結合タンパク質によって、H1.0のタンパク質-タンパク質相互作用の重要な役割が示され、クロマチンの構造へのその作用を超えて拡大する、H1.0の構造および機能の新たなパラダイムが示唆される。

【先行技術文献】

40

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】LunyakおよびRosenfeld（2009年）Hum. Mol. Genet.、17巻：R28～36頁

【非特許文献2】JenuweinおよびAllis（2001年）Science、293巻：1074～1080頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

H1.0のメチル化は疾患の発症、傷害への応答、および治療レジメンへの応答に関す

50

るため、種々の細胞状況においてH 1 . 0 のメチル化を検出する必要性が存在し、感度がよいアッセイは種々の種類の細胞状況同士を識別する必要がある。また、メチル化H 1 . 0 関連疾患および状態を治療の対象とする必要性も存在する。この目的のための方法および組成物が本明細書において提供される。

【 0 0 0 6 】

簡単な要旨

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質、およびH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドならびに診断および治療のための使用方法が本明細書において提供される。これらのH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質、およびH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドは、個体のメチル化H 1 . 0 関連疾患または状態の処置において使用されてもよい。これらのH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質、およびH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドはまた、リシン残基 1 8 0 においてジメチル化リシンを含むヒストンH 1 . 0 タンパク質またはその断片 (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2) の検出および定量化のために使用され、このような組成物および方法は、複製老化、DNA 損傷、遺伝毒性ストレス、放射線曝露、アルツハイマー病を検出するのに有用であり、治療レジメン、患者の階層化、薬物スクリーニングをモニタリングするのに有用であり、系内の生物学的老化のマーカーとしての役割を果たす場合がある。

【 0 0 0 7 】

一態様では、ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含み、リシン残基がヒトヒストンH 1 . 0 のK 1 8 0 に対応し、ジメチル化リシン残基が結合するのに必要である抗体 (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体) が本明細書において提供される。一部の実施形態では、ジメチル化抗原は、メチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない。一部の実施形態では、抗原が、ヒトヒストンH 1 . 0 タンパク質のK 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、および/またはK 1 7 7 に対応するリシン残基においてジメチル化リシン残基を含む場合、抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。一部の実施形態では、抗原が、ヒトヒストンH 1 . 0 タンパク質のK 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および/またはK 1 8 0 に対応するリシン残基においてモノメチル化リシン残基を含む場合、抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。一部の実施形態では、抗原が、ヒトヒストンH 1 . 0 タンパク質のK 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および/またはK 1 8 0 に対応するリシン残基においてトリメチル化リシン残基を含む場合、抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。一部の実施形態では、抗体は、モノメチル化抗原よりもジメチル化抗原に対して少なくとも2 倍特異的であり、モノメチル化抗原はモノメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストンH 1 . 0 タンパク質のK 1 8 0 に対応する。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ポリクローナル抗体である。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、ビオチン化されている。一部の実施形態では、抗体は、固体表面に付着されている。一部の実施形態では、抗体は、ビーズ、カラム、樹脂、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、抗体は、細胞透過性抗体である。一部の実施形態では、抗体は、I g G 1 抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト抗体である。一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施形態では、抗体は、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、および二次抗体からなる群から選択される少なくとも1 種の治療剤にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、抗体は、試料中のH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を取り除くことができる。一部の実施形態では、抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を含む細胞を取り除くことができる。一部の実施形態では、抗体は、老化細胞を取り除くことができる。

【 0 0 0 8 】

別の態様では、個体のメチル化H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、

治療有効量の本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体のうちのいずれか 1 つを個体に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、メチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態は、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患または状態、および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドのレベル上昇が伴う疾患または状態からなる群から選択される。別の関連する態様では、個体の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を取り除く方法であって、例えば、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性物質への曝露、DNA 損傷剤への曝露、および老化細胞の蓄積を含む状態からなる群から選択される疾患または状態に罹患している個体を処置するために、治療有効量の本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体のうちのいずれか 1 つの抗体を個体に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。関連する態様では、本明細書に記載されている H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体のうちのいずれか 1 つを含む医薬組成物、キット、および他の製品が本明細書において提供される。

10

【 0 0 0 9 】

別の態様では、ジメチル化リシン残基を含むヒストン H 1 . 0 ペプチド、またはジメチル化リシン残基を含むヒストン H 1 . 0 タンパク質であって、ジメチル化リシン残基がヒトヒストン H 1 . 0 の K 1 8 0 に対応するヒストン H 1 . 0 ペプチドまたはヒストン H 1 . 0 タンパク質 (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドおよび H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質) が本明細書において提供される。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号 3 ~ 3 5 からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号 3 ~ 5 からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号 2 の配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号 3 の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、メチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、標識されている。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、ビオチン化されている。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、固体表面に付着されている。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、ビーズ、カラム、樹脂、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A 、および二次抗体からなる群から選択される少なくとも 1 種の治療剤にコンジュゲートされている。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体を取り除くかまたはブロックすることができる。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 自己抗体を取り除くかまたはブロックすることができる。一部の実施形態では、ペプチドまたはタンパク質は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体を取り除くかまたはブロックすることができる。

20

30

【 0 0 1 0 】

別の態様では、個体のメチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、治療有効量の本明細書に記載されている H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドのうちのいずれか 1 つを個体に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、メチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態は、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患または状態、および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体のレベル上昇が伴う疾患または状態からなる群から選択される。関連する態様では、個体の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体を取り除くか、ブロックするか、または中和する方法であって、治療有効量の本明細書に記載されている H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドのうちのいずれか 1 つを個体に投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、個体は、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、老化細胞の蓄積を含む疾患もしくは状態、または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体のレベル上昇が伴う疾患もしくは状態からなる群から選択される疾患

40

50

または状態に罹患している。関連する態様では、本明細書に記載されている H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドまたはタンパク質のうちのいずれか 1 つを含む医薬組成物、キット、および他の製品が本明細書において提供される。

【 0 0 1 1 】

別の態様では、個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかの H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップであって、対照に対する濃度の低下が、個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあることを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一実施形態では、ヒストン H 1 . 0 タンパク質の血清濃度が $5 . 6 1 \text{ nmol / ml}$ 未満またはそれより低い場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、PLR (LR +) が 3 . 6 である、またはそれより大きい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、NLR (LR -) が 0 . 2 6 である、またはそれより小さい場合、個体はアルツハイマー病を発症するリスクを有さない。一部の実施形態では、個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合、方法は、アルツハイマー病薬またはレジメンで個体を処置するステップをさらに含む。したがって、上記方法によって決定されるように、ヒストン H 1 . 0 タンパク質の血清濃度が $5 . 6 1 \text{ nmol / ml}$ 未満もしくはそれより低い場合、および / または PLR (LR +) の測定値が 3 . 6 である場合、アルツハイマー病薬またはレジメンで個体を処置する方法が本明細書において提供される。

10

20

【 0 0 1 2 】

別の態様では、個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドと接触させるステップと、(b) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップであって、対照に対する濃度の上昇が、個体が、アルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあることを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、方法は、タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g G 自己抗体の濃度を決定するステップを含む。一部の実施形態では、総 I g G レベルに対して正規化した I g G 自己抗体の血清濃度が、 $9 . 6 9 \text{ ug / ml}$ より高いかまたはそれに等しい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、血清体積に対して正規化した I g G 自己抗体の血清濃度が、 $8 . 2 3 \text{ ug / ml}$ より高いかまたはそれに等しい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、血清体積に対して正規化した I g M 自己抗体の血清濃度が、 $4 0 9 \text{ fMol / ml}$ より高いかまたはそれに等しい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、総 I g M 濃度に対する I g M 自己抗体の濃度の比が $2 6 . 6 \times 1 0^{-6}$ より大きい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、PLR (LR +) が I g G 自己抗体について 2 . 4 もしくはそれより大きいか、または PLR (LR +) が I g M 自己抗体について 3 . 5 もしくはそれより大きい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、方法は、タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップと、その測定値を試料中の総 I g M 濃度と比較するステップとを含む。一部の実施形態では、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合、方法は、アルツハイマー病薬またはレジメンで個体を処置するステップを含む。

30

40

【 0 0 1 3 】

別の態様では、アルツハイマー病と診断され、アルツハイマー病に対する処置を受けて

50

いる個体が、処置から利益を得るかまたは処置から利益を得続けるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかの H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップと、(c) 対照に対する濃度の上昇が存在する場合、個体が処置から利益を得るかまたは処置から利益を得続けると決定するステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、個体が処置から利益を得るかまたは利益を得続けると決定された場合、方法は、アルツハイマー病薬またはレジメンで個体を処置するステップをさらに含む。

【0014】

別の態様では、アルツハイマー病と診断され、アルツハイマー病に対する処置を受けている個体が、処置から利益を得るかまたは処置から利益を得続けるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、(c) 対照に対する濃度の低下が存在する場合、個体が処置から利益を得るかまたは処置から利益を得続けると決定するステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、方法は、タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g M 自己抗体の濃度を決定するステップを含む。一部の実施形態では、方法は、タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g G 自己抗体の濃度を決定するステップを含む。

10

【0015】

別の態様では、アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法であって、個体は処置をまだ開始しておらず、方法が、(a) 候補処置を個体に投与するステップと、(b) 候補処置の投与後の個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかの H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(c) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度および/または細胞内局在を決定するステップと、(d) 対照に対する濃度の上昇または細胞質への細胞内局在の低下が存在する場合、個体が候補処置から利益を得ると決定するステップとを含む、方法が本明細書において提供される。

20

【0016】

別の態様では、アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法であって、個体は処置をまだ開始しておらず、方法が、(a) 個体由来の生体試料を候補処置と接触させるステップと、(b) 生体試料を本明細書において提供されるいずれかの H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(c) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度および/または細胞内局在を決定するステップと、(d) 対照に対する濃度の上昇または対照に対する細胞質への細胞内局在の低下が存在する場合、個体が候補処置から利益を得ると決定するステップとを含む、方法が本明細書において提供される。

30

【0017】

別の態様では、アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定する方法であって、個体は処置をまだ開始しておらず、方法が、(a) 候補処置を個体に投与するステップと、(b) 個体由来の生体試料を本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドと接触させるステップと、(c) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、(d) 対照に対する濃度の低下が存在する場合、個体が候補処置から利益を得ると決定するステップとを含む、方法が本明細書において提供される。

40

【0018】

アルツハイマー病の方法に関する方法に関係するため、一部の実施形態では、測定される変化(上昇、低下、または変化なし)は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、生体試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髓

50

穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される。一部の実施形態では、個体は、60歳またはそれより高い年齢である。抗体を利用する一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2抗体は、ビーズ、カラム、樹脂、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドは、標識されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドは、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、配列番号3~35の配列のうちのいずれか1つを含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、配列番号3の配列を含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2抗原に特異的な自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、H1.0K180me2またはH1.0K180me2自己抗体の濃度は、ELISAによって決定される。一部の実施形態では、IgG自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、IgM自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、IgGおよびIgM自己抗体の濃度が決定される。

10

【0019】

アルツハイマー病と診断された個体が候補処置から利益を得るかどうかを決定すること、およびアルツハイマー病と診断され、アルツハイマー病に対する処置を受けている個体が、処置から利益を得るかまたは処置から利益を得続けるかどうかを決定することに関する種々の態様では、処置は、APP合成阻害剤、ベータ-セクレターゼ阻害剤、ガンマ-セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、Aβ凝集阻害剤、Aβ免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質のS-ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト、ラバマイシン、ラバログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小RNA分子、ペプチド、および超音波療法からなる群から選択される。

20

30

【0020】

別の態様では、個体がDNA損傷剤に曝露されたかどうかを決定する方法であって、(a)個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかのH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(b)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2抗原の濃度を決定するステップであって、対照に対する濃度の上昇が、個体がDNA損傷剤に曝露されたことを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、この上昇は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える。一部の実施形態では、DNA損傷剤は、放射線である。一部の実施形態では、生体試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄液、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、濃度は、ELISAによって決定される。一部の実施形態では、抗体は、モノメチル化抗原よりもジメチル化K180抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、モノメチル化抗原はモノメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する。一部の実施形態では、抗体は、トリメチル化抗原よりもジメチル化抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、トリメチル化抗原はトリメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する。一部の実施形態では、抗体は抗原結合性断片である。

40

50

【0021】

別の態様では、個体がDNA損傷剤に曝露されたかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかのH1・0K180me2タンパク質またはH1・0K180me2ペプチドと接触させるステップと、(b) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップであって、対照に対する濃度の上昇が、個体がDNA損傷剤に曝露されたことを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、この上昇は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を超える。一部の実施形態では、DNA損傷剤は、放射線である。一部の実施形態では、生体試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、標識を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、濃度は、ELISAによって決定される。一部の実施形態では、ペプチドは配列番号3~35の配列のうちいずれか1つを含む。一部の実施形態では、タンパク質は配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは配列番号3の配列を含む。

10

【0022】

別の態様では、ラパログによる処置を受けている個体がこのような処置に応答性であるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を本明細書において提供されるいずれかのH1・0K180me2抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中のH1・0K180me2抗原の濃度を決定するステップと、(c) 個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップであって、対照に対する濃度の低下が、個体が応答性であることを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、低下は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値を下回る。一部の実施形態では、ラパログは、ラパマイシン、シロリムス、Rapamune、エベロリムス、RA001、Afinitor、Zortress、テムシロリムス、CCI-779、Torisel、リダフォロリムス、AP23573、MK-8669、デフォロリムス、ゾタロリムス、ABT-578、AZD8055、AZD2014、OSI-027、MLN0128、WYE-132、Torin1、PI-103、P7170、PF-04691502、PF-05212384、PKI-587、GNE477、PKI-180、WJD008、XL765、SAR245409、NVP-BEZ235、BGT226、SF1126、GSK2126458、Ku-0063794、WYE-354、NVP-BEZ235、PF-05212384、XL765、Torin2、WYE-125132、およびOSI-027からなる群から選択される。一部の実施形態では、生体試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、濃度は、ELISAによって決定される。一部の実施形態では、抗体は抗原結合性断片である。一部の実施形態では、抗体は、モノメチル化抗原よりもジメチル化K180抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、モノメチル化抗原はモノメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストンH1・0タンパク質のK180に対応する。一部の実施形態では、抗体は、トリメチル化抗原よりもジメチル化抗原に対して少なくとも2倍特異的であり、トリメチル化抗原はトリメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストンH1・0タンパク質のK180に対応する。

20

30

40

【0023】

別の態様では、ラパログによる処置を受けている個体がこのような処置に応答性であるかどうかを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料をH1・0K180me2ペプチドまたはH1・0K180me2タンパク質と接触させるステップと、(b) タン

50

パク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、(c) 個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップであって、対照に対する自己抗体の濃度の変化が、個体が応答性であることを示すステップとを含む方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、ラパログは、ラパマイシン、シロリムス、Rapamune、エベロリムス、RA 001、Afinitor、Zortress、テムシロリムス、CCI-779、Torisel、リダフォロリムス、AP23573、MK-8669、デフォロリムス、ゾタロリムス、ABT-578、AZD8055、AZD2014、OSI-027、MLN0128、WYE-132、Torin1、PI-103、P7170、PF-04691502、PF-05212384、PKI-587、GNE477、PKI-180、WJD008、XL765、SAR245409、NVP-BEZ235、BGT226、SF1126、GSK2126458、Ku-0063794、WYE-354、NVP-BEZ235、PF-05212384、XL765、Torin2、WYE-125132、およびOSI-027からなる群から選択される。一部の実施形態では、生体試料は、全血、血漿、血清、唾液、尿、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、およびリンパ液からなる群から選択される。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、標識を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、濃度は、ELISAによって決定される。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3~35の配列のうちのいずれか1つを含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3の配列を含む。

【0024】

別の態様では、H1.0K180me2ペプチドまたはH1.0K180me2タンパク質を含む診断キットが本明細書において提供される。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、配列番号3~35からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、標識を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、固体表面に付着されている。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビーズ、樹脂、カラム、またはマイクロプレートに付着されている。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、試料中のH1.0K180me2自己抗体の検出のために提供される。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、参照標準として提供される。一部の実施形態では、キットは、H1.0K180me2抗体をさらに含む。一部の実施形態では、キットは、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性物質への曝露、またはDNA損傷剤への曝露の検出のために使用される。一部の実施形態では、キットは、薬物スクリーニングのために使用される。一部の実施形態では、キットは、患者の階層化のために使用される。一部の実施形態では、キットは、処置選択のために使用される。

【0025】

別の態様では、皮下組織標的分子の濃度を測定するための経皮吸収パッチであって、(a)(1)H1.0K180me2抗体、または(2)H1.0K180me2タンパク質もしくはH1.0K180me2ペプチドのいずれかを含む基質、および(b)複数のマイクロニードルを含む経皮吸収パッチが本明細書において提供される。一部の実施形態では、基質は、H1.0K180me2抗体を含む。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、抗原結合性断片である。一部の実施形態では、基質は、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドを含む。一部の実施形態では、ペプチドは、標識されている。一部の実施形態では、ペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3~35の配列のうちのいずれか1つ

を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3の配列を含む。一部の実施形態では、パッチは、経皮吸収マイクロニードルアレイパッチである。一部の実施形態では、基質は、弾性伸縮性である。

【0026】

別の態様では、個体が、放射線またはDNA損傷剤に曝露されたかどうかを決定するためのポータブルな装置であって、(a)試料採取装置、(b)読み取り機、(c)(1)H1.0K180me2抗体、または(2)H1.0K180me2タンパク質もしくはH1.0K180me2ペプチドのいずれかを含むアッセイモジュール、および(d)複数のマイクロニードルを含む装置が本明細書において提供される。一部の実施形態では、基質は、H1.0K180me2抗体を含む。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は抗原結合性断片である。一部の実施形態では、基質は、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドを含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、標識を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3~35の配列のうちいずれか1つを含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号2の配列を含む。

10

【0027】

別の態様では、分析物のラテラルフローアッセイに適する試験片であって、試料受容ゾーンを含み、試料受容ゾーンが、(1)H1.0K180me2抗体、または(2)H1.0K180me2タンパク質もしくはH1.0K180me2ペプチドのいずれかを含む、試験片が本明細書において提供される。一部の実施形態では、受容ゾーンは、H1.0K180me2抗体を含む。一部の実施形態では、抗体は、標識されている。一部の実施形態では、抗体は、抗原結合性断片である。一部の実施形態では、受容ゾーンは、H1.0K180me2タンパク質またはH1.0K180me2ペプチドを含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、標識を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3~35の配列のうちいずれか1つを含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号3の配列を含む。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号2の配列を含む。

20

30

【0028】

別の態様では、特異的にジメチル化されたタンパク質またはペプチドを生成する条件下で、タンパク質またはペプチドをメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む、ヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質をジメチル化するための*in vitro*方法であって、タンパク質またはペプチドがヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基で特異的にジメチル化され、メチルトランスフェラーゼ酵素がG9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼである方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、ペプチドは、配列番号42~74からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質は、配列番号1の配列を含む。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドをG9Aメチルトランスフェラーゼと接触させる。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドをGLPメチルトランスフェラーゼと接触させる。一部の実施形態では、メチルドナーは、S-アデノシル-L-メチオニンである。一部の実施形態では、接触させるステップは、メチル化緩衝液中で実施される。一部の実施形態では、生成物の50%より多く、60%より多く、70%より多く、80%より多く、90%より多く、95%より多く、またはさらに99%より多く、ヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基でジメチル化される。関連する態様では、提供される*in vitro*方法によって生成されたジメチル化タンパク質またはペプチドに特異的に結合する抗体が本明細書において提供される。

40

【0029】

50

別の態様では、特異的なジメチル化を可能にする条件下で、H1.0タンパク質またはH1.0ペプチドをメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む方法によって生成された、ヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基で特異的にジメチル化されたヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質であって、メチルトランスフェラーゼ酵素がG9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼであるヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質が本明細書において提供される。一部の実施形態では、H1.0ペプチドは、配列番号42~74からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、H1.0タンパク質は、配列番号1の配列を含む。一部の実施形態では、生成された特異的にジメチル化されたH1.0タンパク質は、配列番号2の配列を含む。一部の実施形態では、生成された特異的にジメチル化されたH1.0ペプチドは、配列番号3~35の配列を含む。関連する態様では、提供される*in vitro*方法によって生成されたジメチル化タンパク質またはペプチドに特異的に結合する抗体が本明細書において提供される。

10

【0030】

別の態様では、H1.0タンパク質またはH1.0ペプチドの*in vitro*でのメチル化のためのキットであって、(a)H1.0タンパク質またはH1.0ペプチド、(b)G9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼ酵素、およびメチルドナーを含むキットが本明細書において提供される。一部の実施形態では、キットは、H1.0タンパク質を含み、H1.0タンパク質は、配列番号1の配列を含む。一部の実施形態では、キットは、H1.0ペプチドを含む。一部の実施形態では、H1.0ペプチドは、配列番号42~74からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、キットは、G9Aメチルトランスフェラーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、キットは、GLPメチルトランスフェラーゼ酵素を含む。一部の実施形態では、メチルドナーは、S-アデノシル-L-メチオニンである。一部の実施形態では、キットは、メチル化緩衝液をさらに含む。

20

【0031】

別の態様では、ヒストンH1.0ペプチドおよびメチルトランスフェラーゼ酵素を含む複合体であって、*in vitro*である複合体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、H1.0ペプチドは、配列番号42~74からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ酵素は、G9Aメチルトランスフェラーゼ酵素である。一部の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ酵素はGLPメチルトランスフェラーゼ酵素である。

30

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1A】図1A~1Bは、発見ベースの質量分析法を使用するhADSCの細胞老化後の翻訳後修飾として、残基180にジメチル化リシンを含むヒストンH1.0タンパク質(H1.0K180me2)の特定を示す。図1Aは、質量分析による発見パイプラインを示す。図1Bは、非修飾ジメチル化ペプチドに対する質量分析スペクトル全体を示す。

40

【図1B】図1A~1Bは、発見ベースの質量分析法を使用するhADSCの細胞老化後の翻訳後修飾として、残基180にジメチル化リシンを含むヒストンH1.0タンパク質(H1.0K180me2)の特定を示す。図1Aは、質量分析による発見パイプラインを示す。図1Bは、非修飾ジメチル化ペプチドに対する質量分析スペクトル全体を示す。

【0033】

【図2A】図2A~2Bは、SR(自己再生)およびREP-SEN(複製老化)hADSCのH1.0からのヒストンH1(図2A)およびRNAseqリード(図2B)の6つの別個のバリエーションの発現レベルを示す。

【図2B】図2A~2Bは、SR(自己再生)およびREP-SEN(複製老化)hADSCのH1.0からのヒストンH1(図2A)およびRNAseqリード(図2B)の6つの別個のバリエーションの発現レベルを示す。

50

【0034】

【図3A-C】図3A～Dは、本明細書において提供されるH1.0K180me2抗体の特異性を示す。図3Aは、H1.0K180me2タンパク質およびH3.0タンパク質の他のリシン残基の異なるメチル化部位と比較したアミノ酸隣接ヒストンH1.0K180を示す。図3Bおよび図3Cは、スロットプロットアッセイの結果を示し、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Dは、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Eは、他のH1バリエーションに存在しないアミノ酸の特有の配列におけるH1.0K180の埋め込みを示す、ヒストンH1バリエーションタンパク質配列のClustalW2アラインメントを示す。

【図3D】図3A～Dは、本明細書において提供されるH1.0K180me2抗体の特異性を示す。図3Aは、H1.0K180me2タンパク質およびH3.0タンパク質の他のリシン残基の異なるメチル化部位と比較したアミノ酸隣接ヒストンH1.0K180を示す。図3Bおよび図3Cは、スロットプロットアッセイの結果を示し、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Dは、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Eは、他のH1バリエーションに存在しないアミノ酸の特有の配列におけるH1.0K180の埋め込みを示す、ヒストンH1バリエーションタンパク質配列のClustalW2アラインメントを示す。

【図3E】図3A～Dは、本明細書において提供されるH1.0K180me2抗体の特異性を示す。図3Aは、H1.0K180me2タンパク質およびH3.0タンパク質の他のリシン残基の異なるメチル化部位と比較したアミノ酸隣接ヒストンH1.0K180を示す。図3Bおよび図3Cは、スロットプロットアッセイの結果を示し、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Dは、H1.0K180me2に対する抗体の特異性を実証する。図3Eは、他のH1バリエーションに存在しないアミノ酸の特有の配列におけるH1.0K180の埋め込みを示す、ヒストンH1バリエーションタンパク質配列のClustalW2アラインメントを示す。

【0035】

【図4】図4は、体液試料中のH1.0K180me2自己抗体の検出のための標識したH1.0K180me2ペプチドを使用する間接ELISAの使用を示す。

【0036】

【図5A】図5Aは、体液試料中のH1.0K180me2エピトープに対する抗体を使用する、H1.0K180me2抗原の直接検出に対するサンドイッチELISAの使用を示す。図5Bは、H1.0K180me2抗原のサンドイッチELISA試験に対する標準曲線を示す。

【図5B】図5Aは、体液試料中のH1.0K180me2エピトープに対する抗体を使用する、H1.0K180me2抗原の直接検出に対するサンドイッチELISAの使用を示す。図5Bは、H1.0K180me2抗原のサンドイッチELISA試験に対する標準曲線を示す。

【0037】

【図6】図6は、H1.0mRNA発現が、急性DNA損傷および遺伝毒性ストレスに誘導される老化後に増加することを示す。

【0038】

【図7A】図7Aは、ウエスタンブロット分析による、DNA損傷直後のクロマチンにおけるH1.0K180のジメチル化(H1.0K180me2)を示す。図7Bは、DNA損傷後からのH1.0K180me2の分泌について示す。

【図7B】図7Aは、ウエスタンブロット分析による、DNA損傷直後のクロマチンにおけるH1.0K180のジメチル化(H1.0K180me2)を示す。図7Bは、DNA損傷後からのH1.0K180me2の分泌について示す。

【0039】

【図8】図8A～8Bは、H1.0K180のジメチル化がPARP-1活性の上流で起こることを示す。図8Aは、H1.0K180me2抗体を使用するウエスタンブロット

10

20

30

40

50

分析を示し、H1.0K180のメチル化が、DNA損傷修復経路のPARP-1機能活性の上流で起こることを明らかにする。図8Bは、PARP-1阻害剤であるAG14361によるPARP活性の阻害について評価し、H1.0K180のメチル化がDNA損傷修復経路のPARP-1機能活性の上流で起こることを支持する。

【0040】

【図9】図9Aおよび9Bは、SRのhADSC、急性DNA損傷、および遺伝毒性ストレスに誘導される老化に関するLC-MS/MS分析(図9A)およびスロットプロット分析(図9B)を示し、ジメチル化されたH1.0K180(H1.0K180me2)が、遺伝毒性ストレスに誘導される老化後にクロマチンから放出され(図9A)、細胞から細胞外マトリックス/細胞培地へと分泌される(図9B)ことを明らかにする。

10

【0041】

【図10A】図10A~10Cは、H1.0K180me2レベルに関するイオン化放射線の効果を示す。図10Aは、イオン化放射線への曝露によってマウス血清中の循環H1.0K180me2レベルの上昇が誘導されることを示す。図10Aおよび図10Bは、血清中のH1.0K180me2エピトープに特異的な抗体を使用する、H1.0K180me2の存在(図10A)および定量化(図10B)のスロットプロット分析を示す。図10Cは、X線照射(7Gy)後のマウス血清中の、H1.0K180me2エピトープに特異的な抗体を使用する、H1.0K180me2エピトープレベルの存在についてのウエスタンプロット分析を示す。

【図10B-C】図10A~10Cは、H1.0K180me2レベルに関するイオン化放射線の効果を示す。図10Aは、イオン化放射線への曝露によってマウス血清中の循環H1.0K180me2レベルの上昇が誘導されることを示す。図10Aおよび図10Bは、血清中のH1.0K180me2エピトープに特異的な抗体を使用する、H1.0K180me2の存在(図10A)および定量化(図10B)のスロットプロット分析を示す。図10Cは、X線照射(7Gy)後のマウス血清中の、H1.0K180me2エピトープに特異的な抗体を使用する、H1.0K180me2エピトープレベルの存在についてのウエスタンプロット分析を示す。

20

【0042】

【図11A-B】図11A~11Cは、脳組織および血清中の循環H1.0K180me2の年齢に関連する蓄積を示す。マウス(図11A)およびヒト(図11B)の脳組織中のH1.0K180me2のウエスタンプロット分析が示され、その存在量は生物年齢と共に増加することが明らかにされている。図11Cは、総IgG血清レベルによって正規化したヒト血清試料中のH1.0K180me2レベルを示す。

30

【図11C】図11A~11Cは、脳組織および血清中の循環H1.0K180me2の年齢に関連する蓄積を示す。マウス(図11A)およびヒト(図11B)の脳組織中のH1.0K180me2のウエスタンプロット分析が示され、その存在量は生物年齢と共に増加することが明らかにされている。図11Cは、総IgG血清レベルによって正規化したヒト血清試料中のH1.0K180me2レベルを示す。

【0043】

【図12A】図12A~12Cは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての血清H1.0K180me2の測定の実証性を実証する。図12Aは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合(血清体積によって正規化して)、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。図12Bは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合(総血清IgGレベルによって正規化して)、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。図12Cは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合(総血清タンパク質濃度によって正規化して)、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。

40

【図12B】図12A~12Cは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての血清H1.0K180me2の測定の実証性を実証する。図12Aは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合(血清体積によって正規化して)、アルツハ

50

イマー病を有する個体において減少することを示す。図12Bは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合（総血清IgGレベルによって正規化して）、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。図12Cは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合（総血清タンパク質濃度によって正規化して）、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。

【図12C】図12A～12Cは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしての血清H1.0K180me2の測定の有用性を実証する。図12Aは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合（血清体積によって正規化して）、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。図12Bは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合（総血清IgGレベルによって正規化して）、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。図12Cは、血清H1.0K180me2は、年齢を一致させた対照と比較した場合（総血清タンパク質濃度によって正規化して）、アルツハイマー病を有する個体において減少することを示す。

10

【0044】

【図13A】図13Aは、H1.0K180me2に対して生じたヒトIgG自己抗体は、間接ELISA法を使用して様々なヒト生体液（血漿、尿、唾液）において検出することができることを示す。図13Bは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1.0K180me2に対するIgG自己抗体の測定の有用性を実証する。

【図13B】図13Aは、H1.0K180me2に対して生じたヒトIgG自己抗体は、間接ELISA法を使用して様々なヒト生体液（血漿、尿、唾液）において検出することができることを示す。図13Bは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1.0K180me2に対するIgG自己抗体の測定の有用性を実証する。

20

【0045】

【図14A】図14Aは、試験および正規化条件下で、H1.0K180me2に対するIgM抗体を測定する概略図を示す。

【0046】

【図14B】図14Bは、総IgMの測定結果および450nmにおける光学密度（O.D.）に対する抗IgMモル濃度の標準曲線を示す。IgM濃度は、この曲線から推測される。ボックスプロットは総IgM濃度を示し、総IgMレベルがアルツハイマー病（AD）を有する個体と有さない個体を識別しないことを実証する。

30

【0047】

【図14C】図14Cは、H1.0K180me2 IgM自己抗体の測定および定量化のための間接ELISAアッセイの使用の概略図である。

【0048】

【図14D】図14Dは、450nmにおける光学密度（O.D.）に対する抗IgGモル濃度の標準曲線を示す。IgM濃度は、この曲線から推測されうる。

【0049】

【図14E】図14Eは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1.0K180me2を対象とするIgM自己抗体の測定の有用性を実証する（図は、正規化されていない生データを示す）。

40

【0050】

【図15A】図15Aは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1.0K180me2に対するIgM自己抗体の測定の有用性を実証する（図は、総IgMレベルに対して正規化したデータを示す）。

【0051】

【図15B】図15Bは、異なる操作者と異なる実験室設定の間のH1.0K180me2 IgM自己抗体の測定および定量化のための血清学的間接ELISAの診断特性の安定性および再現性を実証する。

【0052】

【図16A】図16Aは、総IgMとH1.0K180me2 IgM自己抗体の間の相

50

関がアルツハイマー病と神経学的対照患者の両方において有意でない (R^2 値に対して) ことを実証する。

【0053】

【図16B】図16Bは、総非修飾H1.0タンパク質レベル(左のグラフ)および総H1.0 IgM自己抗体レベル(右のグラフ)は、アルツハイマー病を有する個体と有さない個体を識別しないことを実証する。

【0054】

【図17】図17は、H1.0K180me2 IgGおよびH1.0K180me2 IgM自己抗体を測定すること、ならびに2つの測定値の相関を調べることによって、アルツハイマー病を有する患者を別個の亜集団に階層化することができることを実証する。

10

【0055】

【図18】図18は、プレオマイシン処置後のSR hADSCにおけるH1.0K180me2のウエスタンブロット分析を示し、ラパマイシンの誘導体であるエペロリムスが、DNA損傷の際のH1.0K180me2の出現をブロックするよう作用することができることを明らかにする。

【0056】

【図19】図19は、プレオマイシンまたはテモゾロミド処置後のSR hADSCにおけるH1.0K180me2のウエスタンブロット分析を示し、塩基除去修復経路を誘発することができる化学療法薬であるテモゾロミドもH1.0K180のメチル化を導くことを明らかにする。

20

【0057】

【図20-1】図20は、H1.0K180me2動態に対するmTORおよびPI3K阻害剤の効果を示す。

【図20-2】図20は、H1.0K180me2動態に対するmTORおよびPI3K阻害剤の効果を示す。

【0058】

【図21】図21A~21Bは、*in vitro*でのG9Aメチルトランスフェラーゼによるメチル化アッセイの結果を示す。G9Aメチルトランスフェラーゼは、H1.0ペプチドをメチル化することが可能であり(図21A)、全長H1.0タンパク質をメチル化することが可能である(図21B)。

30

【0059】

【図22A】図22Aは、非メチル化H1.0ペプチドの存在下で、G9Aメチルトランスフェラーゼが、特異的かつ多量にH1.0K180をジメチル化する(全ペプチドの99.9%)ことを示す。

【図22B】図22Bは、G9およびGLPメチルトランスフェラーゼのメチル化効率の表形式の表示(*tabular representation*)である。

【0060】

【図23】図23は、ジメチル化H1.0ペプチドの存在下で、最小限のさらなるメチル化が起こる(ペプチドの2.64%のみがさらにメチル化される)ことを示す。

【0061】

【図24】図24は、組換え全長H1.0の存在下で、G9Aメチルトランスフェラーゼが、H1.0K180me2を含むC末端リシン残基をメチル化することを示す。

40

【0062】

【図25】図25は、非メチル化H1.0ペプチドの存在下で、GLPメチルトランスフェラーゼがH1.0K180を特異的にジメチル化し(全ペプチドの96.6%)、H1.0K180me2を生成することを示す。

【0063】

【図26】図26は、K180ジメチル化H1.0ペプチドの存在下で、GLPメチルトランスフェラーゼが、H1.0K180およびH1.0K174のみを、非常に低い効率でのみわずかにさらにメチル化することを示す(ペプチドの1.02%がさらにメチル化

50

される)。

【0064】

【図27】図27は、GLPメチルトランスフェラーゼによる組換え全長H1.0タンパク質のメチル化を示す。

【0065】

【図28A】図28A～28Bは、ヒト脂肪細胞由来幹細胞(hADSC)におけるG9AのsiRNAノックダウンにより、プレオマイシン処置(図28A)の際のH1.0K180me2レベルの低減(図28B)が導かれたことを示す。

【図28B】図28A～28Bは、ヒト脂肪細胞由来幹細胞(hADSC)におけるG9AのsiRNAノックダウンにより、プレオマイシン処置(図28A)の際のH1.0K180me2レベルの低減(図28B)が導かれたことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0066】

詳細な説明

ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質であり、リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応し、ジメチル化リシン残基が結合するのに必要である抗体(H1.0K180me2抗体)が本明細書において提供される。

【0067】

ジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0ペプチド、またはジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0タンパク質であって、ジメチル化リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質(H1.0K180me2ペプチドおよびH1.0K180me2タンパク質)も本明細書において提供される。

【0068】

これらのH1.0K180me2抗体、H1.0K180me2ペプチド、およびH1.0K180me2タンパク質は、治療および診断用途のために本明細書において提供される。これらのH1.0K180me2抗体、H1.0K180me2タンパク質、およびH1.0K180me2ペプチドは、個体のメチル化H1.0関連疾患または状態の処置において使用してもよい。これらのH1.0K180me2抗体、H1.0K180me2タンパク質、およびH1.0K180me2ペプチドは、複製老化、DNA損傷、遺伝毒性ストレス、放射線曝露、アルツハイマー病を検出し、治療レジメン、患者の階層化、薬物スクリーニングをモニタリングするために使用されてもよく、系内の生物学的老化のマーカーとしての役割を果たす場合がある。

【0069】

これらおよび関連する組成物および方法が本明細書に記載されている。

I. ジメチル化タンパク質およびペプチド

A. ジメチル化H1.0K180me2タンパク質およびペプチド

【0070】

用語「ペプチド」、「タンパク質」、および「ポリペプチド」は、本明細書で使用する場合、アミノ酸の高分子を指し、他に明示されていなければ、天然に存在するアミノ酸と同様の方式で機能する異常アミノ酸を含む。

【0071】

ジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0タンパク質およびヒストンH1.0ペプチドであって、リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するタンパク質およびペプチドが、本明細書において提供される。ヒトH1.0タンパク質のK180に対応する残基にジメチル化リシンを含むヒストンH1.0タンパク質は、本明細書において、「H1.0K180me2タンパク質」と称される。ヒトH1.0タンパク質のK180に対応する残基にジメチル化リシンを含むヒストンH1.0ペプチドは、本明

10

20

30

40

50

細書において、「H1.0K180me2ペプチド」と称される。これらは、単に、「H1.0K180me2」と総称する場合もある。

【0072】

本明細書で議論されるH1.0タンパク質の残基の位置は、参照アミノ酸配列に関して特定される。残基の位置を特定するために使用されるヒトH1.0ヒストンタンパク質は、NCBI参照配列：NP_005309.1であり、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_005309.1でアクセスすることができる。この場合には、「H1.0残基リシン180」または「H1.0K180」または「K180」への言及は、ヒトヒストンH1.0において、メチオニンが最初の残基であるN末端から180番目のアミノ酸である残基を特定する。180番目の残基は、ヒトH1.0のリシン(K)である。当業者は、K180残基は、異なる種に由来するH1タンパク質または異なるアイソフォームにおいて、異なる位置を有する可能性があることを認識する。

【0073】

本明細書において、用語「K180」の使用は、ヒトH1.0タンパク質のK180に対応する残基を指す。同様に、用語「K172」は、ヒトH1.0タンパク質などのK172に対応する残基を指す。

【0074】

表1は、連続して1~194と付番した全長ヒトH1.0タンパク質の194-アミノ酸配列(NCBI参照配列：NP_005309.1)を提供する。K180残基はK*として示される。

【表1】

表1: ヒトH1.0タンパク質の全長配列

1 MTENSTSAPAAKPKRAKASK KSTDHPKYSD MIVAAIQAEK NRAGSSRQSI QKYIKSHYKV
61 GENADSQIKL SIKRLVTTGV LKQTKGVGAS GSFRLAKSDE PKKSVAFKKT KKEIKKVATP
121 KKASKPKKAA SKAPTKKPKA TPVKKAKKKL AATPKKAKKP KTVKAKPVKA SKPKKAKPVK*
181 PKAKSSAKRA GK KK (配列番号 1)

【0075】

表2は、連続して1~194と付番したK180でジメチル化された全長ヒトH1.0タンパク質の194-アミノ酸配列を提供する。K180me2残基はK(me2)として示される。

【表2】

表2: K180でジメチル化されたヒトH1.0タンパク質の全長配列

1 MTENSTSAPAAKPKRAKASK KSTDHPKYSD MIVAAIQAEK NRAGSSRQSI QKYIKSHYKV
61 GENADSQIKL SIKRLVTTGV LKQTKGVGAS GSFRLAKSDE PKKSVAFKKT KKEIKKVATP
121 KKASKPKKAA SKAPTKKPKA TPVKKAKKKL AATPKKAKKP KTVKAKPVKA SKPKKAKPVK{me2}
181 PKAKSSAKRA GK KK (配列番号 2)

【0076】

ある特定の実施形態では、ジメチル化H1.0K180me2ペプチド(本明細書において提供されるH1.0K180me2抗体によって認識されるK180me2エピトープを含む)は、表3Aに提示される配列から選択されるアミノ酸配列を含む。

【表 3 A - 1】

表3A:例示的H1.0K180me2ペプチド

AKPVKASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 3)
KPVKASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 4)
PVKASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 5)
VKASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 6)
KASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 7)
ASKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 8)
SKPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 9)
KPKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 10)
PKKAKPVK(me2)PK	(配列番号 11)
KKAKPVK(me2)PK	(配列番号 12)
KAKPVK(me2)PK	(配列番号 13)
AKPVKASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 14)
KPVKASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 15)
PVKASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 16)
VKASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 17)
KASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 18)

10

20

【表 3 A - 2】

ASKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 19)
SKPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 20)
KPKKAKPVK(me2)P	(配列番号 21)
PKKAKPVK(me2)P	(配列番号 22)
KKAKPVK(me2)P	(配列番号 23)
KAKPVK(me2)P	(配列番号 24)
AKPVKASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 25)
KPVKASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 26)
PVKASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 27)
VKASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 28)
KASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 29)
ASKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 30)
SKPKKAKPVK(me2)	(配列番号 31)
KPKKAKPVK(me2)	(配列番号 32)
PKKAKPVK(me2)	(配列番号 33)
KKAKPVK(me2)	(配列番号 34)
KAKPVK(me2)	(配列番号 35)

10

20

【0077】

本明細書の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質およびペプチドは、種々の目的で、例えば、これらに限定されないが、治療、検出、診断、可視化、定量化、選別において使用するため、およびこれらの治療用途に関する生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされていてもよい。

30

【0078】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質およびペプチドは、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含む（例えば、標識にコンジュゲートされている）。例示の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質/ペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質/ペプチドは、固体表面、例えば、ビーズ（例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ）、カラム、樹脂、またはマイクロプレートにコンジュゲートされているかまたは付着されている。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質/ペプチドは、マイクロプレート上にコーティングされている。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質/ペプチドは、エフェクター分子、例えば、これらに限定されないが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、免疫モジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、および二次抗体にコンジュゲートされているかまたはこれらを含んでいる。

40

【0079】

一部の実施形態では、アミノ酸配列は、例えば、コンジュゲーションを目的として、追加の末端残基をさらに含む。一部の実施形態では、アミノ酸配列は、C末端残基をさらに

50

含む。このような実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、アミノ酸配列CAKPKVKAASKPKKAKPKVKPK(配列番号36)、CAKPKVKAASKPKKAKPKVKPKC(配列番号37)、AKPKVKAASKPKKAKPKVKPKC(配列番号38)、CAKPKVKAASKPKKAKPKVK(me²)PK(配列番号39)、CAKPKVKAASKPKKAKPKVK(me²)PKC(配列番号40)、またはAKPKVKAASKPKKAKPKVK(me²)PKC(配列番号41)を含んでもよい。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、本明細書において提供されるH1.0K180me2ペプチドのうちのいずれか1つの断片を含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、KLH(キーホールリンペットヘモシアニン)、OVA(卵白アルブミン)、BC(バクテリアセルロース)またはBSA(ウシ血清アルブミン)にコンジュゲートされている。

10

【0080】

本明細書において提供されるH1.0K180me2タンパク質およびペプチドは、病態生理の検出において、またH1.0K180me2の存在の定量的評価を組み込む方法において参照標準として含めるのにも有用である。

【0081】

タンパク質またはペプチドの*in vitro*でのメチル化は、従来より、特異性(例えば、メチル化される基質に対する特異性、およびその制御)を課題とする。G9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼを使用するH1.0タンパク質(またはそのペプチド断片)のK180残基の選択的ジメチル化を可能とする方法が本明細書に記載されている。

20

【0082】

ヒストンH1.0タンパク質をリシン残基180(K180)で特異的にジメチル化すること(K180me2を有するH1.0)およびヒストンH1.0タンパク質のペプチド断片をK180に対応するリシンで特異的にジメチル化することに関する組成物および方法が本明細書において提供される。

B. H1.0K180me2ペプチドの生成

【0083】

H1.0K180me2ペプチドは、病態生理の間接的検出において、またこれらに限定されないが(1)少なくともDNA損傷、遺伝毒性ストレス(例えば、環境曝露に関連する)、放射線曝露、化学療法およびDNA損傷ペイロードを有する抗体を用いる免疫療法、放射線療法およびアルツハイマー病の分子診断、(2)治療レジメンおよび患者の階層化のモニタリング、(3)薬物スクリーニングならびに(4)治療用途を含む方法におけるデータの定量化のための参照標準として含めるのにも有用である。

30

【0084】

本明細書において提供されるH1.0K180me2ペプチドは、5~193アミノ酸(aa)長の範囲である。種々の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドの長さは、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa、25aa、26aa、27aa、28aa、29aa、または30aaである。ある特定の例示的実施形態では、H1.0K180me2ペプチドの長さは、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、または20aaである。

40

【0085】

本明細書に記載されている方法および組成物を使用して合成により生成することができる例示的H1.0K180me2ペプチドが表3Aに列挙されている。一部の実施形態では、本発明のH1.0K180me2ペプチドは、表3Aに提示されているものから選択される配列のうちの1つを含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、表3Aに提示されているものから選択される配列のうちの1つからなる。例示的実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、配列番号3、配列番号4、または配列番

50

号5の配列を含む。例示的实施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、配列番号3、配列番号4、または配列番号5の配列からなる。表3Aにおいて提供されるペプチドは、標識、例えば、ビオチンをさらに含む場合がある。

【0086】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成（合成により生成したH1.0K180me2ペプチド）のための方法が本明細書において提供される。一般的に、方法は、ヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基の特異的ジメチル化（*in vitro*でのメチル化）を可能にする条件下で、基質ペプチドをG9Aメチルトランスフェラーゼ酵素またはG9A様タンパク質（GLP）メチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む。種々の実施形態では、基質H1.0ペプチドは、表3Bに提示される配列の群から選択される配列を含む。関連する実施形態では、ペプチドは、表3Bに提示される配列の群から選択される配列である。

10

【0087】

メチル化のために使用されるペプチドは、合成により生成されうるかまたは当業者が精通する方法を使用して生成されうる。

【表 3 B - 1】

表3B: *In vitro*でのメチル化のためのH1.0ペプチド

AKPVKASKPKKAKPVKPK	(配列番号 42)
KPVKASKPKKAKPVKPK	(配列番号 43)
PVKASKPKKAKPVKPK	(配列番号 44)
VKASKPKKAKPVKPK	(配列番号 45)
KASKPKKAKPVKPK	(配列番号 46)
ASKPKKAKPVKPK	(配列番号 47)
SKPKKAKPVKPK	(配列番号 48)
KPKKAKPVKPK	(配列番号 49)
PKKAKPVKPK	(配列番号 50)
KKAKPVKPK	(配列番号 51)
KAKPVKPK	(配列番号 52)
AKPVKASKPKKAKPVKP	(配列番号 53)
KPVKASKPKKAKPVKP	(配列番号 54)
PVKASKPKKAKPVKP	(配列番号 55)
VKASKPKKAKPVKP	(配列番号 56)
KASKPKKAKPVKP	(配列番号 57)
ASKPKKAKPVKP	(配列番号 58)
SKPKKAKPVKP	(配列番号 59)
KPKKAKPVKP	(配列番号 60)
PKKAKPVKP	(配列番号 61)
KKAKPVKP	(配列番号 62)
KAKPVKP	(配列番号 63)
AKPVKASKPKKAKPVK	(配列番号 64)
KPVKASKPKKAKPVK	(配列番号 65)
PVKASKPKKAKPVK	(配列番号 66)
VKASKPKKAKPVK	(配列番号 67)

10

20

30

40

【表 3 B - 2】

KASKPKKAKPVK	(配列番号 68)
ASKPKKAKPVK	(配列番号 69)
SKPKKAKPVK	(配列番号 70)
KPKKAKPVK	(配列番号 71)
PKKAKPVK	(配列番号 72)
KKAKPVK	(配列番号 73)
KAKPVK	(配列番号 74)

10

【0088】

一般的に、ヒストンH1.0ペプチドをジメチル化するための方法は、特異的にジメチル化されたペプチドを生成する条件下で、ペプチドをメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップであって、ペプチドが、ヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基で特異的にジメチル化され、メチルトランスフェラーゼ酵素がG9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼであるステップを含む。

20

【0089】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、G9Aメチルトランスフェラーゼは、組換えG9Aメチルトランスフェラーゼ、精製G9A哺乳動物メチルトランスフェラーゼ、ヒトG9Aメチルトランスフェラーゼ、マウスG9Aメチルトランスフェラーゼなどであってもよい。G9Aメチルトランスフェラーゼは、酵素として活性なオルソログ、キメラおよび酵素ドメインを含有する人工的にまたは天然に生成されたアイソフォームを含む。

【0090】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、GLPメチルトランスフェラーゼは、組換えGLPメチルトランスフェラーゼ、精製GLP哺乳動物メチルトランスフェラーゼ、ヒトGLPメチルトランスフェラーゼ、マウスGLPメチルトランスフェラーゼなどであってもよい。GLPメチルトランスフェラーゼは、酵素として活性なオルソログ、キメラおよび酵素ドメインを含有する人工的にまたは天然に生成されたアイソフォームを含む。

30

【0091】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、メチルドナーは、S-アデノシル-L-メチオニン(SAM)であってもよい。

【0092】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、接触させるステップは、メチル化緩衝液中でなされてもよい。

40

【0093】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、ペプチドは、メチル化に先立って、標識(例えば、ビオチン)を含んでもよい。

【0094】

H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態では、ペプチドは、メチル化後に、標識(例えば、ビオチン)にコンジュゲートされていてもよい。

【0095】

H1.0K180me2ペプチド基質の*in vitro*でのメチル化のための方法の実施形態では、生成物の50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、9

50

0%、95%、99%、またはさらに99.9%超は、K180me2を含む。同様に、H1.0K180me2ペプチドの*in vitro*での生成のための方法の実施形態において、種々の実施形態では、生成物の50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%未満、または0.35%未満は、他のメチル化残基（例えば、K172me1、K172me2、K172me3、K174me1、K174me2、K174me3、K175me1、K175me2、K175me3、K177me1、K177me2、K177me3、K166me1、K166me2、K166me3、K180me1、および/またはK180me3）も含有する。例示的实施形態では、K180me2を有する生成物の0.35%未満は、K174me3、K175me3、およびK177me1も含み、K180me2を有する生成物の1.25%未満は、K166me1も含み、K180me2を有する生成物の1.04%未満は、K174me1およびK180me3を含む。

10

【0096】

一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、H1.0K180me2抗原に特異的である抗体（H1.0K180me2抗体）に結合する。ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0ペプチドであり、リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する抗体が本明細書において提供される。

【0097】

ある特定の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、約0.0001nM～約1μMの解離定数（Kd）でH1.0K180me2抗体に結合する。例えば、ペプチドのKdは、約1μM、約100nM、約50nM、約10nM、約5nM、約1nM、約0.5nM、約0.1nM、約0.05nM、約0.01nM、約0.005nM、約0.001nM、約0.0005nM、またはさらに約0.0001nMであってもよい。

20

【0098】

一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、抗ヒトH1.0K180me2抗体に特異的である。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、他の種由来のH1.0K180me2抗体と交差反応性である。

【0099】

一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、H1.0K180me2抗体に対して選択的であり、H1.0K180me1またはH1.0K180me3抗体に対してほとんどまたは全く結合性を示さない。

30

【0100】

一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドのH1.0K180me2抗体に対する結合優先性（例えば、親和性）は、一般的に、非特異的標的抗体（例えば、無作為に生じた抗体）に対して、少なくとも約2倍、約5倍、または少なくとも約10、20、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、もしくは 10^6 倍である。

【0101】

H1.0K180me2ペプチドは、ペイロード（例えば、これらに限定されないが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、アンタゴニスト、アゴニストまたは受容体デコイを含む）を有する抗体に等しく特異的/選択的でありうる。

40

【0102】

本明細書において提供されるH1.0K180me2ペプチドは、種々の目的で、例えば、これらに限定されないが、検出、診断、可視化、定量化、選別、治療において使用するため、および生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされていてもよい。

【0103】

一部の実施形態では、H1.0ペプチドまたはH1.0K180me2ペプチドは、標

50

識（例えば、メチル化の前または後のいずれかにコンジュゲートされた）、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、磁気標識などを含む。

【0104】

一部の実施形態では、ヒストンH1.0ペプチドおよびメチルトランスフェラーゼ酵素を含む複合体であって、*in vitro*中（例えば、試験管、チューブ、反応チャンバー、反応容器など）にある複合体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、H1.0ペプチドは、配列番号42～74からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ酵素は、G9Aメチルトランスフェラーゼ酵素である。一部の実施形態では、メチルトランスフェラーゼ酵素は、GLPメチルトランスフェラーゼ酵素である。

10

C. H1.0K180me2タンパク質の生成

【0105】

本明細書に記載されている全長H1.0K180me2タンパク質は、病態生理の検出において、またこれらに限定されないが（1）少なくともDNA損傷、遺伝毒性ストレス（例えば、環境曝露に関連する）、放射線曝露、化学療法およびDNA損傷ペイロードを有する抗体を用いる免疫療法、放射線療法、およびアルツハイマー病の分子診断、（2）治療レジメンおよび患者の階層化のモニタリング、（3）薬物スクリーニングならびに（4）治療薬としての使用を含む方法において参照標準として含めるのにも有用である。

20

【0106】

一部の実施形態では、特異的にジメチル化されたタンパク質を生成する条件下で、タンパク質をメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む、ヒストンH1.0タンパク質をジメチル化するための*in vitro*方法であって、タンパク質がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応するリシン残基で特異的にジメチル化され、メチルトランスフェラーゼ酵素がG9AメチルトランスフェラーゼまたはGLPメチルトランスフェラーゼである方法が本明細書において提供される。

【0107】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法が本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、K180残基の特異的ジメチル化を可能とする条件下で、全長H1.0タンパク質をG9Aメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む。G9Aメチルトランスフェラーゼは、酵素として活性なオルソログ、キメラおよび酵素ドメインを含有する人工的にまたは天然に生成されたアイソフォームを含む。

30

【0108】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法が本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、K180残基の特異的ジメチル化を可能とする条件下で、全長H1.0タンパク質をGLPメチルトランスフェラーゼ酵素およびメチルドナーと接触させるステップを含む。GLPメチルトランスフェラーゼは、酵素として活性なオルソログ、キメラおよび酵素ドメインを含有する人工的にまたは天然に生成されたアイソフォームを含む。

40

【0109】

*in vitro*でのメチル化のために使用される全長H1.0非メチル化タンパク質基質は、当業者が精通する方法を使用して、単離、合成により生成、または組換えにより生成されてもよい。H1.0K180me2タンパク質をコードする核酸が本明細書において提供される。本明細書において提供されるH1.0K180me2タンパク質をコードする核酸のいずれかを含むベクターも本明細書において提供される。

【0110】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*でのメチル化または*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、G9Aメチルトランスフェラーゼは組換えG9Aメチルトランスフェラーゼ、精製G9A哺乳動物メチルトランスフェラーゼ

50

、ヒトG9Aメチルトランスフェラーゼ、マウスG9Aメチルトランスフェラーゼなどであってよい。

【0111】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*でのメチル化または*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、GLPメチルトランスフェラーゼは、組換えGLPメチルトランスフェラーゼ、精製GLP哺乳動物メチルトランスフェラーゼ、ヒトGLPメチルトランスフェラーゼ、またはマウスGLPメチルトランスフェラーゼであってよい。

【0112】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、タンパク質は、メチル化に先立って、標識（例えば、ビオチン）を含んでもよい。

10

【0113】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、タンパク質は、メチル化後に、標識（例えば、ビオチン）にコンジュゲートされていてもよい。

【0114】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*でのメチル化または*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、メチルドナーは、S-アデノシル-L-メチオニンである。

20

【0115】

H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、接触させるステップは、メチル化緩衝液中でなされる。

【0116】

H1.0K180me2タンパク質基質の*in vitro*でのメチル化のための方法の実施形態では、生成物の50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、またはさらに99.9%超は、K180me2を含んでもよい。同様に、H1.0K180me2タンパク質の*in vitro*での生成のための方法の一部の実施形態では、生成物の50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%未満、または0.35%未満は、他のメチル化残基（例えば、K172me1、K172me2、K172me3、K174me1、K174me2、K174me3、K175me1、K175me2、K175me3、K177me1、K177me2、K177me3、K166me1、K166me2、K166me3、K180me1、および/またはK180me3）も含有する。例示的实施形態では、K180me2を有する生成物の0.35%未満は、K174me3、K175me3、およびK177me1も含み、K180me2を有する生成物の1.25%未満は、K166me1も含み、ならびに/またはK180me2を有する生成物の1.04%未満は、K174me1およびK180me3を含む。

30

【0117】

ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0タンパク質に見られ、リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する抗体が本明細書において提供される。

40

【0118】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、H1.0K180me2に特異的である抗体（H1.0K180me2抗体）に対して選択的である。一部の実施形態では、ペプチドは、H1.0K180me2に非特異的である抗体に結合する。

【0119】

ある特定の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、約0.0001nM~約1μMの解離定数(Kd)でH1.0K180me2抗体に結合する。例えば、Kd

50

は、約 $1 \mu\text{M}$ 、約 100 nM 、約 50 nM 、約 10 nM 、約 5 nM 、約 1 nM 、約 0.5 nM 、約 0.1 nM 、約 0.05 nM 、約 0.01 nM 、約 0.005 nM 、約 0.001 nM 、約 0.0005 nM 、またはさらに約 0.0001 nM であってもよい。

【0120】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、抗ヒトH1.0K180me2抗体に特異的である。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、他の種由来のH1.0K180me2抗体と交差反応性である。

【0121】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質は、H1.0K180me2抗体に対して選択的であり、H1.0K180me1またはH1.0K180me3抗体に対してほとんどまたは全く結合性を示さない。

10

【0122】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質のH1.0K180me2抗体に対する結合優先性（例えば、親和性）は、一般的に、非特異的標的抗体（例えば、無作為に生じた抗体）に対して、少なくとも約2倍、約5倍、または少なくとも約10、20、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、もしくは 10^6 倍である。

【0123】

本明細書において提供されるH1.0K180me2タンパク質は、種々の目的で、例えば、これらに限定されないが、検出、診断、可視化、定量化、選別、治療において使用するため、および生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされて

20

【0124】

一部の実施形態では、H1.0タンパク質（H1.0基質）またはH1.0K180me2タンパク質は、標識（メチル化の前または後のいずれかに）、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、磁気標識などにコンジュゲートされている。

II.ジメチル化ヒストンH1.0タンパク質およびペプチドに結合する抗体

A. H1.0K180me2抗体

【0125】

ジメチル化抗原に特異的に結合する抗体であって、ジメチル化抗原がジメチル化リシン残基を含むヒストンH1.0ペプチドまたはヒストンH1.0タンパク質であり、リシン残基がヒトヒストンH1.0タンパク質のK180に対応する抗体が本明細書において提供される。このジメチル化抗原は、H1.0K180me2抗原であり、H1.0K180me2エピトープとも称される。これらの抗体は、H1.0K180me2タンパク質およびH1.0K180me2ペプチドのH1.0K180me2エピトープに特異的に結合する。これらの抗体は、ジメチル化抗原に特異的に結合し（H1.0K180me2エピトープに特異的に結合し）、結合するのにK180にジメチル基の存在を必要とする。用語「抗H1.0K180me2」または「H1.0K180me2抗体」または「抗H1.0K180me2抗体」は、互換的に、これらの抗体を指す。

30

【0126】

用語「抗体」は、本明細書全体を通して使用する場合、最も広い意味においてであり、これらに限定されないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、非ヒト抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、多機能抗原結合性断片（例えば、Fab断片、Fab'2断片、CDRまたはScFv）、抗体-薬物コンジュゲート、およびH1.0K180me2抗原に対する特異性を保持する他の抗体断片を含む。一部の実施形態では、抗体は、H1.0K180me2抗原に対する特異性を保持する単鎖抗体である。

40

【0127】

H1.0K180me2抗体の模式的結合が図5Aに示されている。

【0128】

50

一部の実施形態では、本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、診断抗体である。

【 0 1 2 9 】

一部の実施形態では、本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、治療用抗体である。

【 0 1 3 0 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、高力価で存在する。

【 0 1 3 1 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、親和性精製抗体である。

【 0 1 3 2 】

本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、種々の目的で、例えばこれらに限定されないが、検出、診断、可視化、定量化、選別、治療において使用するため、および生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされていてもよい。

【 0 1 3 3 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含む（例えば、標識にコンジュゲートされている）。

【 0 1 3 4 】

一部の実施形態では、抗体は、固体表面、例えば、ビーズ（例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ）、カラム、樹脂またはマイクロプレートにコンジュゲートされているかまたは付着されている。一部の実施形態では、抗体は、マイクロプレートにコーティングされている。

【 0 1 3 5 】

一部の実施形態では、抗体は、エフェクター分子、例えば、これらに限定されないが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、s i R N A、および二次抗体にコンジュゲートされているかまたはこれらを含んでいる。

【 0 1 3 6 】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 バイオマーカーは、クロマチン結合される場合があるか、またはクロマチンから核、細胞質、もしくは細胞外のスペースへと放出される場合があることが認識される。本明細書において提供される抗体は、細胞外 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 および/または細胞内 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に結合することができる。細胞内である場合、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原は、クロマチンにさらに結合されるか、または核中で放出されるか、核から細胞質スペースへと放出されるか、もしくは細胞質の下位構造中にさらに局在化してもよい。

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、抗体（例えば、治療用抗体）は中和抗体であり、抗体は H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の 1 種または複数の生体活性を中和する。例えば、抗体は、細胞外 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に結合し、抗体が有しうるあらゆる結合またはシグナル伝達活性を中和する。

【 0 1 3 8 】

本明細書において提供される抗体は、I g G、I g A、I g E、I g D、または I g M などの任意の免疫グロブリンタイプのものであってもよい。一部の実施形態では、抗体は I g G サブタイプのものであり、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、または I g G 4 抗体であってもよい。

【 0 1 3 9 】

任意の種に由来する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に特異的な抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、ヒト H 1 . 0 K 1 8 0 m e

10

20

30

40

50

2 に特異的である。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、他の種に由来の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 と交差反応性である。

【 0 1 4 0 】

本明細書において提供される抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 と特異的に結合する。一部の実施形態では、これらの抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 と特異的かつ選択的に結合する。

【 0 1 4 1 】

本明細書において提供される抗体は、ジメチル化抗原に特異的に結合し、ジメチル化 H 1 . 0 抗原はジメチル化リシン残基を含み、リシン残基はヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 8 0 に対応し (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原)、一部の実施形態では、ジメチル化抗原は、メチル化されたいずれの他のリシン残基も含まない。

10

【 0 1 4 2 】

一部の実施形態では、抗原がジメチル化リシン残基を含む場合、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎず、リシン残基はヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、および / または K 1 7 7 に対応する。

【 0 1 4 3 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、以下の残基 : K 1 7 2 m e 1、K 1 7 2 m e 2、K 1 7 2 m e 3、K 1 7 4 m e 1、K 1 7 4 m e 2、K 1 7 4 m e 3、K 1 7 5 m e 1、K 1 7 5 m e 2、K 1 7 5 m e 3、K 1 7 7 m e 1、K 1 7 7 m e 2、K 1 7 7 m e 3、K 1 6 6 m e 1、K 1 6 6 m e 2、K 1 6 6 m e 3、K 1 8 0 m e 1、および / または K 1 8 0 m e 3 の 1 つまたは複数を含む抗原に結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。

20

【 0 1 4 4 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、ジメチル化 K 1 8 0 残基を含むが、以下の残基 : K 1 7 2 m e 1、K 1 7 2 m e 2、K 1 7 2 m e 3、K 1 7 4 m e 1、K 1 7 4 m e 2、K 1 7 4 m e 3、K 1 7 5 m e 1、K 1 7 5 m e 2、K 1 7 5 m e 3、K 1 7 7 m e 1、K 1 7 7 m e 2、K 1 7 7 m e 3、K 1 6 6 m e 1、K 1 6 6 m e 2、K 1 6 6 m e 3、K 1 8 0 m e 1、および / または K 1 8 0 m e 3 の 1 つまたは複数を含む抗原に結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。

30

【 0 1 4 5 】

一部の実施形態では、抗原が、ヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および / または K 1 8 0 に対応するリシン残基においてモノメチル化リシン残基を含む場合、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。

【 0 1 4 6 】

一部の実施形態では、抗原が、ヒトヒストン H 1 . 0 タンパク質の K 1 6 6、K 1 7 2、K 1 7 4、K 1 7 5、K 1 7 7、および / または K 1 8 0 に対応するリシン残基においてトリメチル化リシン残基を含む場合、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は結合しないか、または最小限に結合するにすぎない。

40

【 0 1 4 7 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、残基 K 1 8 0 におけるジメチル化に対して選択的であり、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 1 エピトープまたは H 1 . 0 K 1 8 0 m e 3 エピトープについてほとんどまたは全く結合性を示さない。

【 0 1 4 8 】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、任意の培地で、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 エピトープに結合する。

【 0 1 4 9 】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、K 1 8 0 のモノメチル化抗原 (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 1 抗原) よりも、K 1 8 0 のジメチル化抗原 (H 1 . 0 K 1 8 0 m

50

e 2 抗原) に対して、少なくとも 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、2.7 倍、5 倍、またはさらに 10 倍高い特異性 (結合優先性、親和性) を呈する。(図 3 D) 一部の実施形態では、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 抗原に対する特異性は、一般的に、非特異的標的分子 (例えば、特異的に認識される部位を欠く、無作為に生じた分子) に対して、モノメチル化 K 1 8 0 残基に対して、トリメチル化 K 1 8 0 残基に対して、または任意の他の残基でメチル化された H 1.0 タンパク質に対して、少なくとも約 2 倍、約 5 倍、または少なくとも約 10、20、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、もしくは 10^6 倍である。

【0150】

一部の実施形態では、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 抗体の結合効率は、E L I S A アッセイによってモニターされる。一部の実施形態では、抗体は、H 1.0 K 1 8 0 m e 1 ペプチドよりも、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドに少なくとも 2.7 倍効率的に結合する。一部の実施形態では、抗体 1 分子は、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドの 117 分子のうちの 1 つを認識するが、H 1.0 K 1 8 0 m e 1 ペプチドの 316 分子のうちの 1 つしか認識しない。

10

【0151】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される抗体は、 $0.0001 \text{ nM} \sim 1 \mu\text{M}$ の範囲の解離定数 (Kd) を有する。例えば、抗体の Kd は、約 $1 \mu\text{M}$ 、約 100 nM 、約 50 nM 、約 10 nM 、約 5 nM 、約 1 nM 、約 0.5 nM 、約 0.1 nM 、約 0.05 nM 、約 0.01 nM 、約 0.005 nM 、約 0.001 nM 、約 0.0005 nM 、またはさらに約 0.0001 nM であってもよい。

20

B. H 1.0 K 1 8 0 m e 2 抗体の生成

【0152】

様々なイムノアッセイフォーマットを使用して、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 と特異的に免疫反応性である抗体を選択してよい。例えば、固相 E L I S A イムノアッセイを使用して、H 1.0 K 1 8 0 m e 2 に特異的なモノクローナル抗体を選択してよい (例えば、特異的な免疫反応性を決定するために使用されてよいイムノアッセイフォーマットおよび条件についての記載として、Harlow および Lane (1988 年) Antibodies、A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Publications、New York を参照のこと)。

【0153】

本明細書において提供される抗体の産生は、当業者に公知の任意の方法によるのもであってもよい。例えば、一部の実施形態では、抗体は、所望の抗体の所望の V H、V L および定常ドメインを発現するよう工学的に操作された組換え細胞によって産生される。一部の実施形態では、抗体は、ハイブリドーマによって産生される。

30

【0154】

一部の実施形態では、任意選択で免疫原性担体に連結した H 1.0 K 1 8 0 m e 2 抗原を含む任意のペプチドが、標準プロトコールを使用して免疫化に使用される。一部の実施形態では、任意選択で免疫原性担体に連結した表 3 A に提示したものに由来する配列を含むペプチドが、標準プロトコールを使用して免疫化に使用される。例示的实施形態では、任意選択で免疫原性担体に連結した A K P V K A S K P K K A K P V K^{m e 2} P K (配列番号 3) を含むペプチドが、標準プロトコールを使用して免疫化に使用される。生じた抗体の質および力価は、当業者に公知の技術を使用して評価されてよい。

40

【0155】

本明細書に記載されている本発明の組成物は、抗体をコードする核酸、抗体をコードする核酸のいずれかを含むベクター、およびいずれかのこのようなベクターを含む宿主細胞も含む。

【0156】

当業者が容易に認識するように、抗体は、いくつかの商用サービスのいずれかによって調製することもできる。

I I I . 診断

A. H 1.0 K 1 8 0 m e 2 の直接のおよび間接的検出

50

【0157】

本明細書において提供されるH1．0K180me2抗体、H1．0K180me2タンパク質、およびH1．0K180me2ペプチドは、種々の診断目的に有用である。

【0158】

H1．0K180me2の濃度の直接的および間接的検出および定量化の両方に対するアッセイが本明細書において提供される。このような定量化は、複製老化、DNA損傷、遺伝毒性ストレス、放射線曝露、アルツハイマー病、および生物学的老化を検出するのに有用である場合がある。定量化は、治療レジメン、薬物スクリーニング、ならびに細胞生存率を回復させ、DNA損傷を予防し、細胞代謝およびオートファジーを増加させ、細胞老化を阻害し、かつ細胞の細胞質における不溶性タンパク質老廃物の蓄積をブロックすることを目的とする薬物処置に対するレスポナーまたは非レスポナーとしての患者の階層化をモニタリングするのにも有用である場合がある。用途に応じて、H1．0K180me2は、*in vivo*、*in vitro*、*ex vivo*、*in situ*、または無細胞系で検出および定量化されてもよい。

10

【0159】

H1．0K180me2の直接的検出は、H1．0K180me2抗体を使用してH1．0K180me2を検出することを含む。

【0160】

H1．0K180me2の間接的検出は、H1．0K180me2抗原の存在にตอบสนองして生じる自己抗体に結合するH1．0K180me2タンパク質またはH1．0K180me2ペプチドを使用することを含む。この文脈では、H1．0K180me2タンパク質は、H1．0K180me2自己抗体結合タンパク質と称することができ、H1．0K180me2ペプチドはH1．0K180me2自己抗体結合ペプチドと称することができる。

20

【0161】

H1．0K180me2は、当業者に周知の任意の数の方法によって検出されてもよい。本明細書において提供されるH1．0K180me2抗体、H1．0K180me2タンパク質およびH1．0K180me2ペプチドは、様々なイムノアッセイにおいて容易に使用される。これらのイムノアッセイとして、これらに限定されないが、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ(RIA)、フローサイトメトリー、ラテラルフローイムノアッセイ、スロットブロット、磁気イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ、間接免疫蛍光測定法、直接免疫蛍光測定法、周囲光ファイバーイムノアッセイ(SOFA)、分光光度法、X線撮影法、電気泳動法、免疫電気泳動法、キャピラリー電気泳動法、高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、薄層クロマトグラフィー(TLC)、高拡散クロマトグラフィー、流体またはゲル沈降反応、免疫拡散、分光法、質量分析法、定量的質量分析法、あらゆるタイプの多重アッセイ、およびあらゆるタイプの微小流体アッセイが挙げられる。

30

【0162】

本明細書において提供されるH1．0K180me2抗体およびH1．0K180me2タンパク質またはペプチドは、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含んでもよい(例えば、標識にコンジュゲートされていてもよい)。

40

【0163】

本明細書において提供されるH1．0K180me2抗体ならびにH1．0K180me2タンパク質およびペプチドは、検出可能な標識を含んでもよい。検出可能な群は、検出可能な物理的または化学的特性を有する、例えば、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、蛍光的、電氣的、光学的または化学的方法によって検出可能な任意の材料であってもよい。本発明において有用な標識として、これらに限定されないが、磁気ビーズ(例えば、DYNABEADS(登録商標))、蛍光色素(例えば、フルオレセインイソチオシアネート、レッド、ローダミンなど)、放射標識(例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、

50

^{1 4} C、または^{3 2} P)、酵素(例えば、マーカー遺伝子産物としてまたはE L I S Aにおいてのいずれかで、通常検出可能な酵素として使用されるL a c Z、C A T、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど)、ビオチン、アビジン、またはストレプトアビジンおよびコロイダルゴールド着色ガラスまたはプラスチック(例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど)ビーズ、およびナノ粒子などの比色標識が挙げられる。例示的实施形態では、ビオチンは標識である。

【0164】

本明細書において提供される標識は、当技術分野で周知の方法に従うアッセイの所望の成分に直接的または間接的にカップリングしてもよい。上記で示したように、必要とされる感度、化合物のコンジュゲーションの容易性、安定性要件、利用可能な器具類、および使い捨て設備(d i s p o s a l p r o v i s i o n)に応じて標識を選択して、幅広い標識を使用してもよい。標識は、間接的な方法によって付着されることが多い。一般的に、リガンド分子(例えば、ビオチン)は、分子に共有結合される。次いで、リガンドは、本質的に検出可能であるかまたは検出可能な酵素、蛍光化合物、もしくは化学発光化合物などのシグナル系に共有結合されるかのいずれかである抗リガンド(例えば、ストレプトアビジン)分子に結合する。いくつかのリガンドおよび抗リガンドを使用してもよい。リガンドが、天然の抗リガンド、例えば、ビオチンを有する場合、リガンドは、標識された天然に存在する抗リガンドと併せて使用されてもよい。あるいは、任意のハプテンまたは抗原性化合物は、抗体と組み合わせて使用されてもよい。成分はまた、例えば、酵素またはフルオロフォアとのコンジュゲーションによって、シグナル生成化合物に直接コンジュゲートされうる。標識としての目的の酵素として、これらに限定されないが、加水分解酵素、ホスファターゼ、エステラーゼ、グリコシダーゼ、またはo x i t r a n s c r i p t i o n f a c t o r e d u c t a s e、およびペルオキシダーゼが挙げられる。蛍光化合物として、フルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロンなどが挙げられる。化学発光化合物として、ルシフェリン、および2,3-ジヒドロフトラジンジオン、例えば、ルミノールが挙げられる。

【0165】

標識を検出する方法は当業者に周知である。したがって、例えば、標識が放射性標識である場合、検出のための方法は、シンチレーションカウンターまたはオートラジオグラフィにおけるような写真フィルムを含む。標識が蛍光標識である場合、標識は、蛍光色素を適当な光の波長で励起させ、例えば、顕微鏡検査によって、目視検査によって、写真フィルムによって、電荷結合素子(C C D)または光電子増倍管などの電子検出器の使用によって、得られた蛍光を検出することによって検出されてもよい。同様に、酵素標識は、酵素に適当な基質を提供し、得られた反応生成物を検出することによって検出してもよい。最後に、簡単な比色標識は、標識に関連する色を単に観察することによって検出されてもよい。このように、種々のディップスティックアッセイでは、様々なコンジュゲートしたビーズはビーズの色に見えるが、コンジュゲートしたゴールドはピンクに見えることが多い。

【0166】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に特異的な自己抗体を検出するイムノアッセイでは、特異的な二次抗体を利用して、I g G、I g M、I g A、I g E、およびI g D自己抗体タイプ間を識別することができる。

【0167】

検出の際に、特定の画分におけるH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度が定量化されてもよく、例えば、細胞内画分における、可溶性かつクロマチン結合画分における、または細胞質画分におけるH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の定量化がある。例えば、細胞質画分におけるH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度の上昇は、細胞の老化状態を示す。一部の实施形態では、インタクト細胞、培養中の細胞、または切片培養における細胞を画像化して、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の局在を可視化する。例えば、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の核外での細胞内局在の増大は、老化状態を示す。一部の实施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の細胞質ゾルま

10

20

30

40

50

たは細胞外マトリックスへの放出は、老化状態を示す。

【0168】

検出は、任意の生体試料に関して行われてもよい。生体試料としては、これらに限定されないが、個体に由来する全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便、滑液、脳脊髄液、気管支洗浄液、腹水液、骨髄穿刺液、胸水、組織、細胞、生検材料、間質液、リンパ液、またはそれらの画分が挙げられる。一部の実施形態では、生体試料は細胞を含み、細胞は、培養中、懸濁液中、スライド上、インタクト組織中、またはFAC分析用に準備された調製物中にある。

【0169】

生体試料は、個体から得られる。本明細書で使用する場合、個体は、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園の動物、スポーツ用動物、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、アレチネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどを含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。個体は、雄であっても雌であってもよい。一実施形態では、個体は雌である。一実施形態では、個体は雄である。

10

【0170】

一部の実施形態では、個体は、50歳を超える。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は、50歳未満である。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は、少なくとも50歳であり、少なくとも55歳であり、少なくとも60歳であり、少なくとも65歳であり、少なくとも70歳であり、少なくとも75歳であり、または少なくとも80歳である。例示的实施形態では、個体は、少なくとも60歳である。

20

【0171】

生体試料は、当業者に周知の標準方法によって得られる。試料は、所望の場合、適当な緩衝溶液中での希釈または濃縮によって、必要な場合、任意選択で前処置される。生理学的pHで、リン酸塩、トリスなどの様々な緩衝液のうちの1つを用いるいくつかの標準緩衝水溶液のいずれかを使用してよい。

【0172】

本明細書に記載されている直接的検出方法を使用して、生体試料中のH1.0K180me2の濃度を定量化してもよい。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、例えば、陽性対照としてまたは競合イムノアッセイの競合者として、協力して使用してもよく、実行されるアッセイのフォーマットに応じて標識されてもされなくてもよい。

30

【0173】

本明細書に記載されている間接的検出方法を使用して、生体試料中のH1.0K180me2自己抗体の濃度を定量化してもよい。一部の実施形態では、H1.0K180me2抗体は、例えば、陽性対照としてまたは競合イムノアッセイの競合者として、協力して使用してよく、実行されるアッセイのフォーマットに応じて標識されてもされなくてもよい。

【0174】

当業者は、一部の実施形態では、H1.0K180me2抗原または自己抗体の決定された濃度を対照（すなわち、参照対照）と比較することが必要でありうることを認識する。相対比較により、例えば、個体が疾患（例えば、アルツハイマー病）を有するか、もしくは発症するリスクがあるかどうか、または個体が特定の処置（例えば、アルツハイマー病処置またはラパログによる処置）に応答性であるか、もしくは応答性である場合があるかどうかの決定が可能となる場合がある。対照は、年齢を一致させた対照、性別を一致させた対照、年齢および性別を一致させた対照、健康な対照、操作されていない対照、または諸参照標準を集めたものに相当する参照標準であってもよい。例えば、処置（例えば、アルツハイマー病処置またはラパログによる処置での）に先立って、または遺伝毒性物質、DNA損傷剤、もしくは放射線への曝露に先立って、同一個体由来の試料と比較することもできる。罹患していない領域、例えば、罹患していない組織に由来する同一個体由来

40

50

の試料と比較することもできる。

【0175】

当業者は、イムノアッセイにおいて、および分析物の検出の間に、非特異的結合を低減することが望ましいことが多いことを認識する。アッセイが、固体基質に固定されたH1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体またはH1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質およびペプチドに関する場合、基質への非特異的結合量を最小限にすることが望ましい場合がある。このような非特異的結合を低減する方法は、当業者に公知である。典型的には、これは、タンパク性組成物で基質をコーティングするステップを含む。一部の実施形態では、ウシ血清アルブミン(BSA)、脱脂粉乳、およびゼラチンなどのタンパク質組成物が利用されてもよい。

10

【0176】

感度、特異性、陽性および陰性適中率(PPVおよびNPV)ならびに陽性および陰性尤度比(PLRおよびNLR)を各診断試験設計について計算することができる。統計方法は、患者の疾患の有無を予測する助けとなる。

【0177】

感度は、一般的に、疾患が存在する場合に試験結果が陽性となる確率(有病正診率)である。

【0178】

特異性は、一般的に、疾患が存在しない場合に試験結果が陰性となる確率(無病正診率)である。

20

【0179】

陽性適中率(PPV)は、一般的に、試験が陽性である場合に疾患が存在する確率であり、疾患の試験前有病率を説明する(例えば、アルツハイマー病に対する試験前有病率は10%である)。

【0180】

陰性適中率(NPV)は、一般的に、試験が陰性である場合に疾患が存在しない確率であり、ADの試験前有病率が10%であることを説明する(Prince, M. J., Am J Epidemiol, 1996年)。

【0181】

陽性尤度比(LR+またはPLR)は、一般的に、疾患試験陽性を有さないヒトの確率で割った疾患試験陽性を有するヒトの確率である。陽性尤度比(PLR)は、一般的に、試験が陽性である場合、疾患の確率がどの程度増加するかを示す。PLRが1より大きいことは、標的障害が存在する確率の増加を示し、PLRが1より小さいことは、標的障害が存在する確率の低下を示し、PLRが1であることは、試験によって疾患の確率が変化しないことを意味する。

30

【0182】

陰性尤度比(LR-またはNLR)は、一般的に、疾患試験陰性を有さないヒトの確率で割った疾患試験陰性を有するヒトの確率である。陰性尤度比(NLR)は、一般的に、試験が陰性である場合、疾患の確率がどの程度低下するかを示す。

【0183】

一部の実施形態では、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値レベルに対する比較がなされる。ROC曲線、閾値および曲線下面積(AUC)は、本明細書において提供される試験設計のそれぞれに対して示される。

40

【0184】

一部の実施形態では、本明細書において提供される診断方法は、例えば、個体が疾患、例えば、アルツハイマー病を有することを最終的に確認するために、確認試験として使用されてもよい。

【0185】

他の実施形態では、本明細書において提供される診断方法は、例えば、個体が疾患、例えば、アルツハイマー病を発症する可能性を決定するために、その予測値として(試験、

50

スクリーニングのための)使用されてもよい。このような実施形態では、診断は尤度比の計算を含む場合がある。

【0186】

他の実施形態では、本明細書において提供される診断方法は、コンパニオン診断として使用されてもよい。このような実施形態では、診断は、陽性適中率 (P P V) および陰性適中率 (N P V) の計算を含む場合がある。

【0187】

一部の実施形態では、本明細書において提供される診断方法を使用して、診断オッズ比 (O R) を確立してもよい。このような実施形態では、診断は、感度および特異性の計算を含んでいてもよく、診断試験の有効性の尺度である。

B . 診断のための H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体 - H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の直接的検出および定量化

【0188】

診断に有用な、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原に特異的に結合する抗体が本明細書において提供される。本明細書において提供される H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、結合するために K 1 8 0 残基のジメチル化を必要とする。

【0189】

一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含む (例えば、標識にコンジュゲートされている) 。

【0190】

一部の実施形態では、抗体は、固体表面、例えば、ビーズ (例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ) 、カラム、樹脂またはマイクロプレートにコンジュゲートされているかまたは付着されている。一部の実施形態では、抗体は、マイクロプレート上にコーティングされている。

【0191】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体は、先行するセクション I I でより詳細に議論されている。

【0192】

直接的検出は、図 5 A に模式的に示されている。

C . 診断のための H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質およびペプチド - H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の間接的検出および定量化

【0193】

試料中の天然に存在する H 1 . 0 k 1 8 0 m e 2 自己抗体の検出のための H 1 . 0 k 1 8 0 m e 2 タンパク質および H 1 . 0 k 1 8 0 m e 2 ペプチドが本明細書において提供される。

【0194】

ある特定の刺激に応答する生物における H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の産生は、抗原に特異的な、天然に存在する自己抗体の生成を生じさせる場合があることが認識される。したがって、本発明の一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対するこれらの天然に存在する自己抗体についてのアッセイが望ましい場合がある。自己抗体の検出および測定によって、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の生成に対する代替測定が提案される。

【0195】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原に特異的な天然に存在する自己抗体の検出および測定のための方法および組成物が本明細書において提供される。本明細書で使用する場合、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはその断片に特異的な自己抗体は、互換的に、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体と称される場合がある。

【0196】

測定される自己抗体は、I g G、I g M、I g E、I g D、または I g A などの任意の免疫グロブリンタイプのものであってもよい。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m

10

20

30

40

50

e 2 に対する I g G 自己抗体が測定される。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g M 自己抗体が測定される。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する 1 種を超える自己抗体が測定され、例えば、一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G および I g M 自己抗体が測定される。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する 1 種を超える自己抗体が測定され、比が計算され、例えば、一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G および I g M 自己抗体が測定され、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G 自己抗体 : H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g M 自己抗体の比が計算される。他の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体 : 総 I g M (例えば、血清 I g M) の比が測定される。他の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体 : 総 I g M (例えば、血清 I g M) の比が測定され、関数として H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 自己抗体 : 総 I g G (例えば、血清 I g G) の比に関連付けられる。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する 1 種を超える自己抗体が測定され、トランスフェリン、フェリチンまたは血清アルブミン含量と比較される。他の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する 1 種を超える自己抗体が測定され、試料中のタンパク質の総量に対して正規化されるか、または試料の体積に対して正規化される。

10

【0197】

例示的实施形態では、アルツハイマー病に対するスクリーニング試験は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体 : 総 I g M の比を測定することを含む (図 17)。別の例示的实施形態では、アルツハイマー病に対するスクリーニング試験は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 自己抗体 : 総 I g G の比を測定することを含む (図 17)。一部の实施形態では、これらを互いに比較して、患者集団を階層化する。(図 17)。

20

【0198】

略図に目を向けると、図 4 および 14 C は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルを間接的に測定する方法を示す。図 4 および 14 C が例示するように、標識した H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドを試料と接触させ、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に応答して生じた試料中の自己抗体を標識したペプチドに結合させ、二次的に標識した抗体を添加して試料中の自己抗体に結合させ、続いて検出および定量化を行う。図 4 では、試料中の自己抗体は任意のタイプ (I g G、I g M、I g E、I g D、または I g A) のものでありうる。このアッセイでは、自己抗体に結合させるために使用した二次抗体は、I g G、I g M、I g E、I g D、および I g A 抗体の間で識別することができ、その結果、各タイプは、そのように望まれる場合、独立に定量化することができる。一部の实施形態では、二次抗体は抗 I g G 抗体であり、アッセイを使用して H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G 自己抗体を定量化する。一部の实施形態では、二次抗体は抗 I g M 抗体であり、アッセイを使用して H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g M 自己抗体を定量化する (図 14 C)。一部の实施形態では、2 種の二次抗体を利用して、1 種を超える自己抗体を定量化し、例えば、一部の实施形態では、抗 I g G および抗 I g M 二次抗体の両方を利用して、アッセイを使用して H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G および I g M 自己抗体を定量化する。

30

【0199】

一部の实施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質は、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。一部の实施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドは、表 3 A (配列番号 3 ~ 35) に提供されるものから選択されるアミノ酸配列を含む。一部の实施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドは、アミノ酸配列 A K P V K A S K P K K A K P V K (m e 2) P K (配列番号 3) を含む。一部の实施形態では、アミノ酸配列は、例えば、コンジュゲーションを目的として、追加の末端残基をさらに含む。一部の实施形態では、アミノ酸配列は、C 末端残基をさらに含む。このような实施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドは、アミノ酸配列 C A K P V K A S K P K K A K P V K P K (配列番号 36)、C A K P V K A S K P K K A K P V K P K C (配列番号 37)、A K P V K A S K P K K A K P V K P K C (配列番号 38)、C A K P V K A S K P K K A K P V K (m e 2) P K (配列番号 39)、C A K P V K A S K P K K A K P V K (m e 2) P K (配列番号 40) を含む。

40

50

²) PKC (配列番号40)、またはAKPVKASKPKKAKPVK (me²) PKC (配列番号41)を含んでもよい。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、本明細書において提供されるH1.0K180me2ペプチドのうちのいずれか1つの断片を含む。一部の実施形態では、H1.0K180me2ペプチドは、KLH (キーホールリンペットヘモシアニン)、OVA (卵白アルブミン)、BC (バクテリアセルロース)またはBSA (ウシ血清アルブミン)にコンジュゲートされている。

【0200】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、合成であり、例えば、K180残基の特異的ジメチル化(本明細書に記載されている)を可能にする条件下で、G9Aメチルトランスフェラーゼ酵素またはG9A様タンパク質(GLP)メチルトランスフェラーゼ酵素を使用する、例えば、*in vitro*メチル化の産物である。

10

【0201】

本明細書において提供されるH1.0K180me2タンパク質およびペプチドは、様々な目的、例えば、これらに限定されないが、検出、診断、可視化、定量化、選別、治療、および生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含む(例えば、標識にコンジュゲートされている)。例示的实施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、固体表面、例えば、ビーズ(例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ)、カラム、またはマイクロプレートにコンジュゲートされているかまたは付着される。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、マイクロプレートにコーティングされている。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、これらに限定されないが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、siRNA、および二次抗体を含むエフェクター分子にコンジュゲートされているか、またはこれを含む。

20

【0202】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、H1.0K180me2に対して特異的である自己抗体に対して選択的である。一部の実施形態では、タンパク質またはペプチドは、H1.0K180me2に対して非特異的である自己抗体に結合する。

30

【0203】

ある特定の实施形態では、本明細書において提供されるH1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、標的自己抗体に結合し、0.0001nM~1μMの範囲の解離定数(K_d)を有する。例えば、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドのK_dは、約1μM、約100nM、約50nM、約10nM、約5nM、約1nM、約0.5nM、約0.1nM、約0.05nM、約0.01nM、約0.005nM、約0.001nM、約0.0005nM、またはさらに約0.0001nMであってもよい。

40

【0204】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、ヒトH1.0K180me2自己抗体に特異的である。一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、他の種由来のH1.0K180me2自己抗体と交差反応性である。

【0205】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、H1.0K180me2自己抗体に対して選択的であり、H1.0K180me1またはH1.0K180me3自己抗体に対してほとんどまたは全く結合性を示さない。一部の実施形態

50

では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、H1.0K180me2自己抗体に結合するが、H1.0K180me1および/または抗H1.0K180me3自己抗体に対しても結合性を示す。

【0206】

一部の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドのH1.0K180me2自己抗体に対する結合優先性（例えば、親和性）は、一般的に、非特異的自己抗体（例えば、別の標的を対象とする自己抗体）に対して、少なくとも約2倍、約5倍、または少なくとも約10、20、50、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、もしくは 10^6 倍である。

【0207】

当業者が精通する方法を使用して、H1.0K180me2自己抗体タンパク質またはペプチドがH1.0K180me2抗体に対して特異性および/または選択性を有するかどうかを決定するために、H1.0K180me2自己抗体タンパク質またはペプチドを評価することも可能である。

【0208】

本明細書に記載されているH1.0K180me2タンパク質およびペプチドをコードする核酸が本明細書において提供される。本明細書に記載されているH1.0K180me2タンパク質およびペプチドをコードする核酸のいずれかを含むベクターも本明細書において提供される。

D. アルツハイマー病の検出

【0209】

アルツハイマー病に対する個体のスクリーニングにおいて使用するため、個体がアルツハイマー病を発症するリスクがあるかどうかを特定するのに使用するため、個体がアルツハイマー病を発症するかどうかの可能性を推定するのに使用するため、アルツハイマー病の診断に使用するため、アルツハイマー病の早期検出において使用するため、アルツハイマー病の予後において使用するため、アルツハイマー病薬もしくはレジメンによるアルツハイマー病処置に応答する可能性がある個体を選択するため、アルツハイマー病と診断されたものに対する処置選択/処置選択肢の決定において使用するため、アルツハイマー病と診断され、アルツハイマー病薬もしくはレジメンによる進行中の処置を受けているものの処置をモニタリングするのに使用するため、またはアルツハイマー病薬およびレジメンに対するスクリーニングに使用するためのH1.0K180me2抗体（H1.0K180me2レベルを決定するため）ならびにH1.0K180me2タンパク質およびペプチド（H1.0K180me2自己抗体レベルを決定するため）が本明細書において提供される。

【0210】

患者を別個の集団へと階層化するのに使用するためのH1.0K180me2タンパク質およびペプチドも本明細書において提供される（抗または自己抗H1.0K180me2 IgGおよび抗自己抗H1.0K180me2 IgMとも称されるH1.0K180me2 IgGおよびH1.0K180me2 IgM自己抗体レベルを決定するため）。一実施形態では、これらの別個の集団は、アルツハイマー病の免疫療法に基づく処置に応答する可能性が低いかまたは全く有さないものに対して、アルツハイマー病の免疫療法に基づく処置に応答する可能性が高いものであってもよい。

【0211】

図17は、抗H1.0K180me2 IgGおよび抗H1.0K180me2 IgM自己抗体レベルを同時に測定することにより、患者血清中の総IgMによって正規化した抗H1.0K180me2 IgMと総IgGによって正規化した抗H1.0K180me2 IgGとの間の相関に基づく、アルツハイマー病を有するものの別個の亜集団への階層化が可能となることを実証する。

【0212】

これらの使用は、H1.0K180me2に対するH1.0K180me2 IgG自

10

20

30

40

50

己抗体および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体のレベルが、アルツハイマー病を有する患者において変化するという観察に基づいて提供される (図 1 2 A ~ 1 2 C 、 図 1 3 B 、 図 1 4 A ~ 1 4 E 、 および 図 1 5 A ~ 1 5 B) 。

【 0 2 1 3 】

アルツハイマー病患者は、健康な、年齢を一致させた健康な対照よりも低い H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度を示し、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度によって、アルツハイマー病を有する患者を健康な個体から有効に分離できることを示す (図 1 2 A) 。 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の血清濃度は、アルツハイマー病患者の特定に十分であったが、総 I g G (図 1 2 B) または総タンパク質 (図 1 2 C) による血清試料の正規化を使用することによって、血清を得るために使用されるプロトコール、操作者の変化、患者の水分補給状態および患者の活動状態などの、全体の血清濃度を変える可能性がある変数にかかわらず、個体間の直接的な比較を可能とした。例えば、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 血清レベルは、健康な若齢個体に対して健康な老齢個体において上昇し、一方、アルツハイマー病を有する患者は、健康な老齢個体 (6 0 歳を超える) に対して有意により低い、正規化した H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の血清レベルを示したことが観察された (図 1 2 B 、 1 2 C) 。

10

【 0 2 1 4 】

アルツハイマー病患者は、年齢を一致させた健康な対照と比較して、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体のレベルの変化も示し、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G および / または I g M 血清濃度 (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G および / または I g M 自己抗体の濃度) によって、アルツハイマー病を有する患者を健康な個体から有効に分離できることを示す。アルツハイマー病患者は、健康な、年齢を一致させた対照よりも高濃度の血清抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G を示した (図 1 3 、 1 4 A ~ E 、 1 5 A 、 1 5 B) 。 ヒト血清中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G および I g M レベルは、ビオチン化 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 捕捉ペプチド (H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチド) 、 それに続く適当な二次抗体 (I g G または I g M 抗体のいずれかを対象とする) を使用する間接的 E L I S A 分析によって定量化した。30 ~ 40 歳 (n = 7) のまたは 60 歳を超える (n = 9) 健康な個体、および 60 歳を超える臨床的に診断されたアルツハイマー病を有する個体 (n = 10) に由来する等しい体積の血清を分析した。

20

【 0 2 1 5 】

図 1 3 B は、アルツハイマー病患者および年齢を一致させた対照における間接的 E L I S A によって決定した抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G レベルの定量化を示す。各血清試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G の濃度は、E L I S A 実験に含まれる H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 特異的抗体の連続希釈で作成した標準曲線を使用して計算した。

30

【 0 2 1 6 】

図 1 4 E は、アルツハイマー病 (A D の存在) 患者および年齢を一致させた対照 (A D の非存在、神経学的対照) における間接的 E L I S A によって決定した、生の正規化していない抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M レベルの定量化を示す。

【 0 2 1 7 】

図 1 5 A および B は、アルツハイマー病患者 (A D の存在) および年齢を一致させた対照 (A D の非存在、神経学的対照) における間接的な血清学的 E L I S A によって決定した、正規化した抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M レベルの定量化を示す。図 1 5 B は、診断特性が、異なる操作者および実験室設定にかかわらず変化しないことを実証した。

40

【 0 2 1 8 】

例示的方法、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベル：より具体的には、一実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体を使用して、アルツハイマー病に対して個体をスクリーニングするため、個体がアルツハイマー病を発症するリスクがあることを特定するため、個体がアルツハイマー病を発症するかどうかの可能性を推定するため、個体がアルツハイマー病を有するかどうかを決定するため、個体におけるアルツハイマー病の早期徴候を検出するため、および個体におけるアルツハイマー病の予後に使用するための、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルを決定する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e

50

2抗体と接触させるステップと、(b)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の低下が、個体がアルツハイマー病を有するか、アルツハイマー病を発症するリスクがあるか、またはアルツハイマー病を発症するより大きな可能性を有することを示し、対照に対する濃度の上昇または濃度の変化がないことが、個体がアルツハイマー病を有さないか、アルツハイマー病を発症するリスクがないか、またはアルツハイマー病を発症するより大きな可能性を有さないことを示す場合がある方法が本明細書において提供される。対照として、これらに限定されないが、健康な対照(例えば、年齢を一致させた、性別を一致させた)、健康な対照を集めたものに相当する参照標準、または早期に単離された同一個体由来の対照試料が挙げられる。一部の実施形態では、循環H1.0K180me2の濃度が決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、方法は、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合、個体をアルツハイマー病薬またはレジメンで処置するステップをさらに含む。

10

【0219】

方法を実践する一実施形態では、血清中のH1.0K180me2の5.61nmol/ml未満またはこれに等しい濃度は、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症する可能性があることを示す。一実施形態では、血清中のH1.0K180me2の5.61nmol/ml未満またはこれに等しい濃度は、個体がアルツハイマー病を有するか、または78%の特異性、80%の感度および3.6の陽性尤度比でアルツハイマー病を発症する可能性があることを示す。一実施形態では、これは、試験前の確率と比較して、アルツハイマー病の確率(試験後の確率)の24%の増加を表す。試験後の確率は、以下の式: $\text{試験前オッズ} \times \text{LR} / (1 + \text{試験前オッズ} \times \text{LR})$ (式中、試験前オッズは、試験前の疾患の存在の臨床上的疑いである)に基づいて計算される。試験後の確率は、通常、Likelihood Ratio NomogramまたはFagan Nomogram(NEJM 1975年; 293巻: 257頁)から計算される。

20

【0220】

方法を実践する別の実施形態では、血清中の総タンパク質に対するH1.0K180me2の 4.76×10^{-4} 未満またはこれに等しい比は、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症する可能性があることを示す。一実施形態では、血清中の総タンパク質に対するH1.0K180me2の 4.76×10^{-4} 未満またはこれに等しい濃度は、個体がアルツハイマー病を有するか、または70%の特異性、90%の感度および3.0の陽性尤度比でアルツハイマー病を発症する可能性があることを示す。一実施形態では、これは、試験前の確率と比較して、アルツハイマー病の確率の14.8%の増加を表す。

30

【0221】

例示的方法、H1.0K180me2自己抗体レベル:別の実施形態では、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドを使用して、アルツハイマー病に対して個体をスクリーニングするため、個体がアルツハイマー病を発症するリスクがあることを特定するため、個体がアルツハイマー病を発症するかどうかの可能性を推定するため、個体がアルツハイマー病を有するかどうかを決定するため、個体におけるアルツハイマー病の早期徴候を検出するため、および個体におけるアルツハイマー病の予後に使用するための(H1.0K180me2自己抗体レベル、例えば、IgG自己抗体レベルまたはIgM自己抗体レベルを決定する)方法であって、(a)個体由来の生体試料をH1.0K180me2タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b)ペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇が、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあることを示し、対照に対する濃度の低下または濃度の変化がないことが、個体がアルツハイマー病を有さないか、または発症するリスクがないことを示す場合がある方法が本明細書において提供される。対照として、これらに限定されないが、健康な対照(例えば、年齢を一致させた、性別を一致させた

40

50

)、健康な対照を集めたものに相当する参照標準、または早期に単離された同一個体由来の対照試料を挙げることができる。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、方法は、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがあると決定された場合、個体をアルツハイマー病薬またはレジメンで処置するステップをさらに含む。

【0222】

一実施形態では、血清中の $H1.0K180me2$ に対する IgG 自己抗体の $9.69 \mu g/ml$ (総 IgG レベルに対して正規化した) より高いまたはこれに等しい濃度は、個体がアルツハイマー病を有するか、または発症する可能性があることを示す。一実施形態では、血清中の $H1.0K180me2$ IgG 自己抗体の $9.69 \mu g/ml$ より高いまたはこれに等しい濃度は、個体がアルツハイマー病を有するか、または 89% の特異性、 60% の感度および 5.4 の陽性尤度比でアルツハイマー病を発症する可能性があることを示す。一実施形態では、これは、試験前の確率と比較して、アルツハイマー病の確率の 30% の増加を表す。

10

【0223】

一部の実施形態では、 IgG 自己抗体の血清濃度が、血清体積に対して正規化して $8.23 \mu g/ml$ より高いかまたはこれに等しい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、 IgM 自己抗体の血清濃度が、血清体積に対して正規化して、 $409 fMol/ml$ より高いかまたはこれに等しい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一部の実施形態では、総 IgM 濃度に対する IgM 自己抗体の濃度の比が、 26.6×10^{-6} より大きい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。一実施形態では、 $PLR(LR+)$ が IgG 自己抗体に対して 2.4 もしくはこれより大きいか、または $PLR(LR+)$ が IgM 自己抗体に対して 3.5 もしくはこれより大きい場合、個体はアルツハイマー病を有するか、または発症するリスクがある。

20

【0224】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、観察研究において使用される。観察研究の例として、これらに限定されないが、(a) 横断的研究 (単一時点研究 (single time-point design) または遅延断面 (delayed cross-sectional)) - 単一時点で採取した患者当たり 1 または数種の検体 / 試料についての試験、(b) 縦断的研究 - 長期間 (例えば、数週間、数カ月、数年) にわたって採取した患者当たりの複数の検体 / 試料についての試験、(c) 遡及的研究 - 研究の開始に先立って、分析物のステータスおよび患者の臨床ステータスが知られている、以前に採取した検体 (特徴付けられた検体) についての試験、(d) 前向き研究 - 分析物のステータスおよび患者の臨床ステータスの両方が研究中に確立されることを除き、研究前または研究中に採取した検体についての試験、ならびに (e) 前向き - 遡及的研究 - 臨床ステータスが知られているが、分析物のステータスが知られておらず研究中に確立されることになる、以前に採取した検体についての試験が挙げられる。

30

【0225】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病の診断を意図するものであり、唯一の決定要因として、患者の臨床状態を決定し、検証し、または確認するために使用されてもよい。これらの実施形態では、この種の試験はまた、唯一の確認アッセイ (以前の試験結果を検証するため) および唯一の排除アッセイ (特定の条件を除外するため) を含む。

40

【0226】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病の「診断への助け (aid-to-diagnostic)」を提供することを意図し、患者の臨床ステータスの決定または検証を援助する追加情報を提供するために使用されてもよい。この試験は、必ずしも唯一の決定要因ではないが、患者の現在の状態を評価するために使用されてもよい

50

。

【0227】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病のスクリーニングを意図するものであり、無症状の個体の疾患、障害、または他の生理学的状態のステータスを決定するために使用されてもよい。状態および標的患者集団の性質に応じて、スクリーニング方法は、日常的に使用されてもよく、または「リスクがある」患者に制限されてもよい。この文脈では、本明細書に記載されている方法は、患者の現在の状態を評価するために使用される。

【0228】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病の素質を決定することを意図し、本明細書に記載されている方法を使用して、症状が出る前の患者の疾患発生の可能性を決定してもよく（例えば、将来、疾患を発症するリスクを評価すること）、十分なリスクがある患者（試験結果によって決定される）に対しては、予防的介入がとられてもよい。

10

【0229】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病の予後を意図し、本明細書に記載されている方法を使用して、処置と無関係に、臨床帰結に関連する因子を測定してもよい。本明細書に記載されている方法を使用して、疾患の自然進行（例えば、処置がない場合の帰結）を推定してもよく、または本明細書に記載されている方法は、患者の将来の状態を評価するために設計される。

20

【0230】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、老齢集団の生理学的ステータス（「老化時計」）の決定を意図するものであり、本明細書に記載されている方法を使用して、老化についてのヒトの状態もしくは特徴、または老化に伴うアルツハイマー病のリスクを特定することを目的として、個体の生理学的状態を評価してもよい。

【0231】

関連する実施形態では、H1.0K180me2抗原の定量化および/またはH1.0K180me2自己抗体の定量化を使用して、アルツハイマー病のスクリーニング、診断、または検出の信頼度を増加させてもよい。

【0232】

関連する実施形態では、H1.0K180me2抗原の定量化および/またはH1.0K180me2自己抗体の定量化を、これらに限定されないが、A₄₂、T-tau、p-tau、A₄₂/T-tau比、およびA₄₂/p-tauの測定を含む他の脳脊髄液（CSF）試験と併せて使用してもよい。

30

【0233】

関連する実施形態では、H1.0K180me2抗原の定量化および/またはH1.0K180me2自己抗体の定量化を、認知ステータス試験、例えば、MMSE（ミニメンタルステート検査）、GDS（グローバル劣化率（global deterioration rate））、およびCDR（臨床的認知症尺度）試験の評価と併せて使用してもよい。

40

【0234】

関連する実施形態では、H1.0K180me2抗原の定量化および/またはH1.0K180me2自己抗体の定量化を、神経画像処理と併せて使用してもよい。

【0235】

本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、H1.0K180me2のレベルは、生体試料中の総IgGに対して正規化されるか、または生体試料中の総タンパク質に対して正規化されてもよい。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、H1.0K180me2の濃度は、メチル化されていない、標識された、合成H1.0ペプチドに対する相対比として決定されてもよい。

【0236】

50

本明細書に記載されている方法の実施形態では、個体は50歳を超えている。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は50歳未満である。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は少なくとも50歳であるか、少なくとも55歳であるか、少なくとも60歳であるか、少なくとも65歳であるか、少なくとも70歳であるか、少なくとも75歳であるか、または少なくとも80歳である。例示的実施形態では、個体は少なくとも60歳である。

E. アルツハイマー病のコンパニオン診断

【0237】

アルツハイマー病薬もしくはレジメンによるアルツハイマー病処置に応答する可能性がある個体を選択するための方法において使用するため、アルツハイマー病と診断されたものに対する処置選択/処置選択肢の決定において使用するため、アルツハイマー病と診断され、アルツハイマー病薬もしくはレジメンによる進行中の処置を受けているものの処置のモニタリングにおいて使用するため、またはアルツハイマー病薬およびレジメンに対するスクリーニングにおいて使用するためのH1.0K180me2抗体(H1.0K180me2レベルを決定するため)ならびにH1.0K180me2タンパク質およびペプチド(H1.0K180me2自己抗体のレベル、例えば、IgG自己抗体のレベルまたはIgM自己抗体のレベルを決定するため)も本明細書において提供される。

【0238】

これらの実施形態では、これらのアルツハイマー病薬およびレジメン/処置として、これらに限定されないが、APP合成阻害剤、ベータ-セクレターゼ阻害剤、ガンマ-セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、A凝集阻害剤、A免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質のS-ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド1受容体アゴニスト、ラパマイシン、ラパログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小RNA分子、ペプチド、または超音波療法による処置が挙げられる。より具体的には、APP合成阻害剤(+フェンセリン)、ベータ-セクレターゼ阻害剤(MK-8931、E2609、LY2811376、LY2886721、PF-05297909)、ガンマ-セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター(セマガセスタットLY450139、アバガセスタットBMS-708163、PF-3084014、ELND006、タレンフルビル、CHF5074)、A凝集阻害剤(トラミプロセート(3APS)、クリオキノール(PBT1)、PBT2、ELND005(scyllio-イノシトール)、PQ912)、A免疫療法(GSK933776、AN1802+QS21、ACC-001、アルツハイマー病-106、バビネオズマブ、ソラネズマブ、ガンテネルマブ(RO4909832)、ポネズマブ(PF-04360365)、MABT5102A(クレネズマブ)、BAN2401、静注用免疫グロブリン、ガンテネルマブ(R1450またはRO4909832))、抗タウ薬(リチウム、タイドグルーシブ(NP031112)、LMTX(メチレンブルー))、コリンエステラーゼ阻害剤(Razadyne(登録商標)(ガランタミン)、Exelon(登録商標)(リバステグミン)、およびAricept(登録商標)(ドネペジル))、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)アンタゴニスト(Aricept(登録商標)およびNamzari(登録商標)、Namenda(登録商標)とドネペジルの組合せ)、非定型抗精神病薬(オランザピン、クエチアピン、リスペリドン)、タンパク質のS-ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド1受容体のアゴニスト、ラパマイシンおよびラパログ、内在性カンナビノイドおよびカンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤(ビタミンE、ビタミンC、-リポ酸、コエンザイムQ)、抗炎症分子および薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモンおよびホルモン調節剤、スタチン、インスリンおよび鼻腔内イン

10

20

30

40

50

スリン、長時間作用型インスリンおよびサリドマイドを含むインスリン担体、ラミプリル、レスベラトロール、多機能ナノキャリア、ビタミンおよび栄養補助剤、小RNA分子、ペプチド、ならびに超音波療法。一部の実施形態では、アルツハイマー病薬およびレジメンは、FDA承認が未決定であり、米国食品医薬品局のワールドワイドウェブアドレスで入手できる薬物承認のためのFDA登録臨床試験のリストから選択される。

【0239】

例示的方法、H1.0K180me2レベル：一実施形態では、アルツハイマー病と診断され、進行中の処置を受けている個体が、進行中の処置から利益を得るかまたは利益を得続けるかどうかを決定するためのH1.0K180me2抗体を使用する方法であって、(a)進行中の処置を受けている個体由来の生体試料を準備するステップと、(b)生体試料をH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(c)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2の濃度を決定するステップと、(d)処置から利益を得るかまたは利益を得続ける個体を選択するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇が、個体が処置から利益を得るかまたは利益を得続けることを示し、対照に対する濃度の低下または濃度の変化がないことが、個体が処置から利益を得る傾向にないかもしくは利益を受け続けないか、または処置に応答性でないことを示す場合がある方法が本明細書において提供される。対照として、これらに限定されないが、アルツハイマー病を有し処置を受けていない個体由来の試料、または処置開始に先立って早期に単離された同一個体由来の対照試料が挙げられる。一部の実施形態では、循環H1.0K180me2の濃度が決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

10

20

【0240】

アルツハイマー病と診断された個体に対する処置選択において使用するため、アルツハイマー病と診断された個体に対する処置選択肢を決定するため、およびどの個体が特定の処置から利益を得る可能性があるのかを決定するための、H1.0K180me2抗体を使用する方法も本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、(a)個体がアルツハイマー病に対して処置される前に、個体由来の生体試料を準備するステップと、(b)生体試料を候補処置と接触させるステップと、(c)生体試料をH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(d)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2の濃度および/または細胞内局在を決定するステップと、(e)処置から利益を得る可能性がある個体を選択するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇、または細胞質への細胞内局在の低下は、個体が処置から利益を得る可能性があることを示し、対照に対する濃度の低下もしくは濃度の変化がないこと、または細胞質への細胞内局在の増加もしくは細胞内局在の変化がないことは、個体が処置から利益を得ないことを示す場合がある。別の実施形態では、方法は、(a)個体に候補処置を投与するステップと、(b)処置の投与後に、個体由来の生体試料を準備するステップと、(c)生体試料をH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(d)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2の濃度および/または細胞内局在を決定するステップと、(e)処置から利益を得る可能性がある個体を選択するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇、または細胞質への細胞内局在の低下は、個体が処置から利益を得る可能性があることを示し、対照に対する濃度の低下もしくは濃度の変化がないこと、または細胞質への細胞内局在の増加もしくは細胞内局在の変化がないことは、個体が処置から利益を得ないことを示す場合がある。対照として、これらに限定されないが、健康な個体由来の試料、または生体試料をプラセボ処置と接触させることを含むことができる。一部の実施形態では、循環H1.0K180me2の濃度が決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

30

40

【0241】

例示的方法、H1.0K180me2自己抗体レベル：別の実施形態では、アルツハイマー病と診断され、進行中の処置を受けている個体が、進行中の処置から利益を得るかまたは利益を得続けるかどうかを決定するためのH1.0K180me2タンパク質または

50

ペプチドを使用する方法であって、(a) 個体由来の生体試料を準備するステップと、(b) 生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(c) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、(d) 処置から利益を得るかまたは利益を得続ける個体を選択するステップとを含み、対照に対する自己抗体の濃度の低下が、個体が処置から利益を得るかまたは利益を得続けることを示し、対照に対する自己抗体の濃度の変化がないことまたは濃度の上昇が、個体が処置から利益を得ないかまたは利益をもはや得続けないことを示す可能性がある方法が本明細書において提供される。対照として、これらに限定されないが、アルツハイマー病を有し処置を受けていない個体由来の試料、または処置開始に先立って早期に単離された同一個体由来の対照試料が挙げられる。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G および I g M 自己抗体の濃度が決定される。

10

【 0 2 4 2 】

アルツハイマー病と診断された個体に対する処置選択において使用するため、アルツハイマー病と診断された個体に対する処置選択肢を決定するため、および個体が特定の処置から利益を得る可能性があるかどうかを決定するための、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドを使用する方法も本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、(a) 個体に候補処置を投与するステップと、(b) 投与後に、個体由来の生体試料を準備するステップと、(c) 試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(d) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の自己抗体の濃度を決定するステップと、(e) 処置から利益を得る可能性がある個体を選択するステップとを含んでもよく、対照に対する自己抗体の濃度の低下は、個体が特定の処置から利益を得ることを示し、対照に対する自己抗体の濃度の変化がないことまたは濃度の上昇は、個体が特定の処置から利益を得ないことを示す可能性がある。参照対照として、これらに限定されないが、健康な個体由来の試料、または生体試料をプラセボ処置と接触させることを挙げることができる。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体の濃度が決定される。一部の実施形態では、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G および I g M 自己抗体の濃度が決定される。

20

30

【 0 2 4 3 】

アルツハイマー病患者を別個の群：任意のタイプのアルツハイマー病処置に応答する傾向にある1つの群と任意のタイプのアルツハイマー病処置に応答しない傾向にある1つの群（おそらく、より限定的である）へと階層化するのに使用するための、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドを使用する方法も本明細書において提供される。一実施形態では、任意のタイプのアルツハイマー病処置に応答する傾向にある群は、アルツハイマー病に対する免疫療法および非免疫療法に基づく処置の両方に応答する場合がある。一実施形態では、任意のタイプのただのアルツハイマー病処置に応答する傾向にない群は、アルツハイマー病に対する非免疫療法に基づく処置にのみ応答する場合がある。一部の実施形態では、本明細書において提供される場合、このような階層化は、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 抗体の濃度と抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 抗体の濃度の比を計算するおよび/またはこれらを相互に関連付けて、統計モデルにフィットさせることによって行ってもよい。このような方法は、アルツハイマー病と診断された個体に対し、および個体が特定の処置から利益を得る可能性があるかどうかを決定するために、実行可能な処置の選択肢を提供することができる。一実施形態では、方法は、(a) 個体由来の生体試料を準備するステップと、(b) 試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプ

40

50

チドと接触させるステップと、(c) タンパク質またはペプチドに結合する試料中の I g G および I g M 自己抗体の濃度を決定するステップと、(d) アルツハイマー病に対する免疫療法に基づく処置から利益を得る可能性がある個体を選択するステップとを含んでもよい。

【0244】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体レベルが、生理学的レベル内または確立された治療薬の範囲内にあることを保証するのに有用である。

【0245】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病のモニタリングに有用であり、記載されている方法を使用して、必要に応じて処置/介入を調整することを目的として、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体レベルを測定してもよい。関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、このような処置を受けている個体における、アルツハイマー病薬もしくは栄養レジメンの効果または生活様式の調整をモニタリングするのに有用である。

10

【0246】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病に対する任意の観察または介入臨床研究における臨床成績をモニタリングするのに有用であり、(a) 観察研究は、研究中に得られた試験結果が患者の管理に使用されず、処置の決定に影響を与えない研究であり、(b) 介入研究は、研究中に得られた試験結果が患者の管理の決定に影響を及ぼしてもよく、処置を導くのに使用されてもよい研究である。

20

【0247】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、一連の測定に有用であり、それによって、多数の決定が経時的に得られる。これらのタイプのモニタリング方法を、疾患進行/退行の検出/評価、疾患の再発、最小残存疾患、処置への応答/抵抗性、および/または処置による有害作用に対して使用してもよい。これらのタイプのモニタリング方法は、個体の状態の変化を評価するために設計してもよい。

【0248】

関連する実施形態では、本明細書において提供される方法は、アルツハイマー病処置への応答または反応の予測に有用であり、本明細書に記載されている方法を使用して、特定の療法に対する患者の応答または有害反応の可能性を決定する因子を測定してもよい。特にコンパニオン診断として使用するために設計された予測方法が本明細書に記載されている。

30

【0249】

本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 のレベルは、生体試料における総 I g G に対して正規化してもよく、または生体試料における総タンパク質に対して正規化してもよい。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度は、メチル化されていない、標識された、合成 H 1 . 0 ペプチドに対する相対比として決定されてもよい。

【0250】

本明細書に記載されている方法の実施形態では、個体は50歳を超えている。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は50歳未満である。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は少なくとも50歳であるか、少なくとも55歳であるか、少なくとも60歳であるか、少なくとも65歳であるか、少なくとも70歳であるか、少なくとも75歳であるか、または少なくとも80歳である。例示的实施形態では、個体は少なくとも60歳である。

40

【0251】

関連する実施形態では、方法は、新たなアルツハイマー病薬およびレジメンに対するスクリーニングに使用されてもよい。

F . 老化の検出

50

【0252】

老化を検出するのに使用するための、H1．0K180me2抗体およびH1．0K180me2タンパク質およびペプチドが本明細書において提供される。本明細書において提供される場合、老化は、複製老化（REP-SEN）、遺伝毒性ストレスに誘導される老化および放射線に誘導される老化に関連する。

【0253】

一般的に、老化の検出のための方法は、H1．0K180me2の直接的検出またはH1．0K180me2の間接的検出を含む。H1．0K180me2の直接的検出として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料をH1．0K180me2抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中のH1．0K180me2抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が老化細胞を含むことを示す。H1．0K180me2の間接的検出として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料をH1．0K180me2タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b) ペプチドに結合する試料中のH1．0K180me2抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が老化細胞を含むことを示す。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

10

【0254】

一部の実施形態では、方法は、遺伝毒性物質によって誘導される老化を経験した個体を特定するために使用されてもよい。一部の実施形態では、遺伝毒性ストレスに誘導される老化は、個体のDNA損傷剤、薬物または毒素、例えば、放射線、UV光、ブレオマイシンおよび、これらに限定されないが、トラゾドン、Etotifen、セファレキシン、ニソルジピン（Nisoldipine）、CGS 15943、クロトリマゾール、5-ノニルトリプタミン、ドキシピン、ペルゴリド、パロキセチン、レスベラトロール、ケルセチン、ホノキオール、7-ニトロインダゾール、メゲストロール、フルボキサミン、エトポシド、ベリパリブ、ルカパリブ、オラパリブ、カンプトテシン、またはテルビナフィンを含む任意の他の遺伝毒性薬および一般的な化学療法薬への曝露の結果である。

20

【0255】

一部の実施形態では、方法は、化学療法が有効であることを保証するために、化学療法処置を受けている個体における老化を特定するのに有用である。これらの実施形態における化学療法剤は、アレムツズマブ（Campath）、アリトレチノイン（Panretin）、アロプリノール（Zyloprim）、アルトレタミン、（Hexalen）、アミホスチン（Ethyol）、アナストロゾール（Arimidex）、亜ヒ酸（Trisenox）、アスパラギナーゼ（Elspar）、BCG Live（TICE BCG）、ベキサロテン（Targretin）、ブレオマイシン（Blenoxane）、静脈内ブスルファン（Busulfex）、経口ブスルファン（Myleran）、カルステロン（Methosarb）、カペシタピン（Xeloda）、ストレプトゾシン（Zanosar）、テール（Sclerosol）、タモキシフェン（Nolvadex）、テモゾロミド（Temodar）、テニポシド、VM-26（Vumon）、テストラクトン（Teslac）、チオグアニン、6-TG（Thioguanine）、チオテパ（Thioplex）、およびトポテカン（Hycamtin）からなる群から選択されてもよい。

30

40

G．DNA損傷の検出

【0256】

DNA損傷、例えば、急性DNA損傷を検出するのに使用するための、H1．0K180me2抗体ならびにH1．0K180me2タンパク質およびペプチドが本明細書において提供される。

【0257】

一般的に、DNA損傷の検出のための方法は、H1．0K180me2の直接的検出またはH1．0K180me2の間接的検出を含む。H1．0K180me2の直接的検出

50

として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が DNA 損傷を受けたことを示す。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の間接的検出として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b) ペプチドに結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が DNA 損傷を受けたことを示す。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

【0258】

一部の実施形態では、DNA 損傷は、細胞または個体の DNA 損傷剤、薬物または毒素、例えば、放射線、ブレオマイシンまたは他の DNA 損傷剤（例えば、上記された化学療法薬）への曝露の結果である。

【0259】

一部の実施形態では、方法は、遺伝毒性物質または DNA 損傷剤へのこのような曝露から 5 分、10 分、15 分、20 分、25 分、30 分、45 分、60 分、75 分、90 分、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、24 時間、48 時間、3 日、4 日、または最長 5 日以内に DNA 損傷を決定するのに有用である。

【0260】

一部の実施形態では、DNA 損傷の検出のためのポータブルな装置が本明細書において提供される。装置は、試料採取装置、読み取り機、および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体を含むアッセイモジュールを含むことができる。装置は、試料採取装置、読み取り機、および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドを含むアッセイモジュールも含むことができる。

H . 放射線曝露の検出

【0261】

放射線曝露を検出するのに使用するための H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体ならびに H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質およびペプチドが本明細書において提供される。

【0262】

一般的に、放射線曝露の検出のための方法は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の直接的検出または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の間接的検出を含む。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の直接的検出として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体と接触させるステップと、(b) 抗体に結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、放射線曝露が生じたことを示す。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の間接的検出として、方法は、一般的に、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b) ペプチドに結合する試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、放射線曝露が生じたことを示す。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。例示的な一実施形態では、7 Gy の X 線曝露の後の 2 時間後の H 1 . 0 K 1 7 0 m e 2 抗原の濃度の変化は、12 $\mu\text{mol} / \text{L}$ から 21 $\mu\text{mol} / \text{L}$ まで、48 時間後では 26 $\mu\text{mol} / \text{L}$ から 35 $\mu\text{mol} / \text{L}$ までである。

【0263】

一部の実施形態では、方法は、このような曝露から 5 分、10 分、15 分、20 分、25 分、30 分、45 分、60 分、75 分、90 分、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、24 時間、48 時間、3 日、4 日、または最長 5 日以内に放射線曝露を決定するのに有用である。

【0264】

一部の実施形態では、方法は、野外の状況下、例えば戦闘区域で、軍人が、このような曝露を決定するのに有用である。

10

20

30

40

50

【0265】

一部の実施形態では、放射線損傷の検出のためのポータブルな装置が本明細書において提供される。装置は、試料採取装置、読み取り機、およびH1.0K180me2抗体を含むアッセイモジュールを含むことができる。装置は、試料採取装置、読み取り機、およびH1.0K180me2タンパク質またはペプチドを含むアッセイモジュールも含むことができる。

I. H1.0K180me2およびラパログ

【0266】

ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)は、有望な治療標的として出現した。ラパマイシンおよびいくつかのラパマイシン誘導体、ラパマイシン類似体、および他のmTOR阻害剤は、ある特定の疾患状態の処置のためにFDAに承認された薬物である。

10

【0267】

本発明者らは、H1.0K180me2の検出が、「ラパログ」と総称されるラパマイシン、ラパマイシン誘導体、ラパマイシン類似体、および他のmTOR阻害剤に対する個体の応答性のスクリーニングに有用である可能性があり、ラパログをベースとする治療レジメンをモニタリングするのに有用である可能性を見出した。本発明者らは、H1.0K180me2の検出が、薬物スクリーニングを目的として、追加のラパログのスクリーニングに有用である可能性を見出した。具体的には、ラパマイシン誘導体および免疫抑制剤、エベロリムスは、DNA損傷の際のH1.0K180me2の出現をブロックすることが、ここで示される(図18)。遺伝毒性ストレスへの曝露に先立つ、またはそれと並行したラパログによる処置が、H1.0K180me2の濃度および/または細胞内局在の変化によって証明されるように、遺伝毒性ストレス要因の作用を低減させる可能性があることも観察された。

20

【0268】

本明細書で使用する場合、ラパログは、FDAに承認されたラパログおよび現在臨床試験が進行中のラパログを含む。FDAに承認されたラパログとして、ラパマイシン、シロリムス、ラパミューン、エベロリムス、RAD001、アフィニトール、Zortress、テムシロリムス、CCI-779、トーリセル、リダフォロリムス、AP23573、MK-8669、デフォロリムス、ゾタロリムス、およびABT-578が挙げられる。他のラパログとして、AZD8055、AZD2014、OSI-027、MLN0128、WYE-132、Torin1、PI-103、P7170、PF-04691502、PF-05212384、PKI-587、GNE477、PKI-180、WJD008、XL765、SAR245409、NVP-BEZ235、BGT226、SF1126、GSK2126458、Ku-0063794、WYE-354、NVP-BEZ235、PF-05212384、XL765、Torin2、WYE-125132、およびOSI-027が挙げられる。

30

【0269】

一般的に、がん、免疫不全、糖尿病、関節炎、アルツハイマー病および他の神経変性疾患、心血管疾患、自己免疫疾患、および他の年齢に関連する病理と診断された個体において進行中のラパログベースの処置の効果をモニタリングするための方法が本明細書において提供される。

40

【0270】

したがって、一実施形態では、ラパログによる処置を受けている個体がこのような処置に応答性であるかどうかを決定する方法であって、(a)個体由来の生体試料をH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(b)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2の濃度および/または局在を決定するステップと、(c)個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップとを含み、対照に対する確立された濃度の低下または局在の変化が、個体がラパログに応答性であることを示す方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、対照に対するH1.0K180me2の細胞外濃度の上昇が存在する場合、ラパログによる処置は有効でないか、または修正される必要があること

50

が決定される。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の細胞質局在の増加が存在する場合、ラパログによる処置は有効でないか、または修正される必要があることが決定される。一部の実施形態では、低下は、ラパログが投与されている関連疾患と診断されていない、年齢を一致させた対照に対するものである。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質の細胞外または細胞質濃度の低下が存在する場合、処置は有効であり、継続されるべきであることが決定される。一部の実施形態では、方法は、処置のタイプ、過程、期間、および/または投薬量を修正する情報を使用するステップをさらに含む。一部の実施形態では、循環 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度が決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

10

【 0 2 7 1 】

同様に、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する自己抗体が測定に使用される場合、方法は、(a) 個体由来の生体試料を H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b) タンパク質またはペプチドに結合する自己抗体の濃度を決定するステップと、(c) 個体が処置に応答性であるかどうかを決定するステップとを含み、対照に対する自己抗体の濃度の変化が、個体がラパログに応答性であることを示す。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体の濃度の変化が存在しない場合、ラパログによる処置は有効でないか、または修正される必要があることが決定される。一部の実施形態では、低下は、ラパログが投与されている関連疾患と診断されていない、年齢を一致させた対照に対するものである。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体の濃度の変化が存在する場合、処置は有効であり、継続されるべきであることが決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

20

【 0 2 7 2 】

一部の実施形態では、がん、免疫不全、糖尿病、アルツハイマー病または他の神経変性疾患、心血管疾患、自己免疫疾患、関節炎、および他の年齢に関連する病理と診断されたか、またはこれらを有する疑いがあり、ラパログによる処置から利益を得る可能性がある個体を選択するため、すなわち、個体がラパログによる処置に応答する可能性があるかどうかを決定するための方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、この方法は、個体由来の生体試料を準備するステップと、試料を、*in vitro*で、*ex vivo*で、切片培養で、または組織培養で、ラパログにより処置するステップと、試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度および/または細胞内局在を決定するステップとを含む。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体を使用して試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度を測定することによって決定される。一部の実施形態では、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度は、試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体の濃度を測定することによって決定される。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の細胞質内または細胞外濃度の上昇が存在する場合、ラパログによる処置が有効でない可能性があることが決定される。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の細胞質内局在の増加が存在する場合、ラパログによる処置が有効でない可能性があることが決定される。一部の実施形態では、低下は、個体がラパログによる処置を受ける可能性がある疾患と診断されていない、年齢を一致させた対照に対するものである。一部の実施形態では、対照に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質の細胞質内または細胞外濃度の低下が存在する場合、処置は有効である可能性があることが決定される。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

30

40

【 0 2 7 3 】

一部の実施形態では、本明細書において提供される方法は、処置のタイプ、過程、期間、および/または投薬量を修正する情報を使用するステップをさらに含む。

【 0 2 7 4 】

他の実施形態では、特定される新たなラパログの能力をモニターするための H 1 . 0 K

50

180me2の検出の使用(薬物スクリーニング用途)が本明細書において提供される。

J. 生物学的老化の検出

【0275】

生物学的老化を検出するのに使用するためのH1.0K180me2抗体ならびにH1.0K180me2タンパク質およびペプチドが本明細書において提供される。本明細書において提供される場合、老化はほとんどの生物の基本的性質であるため、生物学的老化マーカーまたは老化のバイオマーカーは、生物学的調査において多くの用途を見出すことが期待される。

【0276】

暦年齢と生物学的年齢の間に差が存在しうる。一部の個体はより急速に老化するが、他の個体は、良い習慣、遺伝子および/または環境ストレス要因の欠如により、よりゆっくり老化し、より長く健康かつ「若々しく」する。その生物学的年齢を追跡することができることにより、生活様式を修正するのに役立つ(肥満度指数を追跡することに類似する)、またはアンチエイジングの手順を展開するのに役立つ場合がある。

【0277】

老化マーカーによる生物学的年齢の正確な測定は、(i)種々の年齢に関連する疾患を診断すること、およびがんのサブタイプを定義するために、(ii)種々の疾患の発生を予測すること/予見すること、ならびに(iii)若返りのアプローチを含む治療介入を評価するための代用マーカーとしての役割を果たすことなどの、生物学的老化についての年齢に関連する疾患の理論を試験するのに有用である。

【0278】

一般的に、生物学的老化の検出のための方法は、H1.0K180me2の直接的検出またはH1.0K180me2の間接的検出を含む。H1.0K180me2の直接的検出として、方法は、一般的に、(a)個体由来の生体試料をH1.0K180me2抗体と接触させるステップと、(b)抗体に結合する試料中のH1.0K180me2抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が生物学的老化を経験した個体に由来することを示す。H1.0K180me2の間接的検出として、方法は、一般的に、(a)個体由来の生体試料をH1.0K180me2タンパク質またはペプチドと接触させるステップと、(b)ペプチドに結合する試料中のH1.0K180me2抗原の濃度を決定するステップとを含み、対照に対する濃度の上昇は、生体試料が生物学的老化を経験した個体に由来することを示す。一部の実施形態では、濃度の変化は、最適な特異性および感度に対する受診者動作特性曲線分析によって確立された閾値に対するものである。

K. 診断キットおよび製品

【0279】

H1.0K180me2の検出に有用なキットが本明細書において提供される。一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載されている1種または複数のH1.0K180me2抗体またはH1.0K180me2ペプチドを含む。ある特定の実施形態では、抗体またはペプチドは、標識されている。さらに、キットは、本明細書に記載されている方法のいずれかを実行するための説明材料を任意選択で含むことができる。説明材料は、典型的には、書面または印刷材料を含むが、このようなものに限定されない。このような説明書を保存し、これらをエンドユーザーに伝えることができる任意の媒体が本明細書において企図される。このような媒体として、これらに限定されないが、電子保存媒体(例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ)、光学媒体(例えば、CD-ROM)などが挙げられる。このような媒体は、このような説明材料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含むことができる。

【0280】

キットは、キットが設計される特定の適用を容易にするために、さらなる構成成分を含む場合もある。したがって、例えば、キットが標識されている抗H1.0K180me2を含有する場合、キットは、標識を検出するための試薬(例えば、酵素標識のための酵素

10

20

30

40

50

基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、適当な二次標識など)をさらに含有してもよい。キットは、特定の方法の実践のために日常的に使用される緩衝液および他の試薬をさらに含んでもよい。

【0281】

H1.0K180me2抗体に加えて、H1.0K180me2を検出するためのイムノアッセイにおいて有用な例示的キットは、H1.0K180me2タンパク質またはペプチドを含んでもよい。このペプチドは、例えば、陽性対照としてまたは競合イムノアッセイの競合者として用いられてもよく、実行されるアッセイのフォーマットに応じて、標識されてもされなくてもよい。

【0282】

抗H1.0K180me2ペプチドに加えて、H1.0K180me2を検出するためのイムノアッセイにおいて有用な別の例示的キットは、H1.0K180me2抗体を含むことになる。この抗体は、例えば、陽性対照としてまたは競合イムノアッセイの競合者として用いられてもよく、実行されるアッセイのフォーマットに応じて、標識されてもされなくてもよい。

【0283】

皮下組織の標的H1.0K180me2タンパク質およびペプチドの濃度を測定するための経皮吸収パッチであって、H1.0K180me2抗体を含む基質、および複数のマイクロニードルを含む経皮吸収パッチが本明細書において提供される。別の実施形態では、H1.0K180me2自己抗体の濃度を測定するための経皮吸収パッチであって、基質、およびH1.0K180me2自己抗体の検出に特異的なH1.0K180me2結合タンパク質またはペプチドを含む経皮吸収パッチが本明細書において提供される。一部の実施形態では、パッチは、経皮マイクロニードルアレイパッチである。一部の実施形態では、パッチの基質は、弾性的に伸縮可能である。一部の実施形態では、本明細書において提供される抗体またはペプチドを含むパッチ、および任意選択で、使用説明書を含むキットが本明細書において提供される。一部の実施形態では、パッチは、複製老化、DNA損傷、遺伝毒性ストレス、放射線曝露、およびアルツハイマー病を検出することを目的として、H1.0K180me2を検出し、その濃度を測定するのに有用であるか、または生体試料中のH1.0K180me2抗体を検出し、その濃度を測定するのに有用であり、治療レジメンをモニタリングするのに有用であり、薬物スクリーニングに有用である。

【0284】

検出、例えば、DNA損傷または放射線曝露の検出のためのポータブルな装置も本明細書において提供される。装置は、試料採取装置、読み取り機、およびH1.0K180me2抗体を含むアッセイモジュールを含んでもよい。装置は、試料採取装置、読み取り機、およびH1.0K180me2タンパク質またはペプチドを含むアッセイモジュールも含んでもよい。

【0285】

分析物のラテラルフローアッセイに適するラテラルフロー片または試験片であって、試料受容ゾーンを含み、試料受容ゾーンが、H1.0K180me2抗体または抗H1.0K180me2結合ペプチドのいずれかを含むラテラルフロー片または試験片も本明細書において提供される。一部の実施形態では、抗体またはペプチドは標識を含む。

IV. 治療薬

A. メチル化H1.0関連疾患および状態の処置

【0286】

メチル化H1.0関連疾患または状態の処置のための、治療用H1.0K180me2抗体、治療用H1.0K180me2タンパク質、および治療用H1.0K180me2ペプチドが本明細書において提供される。

【0287】

本明細書で使用する場合、「メチル化H1.0関連疾患または状態」は、H1.0K180me2のレベルの上昇、K180のH1.0タンパク質/ペプチド基質の内因性ジメ

10

20

30

40

50

チル化の増加、クロマチンからの H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の放出の増加、核から細胞質への H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の放出の増加、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の細胞質内沈着の増加、細胞外スペースにおける H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 のレベルの上昇、体液（例えば、血清、尿、唾液、脳脊髄液など）中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の循環レベルの上昇、および / または H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に特異的な自己抗体のレベルの上昇が存在するものである。

【 0 2 8 8 】

メチル化 H 1 . 0 関連疾患および状態として、これらに限定されないが、老化細胞の増加に伴う、年齢に関連する病理、アルツハイマー病、放射線曝露、遺伝毒性ストレス要因への曝露、外部および内部ストレス要因に関連する老化細胞の蓄積を含む状態、ならびに

10

【 0 2 8 9 】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に結合して取り除くことによって、個体のメチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、個体に治療有効量の治療用 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体を投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

【 0 2 9 0 】

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体に結合して取り除くために、個体のメチル化 H 1 . 0 関連疾患または状態を処置する方法であって、個体に治療有効量の治療用 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質または治療用 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドを投与するステップを含む方法が本明細書において提供される。

20

【 0 2 9 1 】

本明細書で使用する場合、個体は、ヒト、飼育動物および家畜、ならびに動物園の動物、スポーツ用動物、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ウサギ、ウシ、ブタ、ハムスター、アレチネズミ、マウス、フェレット、ラット、ネコなどを含む哺乳動物として分類される任意の動物を指す。個体は、雄または雌でありうる。

【 0 2 9 2 】

本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は 5 0 歳を超えている。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は 5 0 歳未満である。本明細書に記載されている方法の一部の実施形態では、個体は少なくとも 5 0 歳であるか、少なくとも 5 5 歳であるか、少なくとも 6 0 歳であるか、少なくとも 6 5 歳であるか、少なくとも 7 0 歳であるか、少なくとも 7 5 歳であるか、または少なくとも 8 0 歳である。例示の実施形態では、個体は少なくとも 6 0 歳である。

30

【 0 2 9 3 】

老化の間のメチル化 H 1 . 0 関連疾患および状態により具体的に目を向けると、ヒトの脳組織における細胞質内 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の蓄積の増加がある 図 1 1 B。これらの観察は、血清学試験で観察された循環 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の年齢に関連する増加と相関する（図 1 1 C）。

【 0 2 9 4 】

しかし、アルツハイマー病と診断された個体において、対照集団（アルツハイマー病の病理がない）を参照対照（診断されたアルツハイマー病患者）と比較すると（図 1 2 A ~ 1 2 C）、血清学的 E L I S A 試験で観察された H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の循環レベルの降下が存在する（図 1 1 C）。

40

【 0 2 9 5 】

病理を有さない年齢を一致させた個体と比較した場合、アルツハイマー病群における H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の循環レベルのこの降下には、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 エピトープに対する I g G および I g M 自己抗体のレベルの上昇に伴う（図 1 3 B、1 4 B、1 4 D、1 4 E、1 5 A、1 6 A、1 6 B）。

【 0 2 9 6 】

したがって、アルツハイマー病の文脈では、治療有効量の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体

50

(例えば、細胞透過性抗体または細胞除去抗体)による処置が提供される。

【0297】

さらに、年齢を一致させた対照と比較した場合、H1.0K180me2に応答して生じた天然に存在する血清IgGおよびIgM自己抗体は、アルツハイマー病を有する個体で増加し(図13B、14B、14D、14E、15A、16A、16B)、H1.0K180me2を発現する細胞を攻撃および破壊するという意味で、有害である可能性がある。したがって、この文脈では、タンパク質またはペプチドに結合する(中和する)治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置が提供される。

【0298】

DNA損傷剤の文脈では、H1.0K180のジメチル化(H1.0K180me2)は、化学療法剤であるプレオマイシンによる急性のDNA損傷後にクロマチンで観察される(図7A)。したがって、この文脈では、治療有効量のH1.0K180me2抗体(例えば、細胞透過性抗体または細胞除去抗体)による処置が提供される。さらに、H1.0タンパク質のジメチル化におけるH1.0K180me2の増加に応答して生じた天然に存在する自己抗体は、タンパク質またはペプチドに結合する(中和する)治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置にとっての標的となる。

【0299】

遺伝毒性ストレスの文脈では、H1.0K180me2は、遺伝毒性ストレスに誘導される老化に際して(DNA損傷剤による処置の数日後)クロマチンから放出され(図9A)、細胞から細胞外スペースへと分泌される(図9B)。したがって、この文脈では、治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置が提供される。さらに、H1.0K180me2の増加に応答して生じる天然に存在する自己抗体は、タンパク質またはペプチドに結合する(中和する)治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置にとっての標的となる。

【0300】

放射線曝露の文脈では、イオン化放射線への曝露は、血清中の循環H1.0K180me2のレベルの上昇を誘導する(図10Aおよび図10B)。したがって、この文脈では、治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置が提供される。さらに、H1.0K180me2の増加に応答して生じる天然に存在する自己抗体は、タンパク質またはペプチドに結合する(中和する)治療有効量のH1.0K180me2抗体による処置にとっての標的となる。

【0301】

一部の実施形態では、処置される個体が、メチル化H1.0関連疾患または状態に実際に苦しんでいるかどうかを決定するための診断方法が実行される。メチル化H1.0関連疾患または状態を示すH1.0K180me2またはH1.0K180me2抗体の存在、局在、クロマチン画分、細胞質内蓄積、血清レベル、自己抗体レベルについて試験するアッセイは、処置に先立って実行されてもよい。

B. 治療用H1.0K180me2抗体

【0302】

上記セクション(II)(A)において議論されたように、H1.0K180me2エピトープを認識し、これに特異的に結合し、治療のために使用されてもよい抗体が本明細書において提供される。

【0303】

ジメチル化K180抗原を認識するH1.0K180me2抗体に加えて、一部の実施形態では、治療用抗体は、抗イディオタイプ抗体である。このようなイディオタイプ抗体は、アルツハイマー病を有する患者の疾患関連IgG自己抗体もしくは疾患関連IgM自己抗体、または他のメチル化H1.0関連疾患もしくは状態を認識する。一部の実施形態では、*in vitro* IgM(IVIgM)はアルツハイマー病患者ドナーの血漿から生じ、アルツハイマー病に対する予防的治療またはワクチン接種として使用されてもよい。このようなIVIgMは、患者の疾患関連自己抗体を認識する抗イディオタイプ抗体

10

20

30

40

50

を含有してもよい。したがって、一部の実施形態では、I V I g Mは、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に対する I g G および / または I g M 自己抗体を不活性化する可能性があるイデオタイプ抗体を有することができる。

【 0 3 0 4 】

本明細書において提供される治療用抗体は、I g G、I g A、I g E、I g D、もしくは I g M などの任意の免疫グロブリンタイプのものであってもよく、または I g G、I g A、I g E、I g D、もしくは I g M に対する抗イデオタイプ抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗体は、I g G サブタイプのものであり、I g G 1 抗体、I g G 2 抗体、I g G 3 抗体、または I g G 4 抗体であってもよい。一部の実施形態では、抗体は、I g M サブタイプのものである。

10

【 0 3 0 5 】

本明細書において提供される抗体は、様々な目的で、例えば、これらに限定されないが、検出、可視化、定量化、選別、治療において使用するため、およびその治療用途に関連する生物学的アッセイにおいて使用するためにさらにコンジュゲートされていてもよい。

【 0 3 0 6 】

一部の実施形態では、治療用抗体は中和抗体であり、抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の 1 種または複数の生物学的活性を中和する。例えば、抗体は、細胞外 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に結合し、それが有する可能性がある任意の結合性またはシグナル伝達活性を中和することができる。一部の実施形態では、抗体は、細胞または試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を取り除くか、またはブロックする場合がある。一部の実施形態では、抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 を含む細胞を取り除く場合がある。

20

【 0 3 0 7 】

一部の実施形態では、治療用抗体は、老化細胞を取り除く場合がある。一部の実施形態では、抗体は、アルツハイマー病の症状を生じさせる細胞 / 組織またはタンパク質産物を取り除く場合がある。一部の実施形態では、抗体は、放射線による損傷、DNA 損傷剤、および他の遺伝毒性物質によって損傷した細胞を取り除く場合がある。一部の実施形態では、抗体は、細胞透過性抗体である。他の実施形態では、罹患細胞の膜が含まれ、本明細書において提供される治療用 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体の侵入が可能である。

【 0 3 0 8 】

一部の実施形態では、本明細書において提供される治療用抗体は、抗体依存性細胞傷害作用 (A D C C) 活性を有する。細胞傷害性 T 細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、樹状細胞、または単球を含む、その細胞表面に F c ガンマ受容体 (F c R または F C G R) を有するエフェクター細胞は、標的細胞に結合した抗体の F c 領域を認識し、結合する。このような結合は、細胞死を導く細胞内シグナル伝達経路の活性化を誘発する場合がある。

30

【 0 3 0 9 】

一部の実施形態では、治療用抗体は、補体依存性細胞傷害 (C D C) 活性を有する。抗体に誘導される C D C は、古典的な補体カスケードのタンパク質を介して媒介され、補体タンパク質 C 1 q を抗体に結合させることによって誘発される。C 1 q に結合する抗体 F c 領域は、補体カスケードの活性化を誘導する場合がある。

40

【 0 3 1 0 】

一部の実施形態では、治療用抗体は、抗体依存性細胞性食作用 (A D C P) 活性を有する。単球およびマクロファージを含む、その細胞表面に F c 受容体を有する食細胞は、標的細胞に結合する抗体の F c 領域を認識し、結合する。抗体結合標的細胞に対する F c 受容体の結合に際し、標的細胞の食作用が開始される場合がある。

【 0 3 1 1 】

一部の実施形態では、治療用抗体は、免疫複合体を形成してもよい。例えば、免疫複合体は、抗体によって覆われる H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原を発現するかまたは出す (e x t r u d e) 細胞であってもよい。

C . 治療用 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 タンパク質および H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチド

50

【0312】

メチル化H1.0関連疾患または状態に苦しむ個体のH1.0K180me2抗原の産生は、H1.0K180me2抗原に特異的な天然に存在する自己抗体の生成を生じさせる。したがって、これらの天然に存在する自己抗体に結合し、これらを取り除く治療アプローチが本明細書において提供される。この目的のために、一部の実施形態では、細胞中または循環中のH1.0K180me2エピトープに反応して生じる天然に存在する自己抗体に結合し、それらをさらに中和する可能性がある、K180に対応するジメチル化リシンを保持する治療用H1.0K180me2タンパク質および治療用H1.0K180me2ペプチドが本明細書において提供される。

【0313】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、個体の血清中のH1.0K180me2自己抗体の生体作用をブロックする場合がある。このような自己抗体レベルのブロックは、免疫応答を減らす場合があり、メチル化H1.0疾患または状態の有害症状を軽減させる場合がある。

【0314】

一実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質は、H1.0K180me2全長タンパク質(配列番号1)である。本明細書において提供される治療用H1.0K180me2ペプチドは、ジメチル化K180残基を保持する全長H1.0K180me2タンパク質の任意の断片であってもよい。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドは、5~193アミノ酸(aa)長の範囲である。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドの長さは、5aa、6aa、7aa、8aa、9aa、10aa、11aa、12aa、13aa、14aa、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、20aa、21aa、22aa、23aa、24aa、25aa、26aa、27aa、28aa、29aa、またはさらに30aaである。ある特定の例示的实施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドの長さは、15aa、16aa、17aa、18aa、19aa、または20aaである。表3Aは、本明細書において提供される治療用H1.0K180me2ペプチドの例示的配列を提供する。したがって、一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドは、表3Aに提示されるものから選択される配列のうちの一つを含む。関連する実施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドは、表3Aに提示されるものから選択される配列のうちの一つからなる。例示的実施形態では、治療用H1.0K180me2ペプチドは、配列番号3、配列番号4、または配列番号5の配列を含む。例示的実施形態では、H1.0K180me2抗体結合ペプチドは、配列番号3、配列番号4、または配列番号5の配列からなる。

【0315】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは合成である。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質またはペプチドは、例えば、本明細書においてより詳細に説明されている、K180残基の特異的ジメチル化を可能とする条件下で、G9Aメチルトランスフェラーゼ酵素またはG9A様タンパク質(GLP)メチルトランスフェラーゼ酵素を使用する、*in vitro*メチル化反応の産物である。

【0316】

セクションIで提供されるように、本明細書において提供される治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、様々な目的のため、例えば、これらに限定されないが、治療において使用するため、およびその治療用途に関連する生物学的アッセイにおいて使用するために、さらにコンジュゲートされていてもよい。

【0317】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、標識、例えば、検出可能な標識、スピン標識、比色標識、放射性標識、酵素標識、蛍光標識、または磁気標識を含む(例えば、標識にコンジュゲートされている)。例示的実施形態では

10

20

30

40

50

、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、ビオチン化されている。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、固体表面、例えば、ビーズ（例えば、磁気、ガラスまたはプラスチックビーズ）、カラム、またはマイクロプレートにコンジュゲートされているかまたは付着されている。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、マイクロプレートにコーティングされている。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、これらに限定されないが、放射性核種、細胞毒素、化学療法剤、薬物、プロドラッグ、毒素、酵素、イムノモジュレーター、アポトーシス促進剤、サイトカイン、ホルモン、オリゴヌクレオチド、アンチセンス分子、siRNA、および二次抗体を含むエフェクター分子にコンジュゲートされているか、またはこれを含む。

10

【0318】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、H1.0K180me2に対して特異的である自己抗体に対して選択的である。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、H1.0K180me2に対して非特異的である自己抗体に結合する。

【0319】

ある特定の実施形態では、本明細書において提供される治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、0.0001nM~1μMの範囲の解離定数(Kd)を有する。例えば、抗H1.0K180me2結合ペプチドのKdは、約1μM、約100nM、約50nM、約10nM、約5nM、約1nM、約0.5nM、約0.1nM、約0.05nM、約0.01nM、約0.005nM、約0.001nM、約0.0005nM、またはさらに約0.0001nMであってもよい。

20

【0320】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、ヒトH1.0K180me2自己抗体に特異的である。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、他の種由来のH1.0K180me2自己抗体と交差反応性である。

【0321】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、H1.0K180me2自己抗体に対して選択的であり、H1.0K180me1またはH1.0K180me3に結合する自己抗体に対してほとんどまたは全く結合性を示さない。一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドは、H1.0K180me2自己抗体に結合するが、H1.0K180me1および/またはH1.0K180me3自己抗体に対しても結合性を示す。

30

【0322】

一部の実施形態では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドのH1.0K180me2抗体に対する結合優先性（例えば、親和性）は、一般的に、非特異的標的抗体（例えば、無作為に生じた抗体）に対して、少なくとも約2倍、約5倍、または少なくとも約10、20、50、10²、10³、10⁴、10⁵、もしくは10⁶倍である。

40

【0323】

当業者が精通する方法を使用して、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドがH1.0K180me2抗体に対して特異性および/または選択性を有するかどうかを決定するために、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドを評価することも可能である。

【0324】

本明細書に記載されている治療用H1.0K180me2ペプチドをコードする核酸が本明細書において提供される。本明細書に記載されている治療用H1.0K180me2ペプチドをコードする核酸のいずれかを含むベクターも本明細書において提供される。

D. 併用療法

50

【0325】

本明細書において提供される治療用H1.0K180me2抗体および治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドのいずれかの投与は、H1.0メチル化に現れる疾患に対する他の公知の薬物/処置と組み合わせて投与してもよい。

【0326】

アルツハイマー病予防の文脈では、治療用H1.0K180me2抗体のいずれかは、これらに限定されないが、APP合成阻害剤、ベータ-セクレターゼ阻害剤、ガンマ-セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、A凝集阻害剤、A免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質のS-ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト、ラパマイシン、ラパログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小RNA分子、ペプチド、および超音波療法を含むアルツハイマー病予防薬またはレジメンの投与と組み合わせて投与されてもよい。

10

【0327】

アルツハイマー病処置の文脈では、治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドのいずれかは、これらに限定されないが、APP合成阻害剤、ベータ-セクレターゼ阻害剤、ガンマ-セクレターゼ阻害剤およびモジュレーター、A凝集阻害剤、A免疫療法、コレステロール降下薬、抗タウ薬、コリンエステラーゼ阻害剤、N-メチルD-アスパラギン酸(NMDA)アンタゴニスト、非定型抗精神病薬、タンパク質のS-ニトロシル化のブロッカー、グルカゴン様ペプチド-1受容体アゴニスト、ラパマイシン、ラパログ、内在性カンナビノイド、カンナビノイド、神経保護物質、カルシウム流入を制御する分子、抗酸化剤、抗炎症薬、グルタミン酸ホメオスタシスの制御を制御する薬物、オートファジー誘導物質、ホルモン、ホルモン調節剤、スタチン、インスリン、インスリン担体、多機能ナノキャリア、ビタミン、栄養補助剤、小RNA分子、ペプチド、および超音波療法を含むアルツハイマー病薬またはレジメンの投与と組み合わせて投与されてもよい。

20

E. 治療用H1.0K180me2抗体および治療用抗H1.0K180me2結合タンパク質/ペプチドの投与

30

【0328】

本明細書に記載されている治療用H1.0K180me2抗体および治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドの*in vivo*投与は、静脈内に、筋肉内に、皮下に、局所に、経口的に、経皮的に、腹腔内に、眼窩内に、移植により、吸入により、髄腔内に、脳質内に、または鼻腔内に実行されてもよい。治療の有効量は、H1.0メチル化において出現する疾患もしくは状態、またはH1.0K180me2自己抗体レベルの上昇を現す疾患もしくは状態の処置のために投与されてもよい。治療の適当な投薬量は、処置される疾患または状態のタイプ、治療用抗体、タンパク質、またはペプチドのタイプ、疾患または状態の重症度および過程、個体の臨床状態、処置への個体の臨床歴および応答、ならびに担当医の裁量に基づいて決定されてもよい。

40

【0329】

本明細書に記載されている治療用H1.0K180me2抗体および治療用H1.0K180me2タンパク質/ペプチドの*in vivo*投与として、通常の投与量は、投与経路に応じて、1日当たり、個体の体重の約1ng/kgから約1000mg/kgまたはそれより多い量まで変更してもよい。数日またはそれより長い日数にわたる繰り返し投与として、処置されるメチル化H1.0関連疾患または状態の重症度に応じて、症状の所望の抑制が達成されるまで処置が持続されてもよい。医師が達成することを望む薬物動態学的崩壊のパターンに応じて、投薬レジメンが有用である場合がある。例えば、個体に1週間に1から21回まで投与することが本明細書において提供される。ある特定の実施形態では、投与頻度は、1日に3回、1日に2回、1日に1回、1日おきに1回、週に1回

50

、2週毎に1回、4週毎に1回、5週毎に1回、6週毎に1回、7週毎に1回、8週毎に1回、9週毎に1回、10週毎に1回、または月に1回、2カ月毎に1回、3カ月毎に1回、もしくはそれより長い間隔である。治療の進行は、従来の技術およびアッセイによりモニターされてもよい。投与レジメンは、使用される用量とは独立して、経時的に変更してもよい。

F．医薬組成物

【0330】

本出願は、本明細書に記載されている治療用抗体、タンパク質またはペプチドの任意の1種または複数と、1種または複数の薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物を含む、治療用H1．0K180me2抗体および治療用H1．0K180me2タンパク質 / ペプチドを含む組成物を提供する。一部の実施形態では、組成物は無菌である。医薬組成物は、一般的に、有効量の治療用抗体、タンパク質、またはペプチドを含む。

10

G．キットおよび製品

【0331】

本出願は、本明細書に記載されている治療用H1．0K180me2抗体、治療用H1．0K180me2タンパク質、および治療用H1．0K180me2ペプチド組成物を含むキットを提供する。一部の実施形態では、キットは、二次抗体、免疫組織化学分析用の試薬、薬学的に許容される賦形剤および取扱説明書ならびにそれらの任意の組合せのいずれかから選択される構成成分をさらに含有する。一実施形態では、キットは、本明細書に記載されている治療用組成物の任意の1種または複数と、1種または複数の薬学的に許容される賦形剤とを含む。

20

【0332】

本出願は、本明細書に記載されている治療用組成物またはキットのいずれか1つを含む製品も提供する。製品の例としてバイアル（密封バイアルを含む）が挙げられる。

【0333】

以下の例は、例示的目的で含まれ、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。

【実施例】

【0334】

（実施例1）

材料および方法

以降の実施例で使用される材料および方法がここで提供される。

H1．0タンパク質およびペプチドの *in vitro*メチル化 - 放射標識 *in vitro*メチル化アッセイ

30

【0335】

*in vitro*でG9AメチルトランスフェラーゼによるH1．0ペプチドのメチル化を可視化するために、オートラジオグラフィ曝露後にゲル上にメチル化ペプチドの可視化を可能とする、放射標識されたメチルドナーを組み入れるメチル化アッセイを実施した。以下のメチル化反応を1．5mlチューブ中においてセットアップした：1× HMT反応緩衝液（50mMのTris-HCl、5mMのMgCl₂、4mMのジチオトレイトール、pH9．0）、10UのG9Aメチルトランスフェラーゼ（NEB、M0235S、ロット番号0031201）、3．2mMのアデノシル-L-メチオニン、S-[メチル-3H]（Perkin Elmer、NET155H、ロット番号1664720）、10μgのH1．0ペプチド（ThermoFisher Scientific、ピオチン-AKPVKASKPKKAKPVKPK（配列番号75））、最終体積10μl。H1．0ペプチドを含まない点以外は上記と同様の対照反応液も創出した。反応液をサーモサイクラー中で、37℃で1時間インキュベートした。氷上で5分間インキュベートすることにより反応を停止させ、次に、16．5%のトリシゲル（BioRad、4563063）上で分離した。ゲルを30%のメタノール、5%のグリセロールに30分間浸漬した後、室温で24時間真空乾燥した。次いで、ホスホイメジャー（Mole

40

50

cular Dynamics)を用いて乾燥ゲルのオートラジオグラフィー分析を実施し、G9Aメチルトランスフェラーゼによるメチル-3H基を有するH1.0ペプチドの有効なメチル化を評価した。

液体クロマトグラフィーおよび高分解能質量分析(LC-MS)

【0336】

ヒストンH1.0におけるG9AおよびGLPメチルトランスフェラーゼによるメチル化の正確な部位を特定するために、*in vitro*メチル化アッセイを実施し、次に、液体クロマトグラフィーおよび高分解能質量(LC-MS)分析によって分析した。G9Aメチルトランスフェラーゼ(NEB、M0235S、ロット番号0031201)またはGLPメチルトランスフェラーゼ(Cayman Chemical、10755)のいずれかを使用してメチル化反応をセットアップした。各反応のメチルドナーは、標識されていないS-アデノシル-L-メチオニン(NEB、B9003S)であった。各反応のH1.0基質は、ピオチン(ThermoFisher Scientific、ピオチン-AKPVKASPKKAKPKVKPK(配列番号75))、ジメチル化H1.0ペプチド(ThermoFisher Scientific、ピオチン-AKPVKASPKKAKPKVK(^me²)PK(配列番号76))、または全長組換えヒトH1.0(NEB、M2501S)で標識した非修飾H1.0ペプチドのいずれかであった。メチル化反応を以下のように各条件に対して三連でセットアップした: 1x HMT反応緩衝液(50mMのTris-HCl、5mMのMgCl₂、4mMのジチオトレイトール、pH9.0); 10UのG9AもしくはGLPメチルトランスフェラーゼ; 3.2mMのS-アデノシル-L-メチオニン; 500ngの非修飾もしくは修飾H1.0ペプチド、または1μgの全長タンパク質; 最終体積10μl。対照として、いずれのメチルトランスフェラーゼも存在しないが上記のような反応液をセットアップした。すべての反応液をサーモサイクラー中で、37°Cで1時間インキュベートし、次に、氷上で5分間インキュベートすることにより停止させた。試料は、LC-MS分析に先立って-80°Cで凍結させた。

【0337】

液体クロマトグラフィーおよび高分解能質量分析(LC-MS)による分析のために、試料を上述のように調製し、約1μgの生成物を、10cm x 100μmのトラップカラムおよび25cm x 100μmのID分解カラムで構成されたThermo Scientific Easy nLCシステムに注入した。緩衝液Aは、98%の水、2%のメタノール、および0.2%のギ酸であった。緩衝液Bは、10%の水、10%のイソプロパノール、80%のアセトニトリル、および0.2%のギ酸であった。試料を4μL/分で10分間ローディングし、375nL/分で0~45%のBの勾配を130分間かけて実行し、実行時間の合計は150分間であった(再生および試料のローディングを含む)。より高い切替限界値(20K)を使用して、MS2がフルスキャンデューティーサイクルを妨害しないことを保証したこと以外は標準Top-10データ依存構造で、Thermo Scientific LTQ Orbitrap Velos質量分析計を実行した。これにより、定量化のための最適なフルスキャンデータが保証された。イオントラップ質量分析計でMS2の断片化および分析を実施した。試料は三連で実行した。

LC-MSデータ分析

【0338】

RefSeq Human配列データベースを使用し、Thermo Scientific Proteome Discovererバージョン1.4(SequestおよびPercolatorのアルゴリズムを含む)を使用して、タンパク質の特定を実施した。これらの検索は、いずれのメチルトランスフェラーゼ酵素も欠く対照反応液に関して実施した。Percolatorのペプチド信頼度フィルターを「高」に設定した。Pinpointバージョン1.4ソフトウェアを使用して、タンパク質の定量化を実施した。Pinpoint定量化ワークフローには、スペクトルライブラリーとしてProteome Discoverer.msffファイルをインポートすることが含まれた。次に

、特定されたペプチドを、Pinpointピーク検出、クロマトグラムのアラインメントおよび面積計算アルゴリズムを使用するMSRawファイルで定量化した。

【0339】

非修飾H1.0ペプチド(AKPVKASKPKKAKPVKPK(配列番号42))でのG9Aメチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応をセットアップし、生成物をLC-MSにより特定した。メチル化反応は、組換えG9A、標識されていないメチルドナー(S-アデノシル-L-メチオニン)、および非修飾H1.0ペプチドを含んだ。次に、メチル化反応をLC-MSによって分析し、各スペクトルピーク(最終反応におけるペプチド種に対応する)を特定し、スペクトルカウントを使用して定量化した。図22Aにおける「me」の円の数、リシン残基のメチル化状態(モノ-、ジ-、またはトリ-メチル化)を表す。図22Aは、非メチル化H1.0ペプチドの存在下で、G9Aが特異的かつ多量にH1.0K180をジメチル化する(すべてのペプチドの99.9%)ことを示す。

hADSCの培養

【0340】

ヒト脂肪細胞由来間葉系幹細胞(hADSC)は、Life Technologies(R7788-115)およびAmerican Type Culture Collection(ATCC)(PCS-500-011)から商業的に入手した。すべての細胞株は、日常的に脂肪吸引法を受けている年齢が38、45および49歳の3名の健康な成人女性白色人種ドナーから得られたヒト脂肪組織から単離した。フローサイトメリー分析および免疫染色分析により確認された細胞は、CD29、CD44、CD73、CD90、CD105、およびCD166に対して陽性であり、CD14、CD31、CD34、およびCD45に対して陰性であった。細胞株は、in vitro条件下で、脂肪生成、軟骨形成および骨形成分化が可能であることが確認された。

【0341】

単離された脂肪由来幹細胞株は、10%(v/v)のウシ胎仔血清(FBS)および50U/mlのペニシリン/ストレプトマイシンを補充したDMEM/F12培地(Life Technologies、11330-057)中にて、37/5%のCO₂で増殖させた。累積集団倍加(PD)を、培養における増殖日数の関数として、複数継代にわたって、 $PD = \log(N/N_0) \times 3.33$ (式中、N₀はフラスコにプレーティングされた細胞数であり、Nはこの継代で回収された細胞数である)として計算した。自己再生集団(SR)に対するhADSCのPD4~10および複製老化集団(REP-SEN)に対するPD41~46をすべての実験で使用した。

老化の誘導および評価

【0342】

複製老化として、複製枯渇に達するまでhADSCを培養中で増殖させた(PD41~46)。急性DNA損傷条件として、SR hADSC(PD4~10)を、増殖培地において、50μg/mlの硫酸ブレオマイシンで2時間処理した(Cayman Chemical、13877)。遺伝毒性ストレスに誘導される老化として、SR hADSC(PD4~10)を、増殖培地において、50μg/mlの硫酸ブレオマイシン(Cayman Chemical、13877)で2時間処理し、次いで、PBSで洗浄し、ブレオマイシンを含まない新鮮な増殖培地に与えた。次いで、採取前に、細胞を3日間増殖させた。

【0343】

細胞の老化を評価するために、細胞を、増殖停止、SA-gal活性、および持続性のDNA損傷フォーカスの存在を含む老化マーカーに対して採点した。pH依存性老化関連-ガラクトシダーゼ活性(SA-gal)の発現をモニタリングするためのアッセイを、製造業者のキット(BioVision)に記載されているように実施した。培養したhADSCを固定溶液で、室温で15分間固定させ、PBSで2回洗浄し、染色サブストリメントを含有するX-galを用いて37で終夜染色した。細胞をPBSで2回

10

20

30

40

50

洗浄し、光学顕微鏡法 (Leica, DMiL) を使用して画像を取り込んだ。DNA 損傷フォーカスを、以下に記載するように、H2A.Xフォーカスに対する免疫染色によって評価した。H2A.Xフォーカスの出現は、DNAの二重鎖切断またはDNA損傷を示す。H2A.Xフォーカスは、二重鎖切断の広く受け入れられている分子マーカーである。

抗体

【0344】

使用した一次抗体：抗H1.0K180me2、1:100希釈、ウサギポリクローナル、Aviva Systems Biology。抗H1.0全体、1:500希釈、EMD Millipore MABE446。抗H2A.X (Ser139Ph)、1:500~1000希釈、EMD Millipore 05-636。抗ベータ-アクチン、1:2000、Abcam ab6276。抗ポリ-(ADP)-リボース、1:500、Enzo Life Sciences ALX-804-220-R100。抗G9A、1:500、Bethyl Laboratories A300-933A。抗GLP、1:500、Bethyl Laboratories A301-643A。抗H3K9me2、1:1000、Abcam A301-643A。

10

【0345】

二次抗体：ヤギ-抗マウス-HRP、1:4000、Biorad 1706516。ヤギ-抗ウサギ-HRP、1:4000、Biorad 1706515。ヤギ-抗ヒト-HRP、1:4000、Biorad 1721050、AlexaFluor-488-ロバ抗マウス、1:5000、Life Technologies A-21202、AlexaFluor-488-ロバ抗ウサギ、1:5000、Life Technologies A-21206、AlexaFluor-555-ロバ抗マウス、1:5000、Life Technologies A-31570、AlexaFluor-555-ロバ抗ウサギ、1:5000、Life Technologies A-31572、および抗IgM HRP (ウサギ抗ヒトIgM (Mu鎖) (HRP-Conjugate) (Abcam、ab97210、ロット番号GR169227-10))。

20

ELISA

【0346】

以下のプロトコールは、血清H1.0K180me2 IgGレベルの直接的または間接的検出に対する一般化された酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) について記載する。

30

【0347】

図4は、血清H1.0K180me2レベルの間接的検出に対する (例えば、IgGまたはIgMレベルの間接的検出に対する) サンドイッチELISAの使用を示す。ELISAは、体液試料中のH1.0K180me2ペプチドエピトープに対する抗体の検出のために使用される。以下のプロトコールは、血清試料中の特異的抗体を捕捉するためにビオチン化ペプチドを使用する、一般化された酵素連結免疫吸着アッセイ (ELISA) (血清H1.0K180me2 IgGまたはIgMレベルの間接的検出のための) と、それに続く、HRPにコンジュゲートされた二次抗体による検出、およびテトラメチルベンジジン (TMB) とのインキュベーションについて記載する。ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロプレートのウェル (ThermoFisher、15501) を洗浄緩衝液 (Trisで緩衝された生理食塩水 (25mMのTris、150mMのNaCl; pH7.6) と0.1%のBSAおよび0.05%のTween-20) で3回洗浄した。50pmolのカスタムビオチン化H1.0K180me2ペプチド (ThermoFisher) を洗浄緩衝液中で希釈し、穏やかに振盪しながら各ウェルに室温で2時間結合させた。結合していないペプチドを洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。洗浄緩衝液におけるH1.0K180me2抗体の連続希釈液を標準液として創出した (1:25000、1:50000、1:100000、1:200000、1:400000、

40

50

保存濃度 0.54 mg/ml)。血清試料を洗浄緩衝液中で希釈した ($1:1000$)。
 $100 \mu\text{L}$ の標準液および試料を二連でウェルに添加した。穏やかに振盪しながらウェルを室温で1時間インキュベートした。結合していない標準液または試料を洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。HRPにコンジュゲートした二次抗体 (抗IgG二次抗体または抗IgM二次抗体のいずれか) を洗浄緩衝液中で希釈した ($1:1000$) (血清試料として、ヤギ-抗ヒト-HRP、BioRad 1721050 ; 標準液として、ヤギ-抗ウサギ-HRP、BioRad 1706515)。 $100 \mu\text{L}$ の二次抗体希釈液をウェルに添加した。穏やかに振盪しながらウェルを室温で1時間インキュベートした。結合していない二次抗体を洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。 $100 \mu\text{L}$ のTMB溶液 (PeproTech) を各ウェルに添加し、穏やかに振盪しながら室温で15分間インキュベートした。 $100 \mu\text{L}$ のストップ溶液 (0.18 M の H_2SO_4) を各ウェルに添加し、穏やかに振盪しながら室温で5分間インキュベートした。酸化すると、TMBは、 650 nm で分光光度的に測定される可能性がある水溶性の青色反応生成物を形成する。ストップ溶液で酸性化すると、反応生成物は、 450 nm に吸光度のピークを有する黄色となる。各ウェルの吸光度をプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 450 nm で測定した。各試料中の H1.0K180me2 IgG または IgM の濃度は、標準曲線から外挿法によって決定し、以下にさらに記載した。図14Cは、体液中の自己抗 H1.0K180me2 IgM レベルの間接的検出に対するELISAの使用を示す。

10

【0348】

20

図5Aは体液試料中の H1.0K180me2 ペプチドエピトープの直接的検出に対するサンドイッチELISAの使用を示す。一般的に、 H1.0K180me2 エピトープに特異的な抗体が提供され、マイクロプレートに固定されている (コーティングされている)。定量化のために H1.0K180me2 エピトープを含有する臨床試料が提供される。試料をマイクロプレートに添加し、 H1.0K180me2 エピトープは固定した抗体に結合する。結合していない材料を洗い流す。次いで、検出抗体、例えば、HRPまたは任意の他の標識抗体を添加する。これらの検出抗体は捕捉エピトープに結合する。結合していない検出抗体を洗い流す。検出基質溶液を添加し、フルオロフォアまたは色の変化を測定する。次いで、これを、標準曲線に対して定量化し、臨床試料中の H1.0K180me2 エピトープのレベルを報告する。

30

【0349】

図5Bは、 H1.0K180me2 抗原のサンドイッチELISA試験に対する標準曲線を示す。 *in vitro* でメチル化された全長 H1.0K180me2 を、 50 ng/ml から 3.125 ng/ml の2倍希釈系列の標準として使用した。標準濃度を 450 nm で測定したO.D.に対してプロットする。線形の傾向線は、検出限界を超える点の間でプロットし、直線の方程式を計算した (プロットで示される)。挿入は生データを示す。ELISAは二連で実施し、平均O.D.値は曲線作成のために使用した。

ウエスタンプロット

【0350】

ウエスタンプロット分析のための材料 (培養細胞または組織) を、氷冷したRIPA溶解緩衝液 (Thermo Scientific 89900) に溶解し、Covaris S2超音波処理器を使用して超音波処理した (10%のデューティーサイクル、強度5、1分当たりのパースト100、120秒)。各試料中の総タンパク質濃度を、製造業者のプロトコールに従い、Quick Start Bradford 1倍染色試薬 (BioRad、5000205) を使用して定量化した。次いで、試料をNuPAGE LDS試料ローディング緩衝液 (ThermoFisher、NP0007) およびNuPAGE試料還元緩衝液 (ThermoFisher、NP0004) と混合し、70で10分間加熱変性させた。タンパク質は、電気泳動により、4~12%のプレキャストポリアクリルアミドゲル (ThermoFisher、NP0321) 上で分離し、 $0.45 \mu\text{m}$ のニトロセルロース膜に移した。膜は、PBS-T中の5%の無脂肪乳で、室温

40

50

で30分間ブロックし、次いで、上記一次抗体で、4にて終夜、免疫プロットした。タンパク質を、上記に列挙したHRP二次抗体で、室温で1時間、続いて、製造業者の説明書を使用してECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher、32106)で検出した。ステップ間のすべての洗浄は、PBS-Tを用いた。膜は、Omega LUM-C imaging system (Gel Company)で画像化した。

免疫蛍光法

【0351】

免疫蛍光法として、細胞を培養し、チャンバースライドにおいて処理し、中性の10%のホルマリンで固定し、0.5%のTriton X-100を含有するPBSで透過処理した。洗浄後、スライドを、1%のBSAおよび4%のロバ血清を含有するPBSを使用してブロックした。洗浄後、スライドを、上記に列挙した一次抗体とインキュベートし、再度洗浄し、上記に列挙したAlexaFluor二次抗体と共にインキュベートし、DAPIを含有するスローフェードゴールド (Molecular Probes) をマウントした (核を可視化するため)。細胞は、蛍光顕微鏡法で観察し、Spotfireソフトウェア (Diagnostics Instruments) を使用する分析のためにイメージを獲得した。

スロットプロット分析

【0352】

0.5 μ lの血清試料または既知の量の合成ペプチドを200 μ lのTBS中で希釈した。次いで、試料を70にて10分間熱変性させた後、真空マニフォールドスロットプロット装置 (BioRad、1706542) を使用してニトロセルロース膜に移した。膜は、PBS-T中の5%の無脂肪乳で、室温で30分間ブロックし、次いで、上記一次抗体で、4にて終夜、免疫プロットした。タンパク質を、上記に列挙したHRP二次抗体で、室温で1時間、続いて、製造業者の説明書を使用してECL WESTERN BLOTTING SUBSTRATE (ThermoFisher、32106)で検出した。ステップ間のすべての洗浄は、PBS-Tを用いた。膜は、Omega LUM-C imaging system (Gel Company)で画像化した。次いで、各試料に対するスロットプロットバンドを、ImageJを使用して定量化した。

RNAseqの分析

【0353】

全RNAを、製造業者のプロトコールに従って、TRIzol試薬 (Invitrogen) を使用して自己複製および複製老化細胞培養試料から単離した。2種の異なるhADSC細胞株由来の試料を関連がある条件に対して一緒に合わせ、RNA HSアッセイキット (Invitrogen、Life technologies) を使用するQubit 2.0蛍光光度計で、RNA濃度を測定した。ERCC RNA Spike-In Control mix (Ambion、Life Technologies) を、品質管理分析のために全RNAに添加した。次に、rRNA枯渇をLow Input Ribominus Eukaryote System v2 (Ambion、Life technologies) を用いて実施した。cDNAライブラリーをIon total RNA-seq kit v2 (Ambion、Life technologies) を用いて構築し、Ion Xpress RNA-seq barcode (Ambion、Life technologies) を用いてバーコードを付けた。ライブラリーのサイズ分布および定量化は、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) で、DNA HSバイオアナライザーキットを用いて実施した。P1チップ (Life Technologies) を有するIon Proton Systemで、ライブラリーのシーケンシングを実施し、各ライブラリーを3回シーケンシングした。

【0354】

個々のIon Proton Systemによるシーケンシングの実行からのRN

Aseqのリードを各ライブラリーのために組み合わせた。Torrent Mapping Alignment Program (TMAP, Life technologies)を使用する参照ヒトゲノムアセンブリhg19 (GRCh37)に対して、配列リードをマッピングした。各条件に対するRNAseq実行の品質は、製造業者のウェブサイトから得られた、ERCC spike-in RNA配列の予測カウントを同じ配列にマッピングするRNAseqタグの実測カウントに対して比較することによって評価した。初期の遺伝子発現レベルは、個々のNCBI RefSeq遺伝子モデル(c)に対するエクソンにマッピングしたリードの合計として得て、あまり発現しなかった遺伝子(百万当たりのリードカウント<1)は次の分析から除去された。各ライブラリーについて、個々の遺伝子発現レベルは、各遺伝子当たりのベータ-アクチン(CTB)発現レベル(cCTB)およびエクソンの長さの合計lを使用して正規化した。ライブラリーjについて、ベータ作用正規化因子s_jは、

【数1】

$$s_j = \frac{\sum_{k=1}^n c_{ACTB,k}}{c_{ACTB,j}}$$

のように計算した。

【0355】

ライブラリーjにおける遺伝子iに対する最終正規化発現値は、

【数2】

$$e_{ij} = \frac{c_{ij} \times s_j}{l_i}$$

のように計算した。

薬物処置

【0356】

ブレオマイシン処理：細胞増殖培地に、50 μg/mlのブレオマイシン(Cayman Chemical 13877)を2時間補充し、DNA二重鎖切断を誘導した。細胞は、ブレオマイシン処理の直後に採取したか(急性DNA損傷)、またはブレオマイシン処理後3日間増殖させた(遺伝毒性ストレスに誘導される老化)。PARP-1阻害剤：細胞増殖培地に、1 μMの有効なPARP-1阻害剤AG14361(Selleckchem S2178)を下流分析に先立って24時間補充した。ラパマイシン処置：細胞増殖培地に、500 nMのラパマイシン(Cayman Chemical 11346)を下流の分析または処置に先立って24時間補充した。エベロリムス処置：細胞増殖培地に、500 nMのエベロリムス(Cayman Chemical 11597)を下流の分析または処置に先立って24時間補充した。テモゾロミド処置：細胞増殖培地に、50 μg/mlのテモゾロミド(Cayman Chemical 14163)を下流分析に先立って2時間補充した。

照射後のマウスにおけるH1.0K180me2の分析

【0357】

血液を、頬穿刺により、2頭の13カ月齢のマウスから採取し、血清を、SST Serum Separator (BD, 365956)を有するMicrotainer Tubes(登録商標)を使用して分離した。次いで、同一のマウスを7 Gyのイオン化放射線(X線の形態で)に曝露した。血液を、照射の2時間後に一方のマウスから、照射の48時間後に他方のマウスから再度抜き取った。Microtainer Tubes(登録商標)を使用して、血清を血液から再度分離した。次いで、照射前後の各マウス由来の血清を、スロットプロットおよびウエスタンプロットによって分析した。

マウスからの脂肪由来幹細胞(ADSC)の単離

【0358】

マウスの脂肪由来幹細胞を、野生型マウスから単離した。皮下または腎周囲の白色脂肪

10

20

30

40

50

組織を採取し、ハンクス緩衝塩溶液 (HBS)、3.5%のウシ血清アルブミン (BSA)、1%のコラゲナーゼ、I I型 (Sigma) 中に、1:3 w/vの比で懸濁させ、37 で50分間振盪した。細胞を、70 μ mメッシュの細胞ストレーナー (BD Falcon 番号352350) を通して濾過し、赤血球溶解緩衝液 (150 mMのNH₄Cl、10 mMのKHCO₃、0.1 mMのEDTA、pH 7.3) で処理し、DMEM/F12完全培地 (DMEM/F12、10%のFBS、100 U/mlのペニシリン、100 μ g/mlのストレプトマイシン、2.5 μ g/mlのアンホテリシンB; Invitrogen) 中、10%のCO₂にて37 でex vivoに拡大し、80%のコンフルエンスで継代し、72~96時間毎に培地を変えた。次いで、細胞を、他の場所で記載されているように、ウエスタンブロット分析に使用した。

10

(実施例2)

老化におけるH1.0 K180 me2 ペプチドの発見

【0359】

自己再生 (SR) hADSCおよび複製老化 (REP-SEN) hADSCを、実施例1に記載されている方法に従って入手した。ヒストンの新たな老化に関連する翻訳後修飾 (PTM) を特定するために、SRおよびREP-SEN hADSC由来の溶解物を、図1Aの発見パイプラインに従って、M/Z Pair Tag LC-MSによって評価した。自己再生および複製老化hADSC溶解物の5回の技術的反复注入を、フルスキャン最適化設定で処理した。最適なフルスキャン定量的測定のためのクロマトグラフィーおよび機器による方法は、最適な断片化スキャンの方法と競合することが決定された。したがって、質量分析計の正確な質量および広いダイナミックレンジの能力を、データ測定の2つの別個のパスを分析に組み入れることによって利用した。第1のパスは、妥協せず、最適化したフルスキャン (MS) データを、再現性の高い定量化のために獲得することに焦点を当てた。この第1のフルスキャン定量的パスを使用して、潜在的に興味深い特徴の包含リストを作成した。次いで、包含リストを、データ試料のサブセットとして、第2のパスの間に、標的とした断片化スキャンの獲得のために使用した。図1Bに示すように、質量スペクトルによって、SR hADSCの非修飾 (AKPVKASKPKKAKPKPK (配列番号42)) ペプチドおよびREP-SEN hADSCのジメチル化 (AKPVKASKPKKAKPVK^{me2}PK (配列番号3)) ペプチドが明らかとなった。

20

30

【0360】

SRとREP-SENのhADSCの発現プロファイルを比較するRNAseq実験を、実施例1に記載されている方法に従って実行した。図2Aに示されるように、SR (黒いバー) およびREP-SEN (灰色のバー) のhADSCの両方には、ヒストンH1の6個の別個のバリエーション: H1.0、H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、およびH1.5が存在する。y軸の値は、各試料における相対的なベータ-アクチンの発現によって正規化され、各遺伝子に対するエクソンの全長によってさらに正規化された、各遺伝子に対するエクソンのマッピングされたリードの合計を表す。ヒストンH1.0は、遺伝子発現レベルで、H1の4番目に多いバリエーションであることが見出された。H1.0 mRNAは、SR hADSCにおけるH1発現全体の8%およびREP-SEN hADSCにおけるH1発現全体の14%に相当したのである。しかし、他のバリエーションと異なり、その発現は、複製老化の間一定のままである。RNAseq分析によって特定されたヒストンH1.0遺伝子に対するすべてのリードの特有のマッピングのゲノムブラウザ図 (図2B) は、REP-SEN hADSC (下のトラック) におけるよりもSR hADSC (上のトラック) において高いH1.0の発現を示した。リードカウントは、各試料の相対的なベータ-アクチン発現によって正規化した。

40

【0361】

公知のメチル化リシン残基を中心とする種々のペプチド配列のアラインメントにより、H1.0 K180の周囲のアミノ酸配列が特有であり、他のメチル化リシン残基と類似していないことが明らかとなった (図3A)。

50

(実施例3)

H1.0K180me2抗体

【0362】

H1.0K180me2抗原に特異的なポリクローナル抗体は、以下のように作製した：2頭のニュージーランドウサギを抗体産生のために免疫化した。H1.0K180me2ペプチド(ペプチド：CAKPKVKAASKPKKAKPKV(me2)PK(配列番号39))にコンジュゲートしたキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)のエマルジョンとして、注射を皮下に(SQ)投与した；コンジュゲートしたペプチド：(KLH-CAKPKVKAASKPKKAKPKV(me2)PK(配列番号77))、ここで、C末端のCは、KLHに対する共有結合による連結を生成するために、完全フロイントアジュバント(CFA)または不完全フロイントアジュバント(IFA)中で、ペプチドの配列に人工的に加えた。CFA中0.5mgの抗原を用いて、10SQ部位で、初期免疫化を実施した。6回のその後の追加免疫化を、7~8週の期間にわたって、日常的な間隔で実施した。ブースターは、4SQ部位で、IFA中0.25mgの抗原からなった。ウサギは、5週目(ウサギ1頭当たり約25mlの血液)および8週目(ウサギ1頭当たり約50mlの血液)に採血した。免疫の力価は、免疫化の前後の血液を比較することによって、ELISAを使用して評価した。次いで、抗原アフィニティークロマトグラフィーを使用して、抗体を精製した。精製に使用した抗原は、ビオチンまたはウシ血清アルブミン(BSA)がコンジュゲートしたH1.0K180me2ペプチド(ビオチン-CAKPKVKAASKPKKAKPKV(me2)PK(配列番号78))またはBSA-CAKPKVKAASKPKKAKPKV(me2)PK(配列番号79))のいずれかであった。本明細書において提供される*in vitro*メチル化方法を使用して、ペプチドをジメチル化した。

10

20

【0363】

H1.0K180me2抗体を以下のように試験した。H1.0K180me2抗体の特異性をチェックするために、K172、K174、K175、K177、またはK180でメチル化されたヒストンH1.0ペプチドを、希釈系列で真空マニフォールドスロットプロットを使用して膜に移した。次いで、H1.0K180me2抗体を使用して膜を免疫プロットし、他のメチル-リシン基との潜在的な交差反応性を特定した。H1.0K180me2抗体は、低濃度においても、H1.0K180me2に対して非常に特異的である(図3B)。H1.0K180me2抗体の特異性をさらにチェックするために、K4、K9、K27、K36またはK79でメチル化されたヒストンH3ペプチドを、希釈系列で真空マニフォールドスロットプロットを使用して膜に移した。次いで、H1.0K180me2抗体を使用して膜を免疫プロットし、他のメチル-リシン基との潜在的な交差反応性を特定した。この抗体は、分析したいずれのメチル化H3ペプチドとも交差反応性を示さなかった(図3C)。実施例1に記載した方法に従って、スロットプロット分析プロトコールを実行した。

30

【0364】

ウサギ抗H1.0K180me2 IgG抗体の特異性は、抗H1.0K180me2 IgG ELISA試験を使用して決定した。6.25pmolから781fmolの2倍希釈系列で、H1.0K180me2ペプチド、H1.0K180me1ペプチド、または非修飾ペプチドのいずれかで、ウェルをコーティングした。100ulの緩衝液中6.67fmolのウサギ抗H1.0K180me2 IgG抗体を各ウェルに添加し、抗体結合の効率をELISAによってモニターした。450nmで測定したOD.に対するペプチド量をプロットすることにより、各ペプチドに対する曲線を作成した。ELISAの生データは、2回繰り返した実験について、表と図に示す(図3D)。

40

【0365】

ウサギ抗H1.0K180me2 IgG抗体は、H1.0K180me1ペプチドよりもH1.0K180me2ペプチドに、2.7倍効率的に結合する。最適な線形範囲内で、ウサギ抗H1.0K180me2 IgG抗体1分子は、117分子のH1.0K1

50

80 me 2 ペプチドのうちの1つを認識するが、316分子のH1.0K180 me 1 ペプチドのうちの1つしか認識しない。非修飾ペプチドは、この範囲で認識されない。

【0366】

ヒストンH1バリエーションタンパク質配列のClustalW2アラインメントにより、H1.0K180は、他のH1バリエーションに存在しないアミノ酸の特有の配列に埋め込まれることが明らかとなった(図3E)。初期発見実験で特定したペプチドを灰色で強調する。3つの α -ヘリックスを含む球状ドメイン領域も示す。

(実施例4)

ELISAにおいてH1.0K180 me 2 ペプチドを使用する血清H1.0K180 me 2 IgGおよびH1.0K180 me 2 IgM自己抗体レベルの間接的検出
血清H1.0K180 me 2 IgG自己抗体の間接的検出

10

【0367】

以下の例は、血清試料中の特異的自己抗体を捕捉するためにビオチン化された治療用H1.0K180 me 2 ペプチドを使用する酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)と、それに続く、HRPにコンジュゲートされた二次抗体による検出、およびテトラメチルベンジジン(TMB)によるインキュベーションについて記載する。ストレプトアビジンでコーティングしたマイクロプレート(ThermoFisher、15501)のウェルを、洗浄緩衝液(Tris緩衝生理食塩水(25mMのTris、150mMのNaCl; pH7.6)と0.1%のBSAおよび0.05%のTween-20)で3回洗浄した。50 pmolのカスタムビオチン化H1.0K180 me 2 ペプチド(ThermoFisher)を洗浄緩衝液中で希釈し、穏やかに振盪しながら各ウェルに室温で2時間結合させた。結合していないペプチドを洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。洗浄緩衝液におけるH1.0K180 me 2 抗体の連続希釈液を標準液として創出した(1:25000、1:50000、1:100000、1:200000、1:400000、保存濃度0.54 mg/ml)。血清試料を洗浄緩衝液中で希釈した(1:1000)。100 μ Lの標準液および試料を二連でウェルに添加した。穏やかに振盪しながらウェルを室温で1時間インキュベートした。結合していない標準液または試料を洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。HRPにコンジュゲートした二次抗体(図4のステップ3に示した二次標識抗体)を洗浄緩衝液中で希釈した(1:1000)(血清試料として、ヤギ-抗ヒト-HRP、Biorad 1721050; 標準液として、ヤギ-抗ウサギ-HRP、Biorad 1706515)。100 μ Lの二次抗体希釈液をウェルに添加した。穏やかに振盪しながらウェルを室温で1時間インキュベートした。結合していない二次抗体を洗浄緩衝液で3回洗浄して洗い流した。100 μ LのTMB溶液(PeproTech)を各ウェルに添加し、穏やかに振盪しながら室温で15分間インキュベートした。100 μ Lのストップ溶液(0.18MのH₂SO₄)を各ウェルに添加し、穏やかに振盪しながら室温で5分間インキュベートした。酸化すると、TMBは、650 nmで分光光度的に測定される可能性がある水溶性の青色反応生成物を形成する。ストップ溶液で酸性化すると、反応生成物は、450 nmに吸光度のピークを有する黄色となる。各ウェルの吸光度をプレートリーダー(Molecular Devices)を用いて450 nmで測定した。各試料中のH1.0K180 me 2 IgGの濃度は、標準曲線から外挿法によって決定した。

20

30

40

【0368】

ELISAを使用する血清H1.0K180 me 2 IgGレベルの間接的検出は、一般的に、図4に示す。

血清H1.0K180 me 2 IgM自己抗体の間接的検出

【0369】

血清H1.0K180 me 2 IgM自己抗体の検出は、3つのステップを含んだ。試験は、市販のサンドイッチELISAキットを使用する患者の血清中の総IgMの測定(ステップ1)、それに続く、間接的ELISAアッセイを使用する同一試料中の抗H1.0K180 me 2 IgMの測定(ステップ2)を含む。最終ステップとして、抗H1.

50

0 K 1 8 0 m e 2 I g M レベルを試料中の総 I g M によって正規化した (ステップ 3) 。

【0370】

ステップ 1 : 患者の血清中の総ヒト I g M を、A f f y m e t r i x e B i o s c i e n c e から購入した市販のサンドイッチ E L I S A キット (ヒト I g M E L I S A R e a d y - S E T - G o !、パーツ番号 8 8 - 5 0 6 2 0、ロット番号 1 2 3 6 2 0 1 1 1) を使用して測定した。

【0371】

ステップ 2 : カスタマイズした間接的 E L I S A アッセイを使用する患者の血清中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M の測定。ビオチン標識した H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 捕捉ペプチドを 9 6 ウェルのストレプトアビジンをコーティングしたマイクロプレート (T h e r m o F i s h e r、1 5 5 0 1、ロット番号 Q H 2 1 8 7 0 0) にコーティングした。過剰な遊離ペプチドを洗浄緩衝液 (T r i s 緩衝生理食塩水 (2 5 m M の T r i s、1 5 0 m M の N a C l ; p H 7 . 6) と 0 . 1 % の B S A および 0 . 0 5 % の T w e e n - 2 0) で洗い流した。マイクロプレートの非特異的結合部位を d - ビオチン (V W R、9 7 0 6 1 - 4 4 4、ロット番号 1 4 0 5 C 0 8 0 ; プレート表面上の結合していないストレプトアビジンをブロックするため) を含有するブロッキング緩衝液 (T h e r m o S c i e n t i f i c、3 7 5 3 6、ロット番号 Q J 2 2 2 1 9 1) を使用してブロックし、バックグラウンドノイズを低減した。希釈した患者の血清を、三連でマイクロプレートウェルに添加した。患者の試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 自己抗体は、プレート表面の捕捉ペプチドを認識し、結合した。並行して、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G 抗体標準液の希釈系列を同一のプレートで処理した。次いで、ウェルを洗浄緩衝液で洗浄し、結合していない試料または標準液を除去した。次いで、結合した抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M 自己抗体は、各試料ウェルに添加した抗 I g M H R P 検出抗体 (図 4、ステップ 3 に示される二次標識抗体 ; ウサギ抗ヒト I g M (M u 鎖) (H R P コンジュゲート) (A b c a m、a b 9 7 2 1 0、ロット番号 G R 1 6 9 2 2 7 - 1 0)) を使用して検出した。標準液は、各標準液ウェルに添加した抗 I g G H R P 検出抗体 (ヤギ抗ウサギ I g G (H + L) (H R P コンジュゲート) (B i o R a d、1 7 0 6 5 1 5、ロット番号 3 5 0 0 0 3 0 8 0)) を使用して検出した。次いで、過剰な、結合していない検出抗体を洗浄緩衝液で洗い流した。次いで、結合した H R P の活性を、テトラメチルベンジジン (T M B) 基質 (K P L、5 2 - 0 0 - 0 1、ロット番号 1 0 1 6 4 3 3 6) をウェルに添加することによって決定した。この反応は、ストップ溶液 (0 . 1 8 M の H₂ S O₄) (K P L、5 0 - 8 5 - 0 4、ロット番号 1 0 1 6 4 3 2 8) を添加して停止させ、ウェルの内容物の吸光度を 4 5 0 n m で読み取った。吸光度は、試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M の濃度に直接比例する。次いで、各試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M のモル濃度を、標準曲線からの外挿法および最初の希釈係数による乗算によって決定した。

【0372】

標準曲線は、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ウサギポリクローナル I g G 抗体を利用した。この抗体は、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 に非常に特異的であることを確認した。この抗体は、H 1 . 0 の任意の他のリシンのメチル化を認識せず、メチル化の程度に特異的であり、例えば、リシン K 1 8 0 のモノ (m e 1)、ジ (m e 2)、およびトリ (m e 3) の間を識別することができる (図 3 A)。この抗体は、他の一般のヒストンタンパク質のメチル化部位と交差反応しない (図 3 A)。標準曲線は、固定濃度のビオチン化エピトープ (合成ペプチド A K P V K A S K P K K A K P V K^{m e 2} P K (配列番号 3)) または固定量の二次抗 I g M 抗体をそれぞれ用いて、この抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G の希釈系列 (7 2、3 6、1 8、1 2、9、4 . 5 f m o l / m l) または総 I g M 抗体の希釈系列 (5 5 6、4 4 4、2 2 2、1 1 1、5 6、2 8、1 8 または 0 f m o l / m l) から作成した。各試料中の抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M のモル濃度は、抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g G のモル濃度の曲線から推測した。

【0373】

ステップ3：総IgM血清濃度による抗H1.0K180me2 IgM血清濃度の正規化。患者の血清中の総IgMの測定を三連で実施した。次いで、各試料中の総IgM濃度の平均を3回の繰り返しから計算した。患者の血清中の抗H1.0K180me2 IgMの測定を三連で実施した。次いで、各試料中の抗H1.0K180me2 IgM濃度の平均を3回の繰り返しから計算した。最終試験値を得るために、抗H1.0K180me2 IgM濃度の平均を、各患者の試料に対する総IgM濃度の平均で割った。

【数3】

$$\text{試験値} = \frac{\text{抗H1.0K180me2の濃度}}{\text{総IgM濃度}}$$

10

【0374】

ELISAを使用する血清H1.0K180me2 IgMレベルの間接的検出は、一般的に、図4に示す。

患者の血清中の抗H1.0（非修飾H1.0）IgMレベルの測定

【0375】

手順は、抗H1.0K180me2 IgMに対する間接的ELISAと同一であったが、捕捉ペプチドは異なった。この場合には、ペプチドは、K180me2を欠く非修飾ペプチド（非修飾H1.0）であった。また、使用した標準物質は、非修飾ペプチドに対して生じたウサギポリクローナルIgGであった（図16B、右のパネル）。

（実施例5）

20

H1.0K180me2抗体の使用は、H1.0K180me2が急性DNA損傷に関連することを示す

【0376】

図6は、実施例1に記載した方法に従って、H1.0mRNAの発現が、DNA損傷および遺伝毒性ストレスに誘導される老化後に増加することを示す。ヒストンH1.0のmRNA発現のRT-PCR分析を、自己複製hADSC、プレオマイシンで2時間処理したhADSC（急性DNA損傷）およびプレオマイシンで処理して3日間老化させたhADSC（遺伝毒性ストレスに誘導される老化）に由来する総RNAに関して実施した。H1.0mRNA発現は、急性DNA損傷後に2倍を超えて増加し、遺伝毒性ストレスに誘導される老化後、高いままである（SRに対して1.5倍）。

30

【0377】

H1.0K180のメチル化とDNA損傷の関係の評価するために、DNA損傷剤であるプレオマイシンで2時間処理した（実施例1に記載した方法に従って）SR hADSCおよびhADSCを溶解させ、分画して、クロマチン結合画分を得た。H1.0K180me2抗体を用いるウエスタンブロット分析（実施例1に記載した方法に従って実施した）は、DNA損傷の際のクロマチンのH1.0K180のメチル化を示す（図7A）。DNAの二重鎖切断を誘導するプレオマイシンによるSR hADSCの処理に際して（実施例1に記載した方法に従って）、H1.0K180me2は細胞質に局在した。

【0378】

40

スロットブロットイムノアッセイにより、H1.0K180me2の存在が、プレオマイシンによって課された遺伝毒性傷害の後に、時間経過に依存する様式で、hADSCの馴化培地中で検出されたことが見出され、H1.0K180me2の分泌の最大値は48時間以内に検出された（図7B）。これは、細胞からの分泌を示す。GSI-SENに関するDNA断片化因子（DFFB/DF40/CAD）の分泌の増加は、処置の48時間後に開始するH1.0K180me2と同様の様式で見られた（図7B）。タンパク質は、急性DNA損傷（ADD）の発生に際して、測定可能な量で分泌されない。

（実施例6）

H1.0K180のメチル化は、DNA損傷修復経路のタンパク質PARP-1活性と無関係であり、その上流で生じる

50

【0379】

H1.0K180のメチル化がDNA損傷修復経路のタンパク質PARP-1活性に依存するかどうかをさらに評価するために、実施例1に記載した方法に従ってウエスタンブロット分析を実施し、プレオマイシンによる処理の際のクロマチン結合H1.0K180me2およびH2A.Xを調査した。DNA損傷応答経路の早期プレーヤーであるPARP-1は、実施例1に記載した方法に従って、有効な阻害剤であるAG14361を使用して阻害された。図8Aに示すように、H1.0K180me2はDNA損傷の際にクロマチンに出現し、その出現はPARP-1活性とは無関係であった。実際に、PARP-1の阻害は、H1.0K180me2およびH2A.Xの蓄積の増加をもたらした(図8A)。細胞溶解物全体におけるPARP-1阻害活性のウエスタンブロット分析により、プレオマイシンによる処理に際し、PARP-1活性は細胞内のポリ-(ADP)-リボース(PAR)レベルの上昇をもたらしたことが明らかになり、これはPARP-1阻害剤により消失し、効率的なPARP-1阻害を示唆した(図8B)。したがって、H1.0K180のメチル化は、DNA損傷修復経路のタンパク質PARP-1活性と無関係であることが決定された。

10

(実施例7)

H1.0K180me2抗体の使用は、遺伝毒性ストレスに誘導される老化に際して、H1.0K180me2がクロマチンから放出され、細胞外マトリックスへと分泌されることを示す

20

【0380】

SRhADSC、プレオマイシンで2時間処理したhADSC(急性DNA損傷)およびプレオマイシンで処理して3日間老化させたhADSC(遺伝毒性ストレスに誘導される老化)を溶解させ、可溶性およびクロマチン結合画分に分離した。次いで、これらの画分をLC-MS/MS分析に供した。ペプチドの発現レベルは、LC-MS/MSの相対強度曲線下の総面積として得て、個々のペプチドは、Pinpointソフトウェア、バージョン1.4(Thermo Scientific)を使用してタンパク質へと明確に割り当てた。個々のタンパク質に割り当てたすべてのペプチドの面積を合計して、タンパク質発現レベルを得て、これを、各試料に対する総タンパク質ライブラリーサイズに対して正規化した。各細胞画分に対して、H1.0ペプチドの存在量を、各条件で観察された総H1.0ペプチドのパーセンテージとして表す。各画分におけるH1.0ペプチドレベルの正規化した絶対値も示した。図9Aに示すように、クロマチンに結合したH1.0は、SRおよび急性DNA損傷における合計の約60%から遺伝毒性ストレスに誘導される老化の際の合計の約30%まで低下した。プレオマイシンで処理したSRhADSC由来の培養培地を、-H1.0および-H1.0K180me2抗体を用いるスロットブロット分析のために採取して、H1.0の細胞外マトリックス(ECM)への分泌を評価した。実施例1に記載した方法に従って、実験を実行した。分泌されたH1.0は、細胞培養培地中で検出可能であり、プレオマイシン処理の24時間後に、分泌されたH1.0K180me2も容易に検出された(図9B)。これらの結果により、メチル化H1.0K180は、遺伝毒性ストレスに誘導される老化の際にクロマチンから放出され、ECMへと分泌されることが確認された。

30

40

(実施例8)

H1.0K180me2抗体の使用はイオン化放射線への曝露が血清中のH1.0K180me2のレベルの上昇を誘導することを示す

【0381】

血清中のH1.0K180me2レベルに関するイオン化放射線の効果を調査した。実施例1に記載した方法に従って、7Gyのイオン化放射線への曝露前および2時間後または48時間後のいずれかに、血清を野生型マウスから採取した。照射の2時間後(マウス1)または48時間後(マウス2)のH1.0K180me2の血清レベルを、-H1.0K180me2抗体を用いるスロットブロットおよび免疫ブロットを使用して処置前の初期レベルと比較した(図10A)。各血清試料中のH1.0K180me2の濃度を

50

、各分析に含まれる H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドの標準曲線を使用して計算した。ロージング対照としてマウス血清アルブミンを使用した。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 のドットプロットバンドを定量化し、血清アルブミンによって正規化した。照射後の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の相対的増加を示す (図 1 0 B) 。 - H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体を有するマウス血清の等しい体積のウエスタンブロット分析により、照射後の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の増加も示された (図 1 0 C) 。

(実施例 9)

H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗体および標識した H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 ペプチドの使用は、脳および血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルがアルツハイマー病の指標であることを示す

10

【 0 3 8 2 】

1 カ月 (若 齢) および 2 4 カ月 (老 齢) のマウス由来のマウス脳試料の細胞溶解物全体を、実施例 1 に記載した方法に従って、 - H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 、 - H 1 . 0 、 - H 2 A . X および - アクチン抗体を用いるウエスタンブロット分析によって比較した。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルは、2 4 カ月のマウスで上昇し、H 2 A . X レベルの上昇と相関した (図 1 1 A) 。

【 0 3 8 3 】

さらなる研究をヒトの臨床試料で実行した。

【 0 3 8 4 】

C o o p e r a t i v e H u m a n T i s s u e N e t w o r k (C H T N) および N u c l e a B i o t e c h n o l o g i e s (N C B) からヒト血清を入手した。血清は 3 つの群に由来した：1) 重要な医学的状態を有さない中年の健康なドナー (n = 7 、年齢の範囲 = 3 2 ~ 3 8 歳) 2) 重要な医学的状態を有さない老齢の健康なドナー (n = 9 、年齢の範囲 = 6 3 ~ 7 6 歳) 3) 臨床的に診断されたアルツハイマー病を有する老齢ドナー (n = 1 0 、年齢の範囲 = 7 5 ~ 1 0 3 歳) 。各ドナーのさらなる詳細は表 4 にある。

20

【表 4】

表 4:組織ドナーの特性

試料タイプ	年齢	性別	人種	患者の診断
脳	23	女性	白人	正常
脳	60	女性	白人	正常
脳	73	女性	白人	正常
脳	77	女性	白人	正常
血清	32	女性	白人	正常
血清	32	女性	黒人	正常
血清	32	男性	黒人	正常
血清	36	女性	白人	正常
血清	36	男性	白人	正常
血清	37	男性	黒人	正常
血清	38	男性	白人	正常
血清	63	女性	白人	正常
血清	66	女性	白人	正常
血清	67	女性	白人	正常
血清	70	女性	白人	正常
血清	70	女性	白人	正常
血清	70	女性	白人	正常
血清	73	女性	黒人	正常
血清	74	女性	白人	正常
血清	76	女性	白人	正常
血清	83	男性	黒人	アルツハイマー病
血清	103	男性	白人	アルツハイマー病
血清	94	女性	白人	アルツハイマー病
血清	77	男性	黒人	アルツハイマー病
血清	78	女性	黒人	アルツハイマー病
血清	78	男性	白人	アルツハイマー病
血清	75	女性	白人	アルツハイマー病
血清	91	女性	黒人	アルツハイマー病
血清	93	女性	黒人	アルツハイマー病
血清	90	女性	黒人	アルツハイマー病

10

20

30

40

【0385】

23歳(若齢)および/または60歳を超える(老齢)健康な個体由来のヒト脳試料の細胞溶解物全体も、上述の抗体および方法を用いてウエスタンブロットにより分析した。表4は、脳組織ドナーの特性を提供する。図11Bに示すように、年齢の高い個体はH1.0K180me2の発現の増加を示す。これらの結果は、生物年齢と共にH1.0K180me2が増加することを示した。

【0386】

この研究の目的は、アルツハイマー病の予測性能のバイオマーカーとしての、血清H1.0K180me2の測定値および/またはH1.0K180me2に対する血清抗体の測定値の有用性を実証することであった。新たな診断バイオマーカーの正しい予測能を保

50

証するために、患者の階層化方法を開発し、その診断精度について試験した。試験の性能は、登録された参照標準（例えば、ADの確定診断のために、アメリカ国立老化研究所（National Institute of Aging）-アルツハイマー病協会（Alzheimer's Association）（NIA-AA）によって推奨されるいくつかの試験の組合せ）と比較することによって評価した。この研究は、Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy（STAR-D）に従って設計し、実行した。統計分析は、診断精度パラメーター、交差検定、およびYouden指数の最適化を含んだ。患者の階層化戦略に従い、かつ分析の予測力を用いて、患者は、アルツハイマー病の発症の可能性を有する患者のカテゴリーとして階層化されうる。感度、特異性、陽性および陰性適中率（PPVおよびNPV）ならびに陽性および陰性尤度比（PLRおよびNLR）を各試験設計について示す。図12A～12C、図13B、図14B、図14E、図15Aおよび図15Bにおいて、ボックスプロットの中心線はメジアンを示し；ボックスの端はRソフトウェアにより決定した25および75パーセンタイルを示し；ひげは25および75パーセンタイルから四分位範囲の1.5倍伸び、外れ値はドットで表し；データ点を白丸でプロットする。破線は、ROC曲線（受診者動作特性曲線）分析によって計算される閾値を示す。感度、特異性、陽性および陰性適中率（PPVおよびNPV）ならびに陽性および陰性尤度比（PLRおよびNLR）を各試験設計について示す。統計方法は、患者の疾患の有無を予測する助けとなる。試験結果が疾患の試験前の確率を修正する程度は、ベイズの定理に基づく「尤度比」によって表現される。陽性尤度比（PLR）は、試験が陽性である場合、疾患の確率がどの程度増加するかを表す。陰性尤度比（NLR）は、試験が陰性である場合、疾患の確率がどの程度低下するかを表す。PLRが1より大きいことは、標的障害が存在する確率の増加を示し、PLRが1より小さいことは、標的障害が存在する確率の低下を示し、PLRが1であることは、試験によって疾患の確率が変化しないことを意味する。ROC曲線、閾値および曲線下面積（AUC）は、試験設計のそれぞれに対して示される。2×2マトリックス（TP、FN、FP、TN）における0という値は、比の計算を不可能にする可能性がある。これを制御するために0.5の「疑似カウント」を加えた。「疑似カウント」はどの値にも加えるため、相対値に影響を与えない。図12A～12C、図13B、図14B、図14E、図15Aおよび図15Bのボックスプロットの中心線はメジアンを示し；ボックスの端はRソフトウェアにより決定した25および75パーセンタイルを示し；ひげは25および75パーセンタイルから四分位範囲の1.5倍伸び、外れ値はドットで表し；データ点を白丸でプロットする。

10

20

30

【0387】

H1.0K180me2レベルがアルツハイマー病の診断指標としての役割を果たすことができるかどうかを試験するために、ヒト血清中のH1.0K180me2レベルを、実施例1に記載した方法に従って、H1.0K180me2抗体を使用するスロットプロット分析によって定量化した。30～40歳の（n=7）または60歳を超える（n=9）健康な個体、および臨床的に診断されたアルツハイマー病を有する60歳を超える個体（n=10）由来の等しい体積の血清を分析した（表4は血清ドナーの特性を提供する）。

40

H1.0K180me2レベル

【0388】

図12A～Cは、ヒト血清におけるH1.0K180me2抗原の検出（図12A、12B、12C）、天然に存在するH1.0K180me2 IgG自己抗体の検出（図13B）、および天然に存在するH1.0K180me2 IgM自己抗体の検出（図14A～E、図15A～B）が、アルツハイマー病の早期診断に対するツールとして作用する可能性があることを示す。

【0389】

図12Aは、アルツハイマー病患者および年齢を一致させた対照における、スロットプロット分析によって決定したH1.0K180me2レベルの定量化を示す。H1.0K

50

180 me 2 レベルの定量化は、アルツハイマー病患者および年齢を一致させた対照においてスロットプロット分析によって決定した。各血清試料中の H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 の濃度を、各分析に含まれる H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 ペプチドの標準曲線を使用して計算した。図 1 2 A に示すように、アルツハイマー病患者は、健康な、年齢を一致させた対照よりも血清 H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 の低い濃度を示し、H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 の血清濃度は、健康な個体からアルツハイマー病を有する患者を有効に分離する可能性があり、アルツハイマー病検出の診断ツールとして作用できることを示した。表 5 に示すように、5 . 6 1 n m o l / m l またはそれ未満の血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 抗原の濃度の測定値は、試験前の確率と比較して、24% の可能性で疾患の存在を示し、陽性尤度比 (P L R または L R +) は 3 . 6 である。試験後の確率は、以下の式に基づいて計算される：試験前オッズ × L R / (1 + 試験前オッズ × L R) (式中、試験前オッズは、試験前の疾患の存在の臨床上的疑いである)。試験後の確率は、通常、Likelihood Ratio Nomogram または Fagan Nomogram (NEJM 1975 年 ; 29 3 巻 : 257 頁) から計算される。

【表 5】

表5: 血清体積によって正規化した H1. 0K180me2 抗原濃度

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	5.61	
感度	80%	[56% , 100%]
特異性	78%	[40% , 100%]
PPV	80%	[69% , 100%]
NPV	78%	[60% , 100%]
LR+	3.60	[2.03 , 17.27]
LR-	0.26	[0.00 , 0.60]
ln(OR)	2.64	[0.43 , 4.85]

【 0 3 9 0 】

図 1 2 B は、総 I g G 血清レベルによって正規化したヒト血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 レベルを示す。ヒト血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 レベルを総 I g G 血清レベルによって正規化するために、総 I g G レベルを、ヤギ抗ヒト I g G 二次抗体を使用して、各血清試料についてスロットプロット分析によって決定した。H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 の濃度は、各試料において実測した I g G レベルによって正規化した。図 1 2 B において示すように、H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 レベルは、健康な若齢個体 (3 0 ~ 4 0 歳) に対して、健康な 6 0 歳を超える個体で上昇したが、アルツハイマー病を有する患者は、健康な老齢個体 (6 0 歳を超える) に対して、有意に低い H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 の正規化レベルを示す。箱グラフの左の部分は、前駆アルツハイマー病の診断または軽度認知障害 (M C I) を有さない患者である。箱グラフの右の部分は、アルツハイマー病病理の死亡後の確認を有する患者を示す。表 6 は、R O C 分析に由来する値を示す。

【表 6】

表6:総IgG濃度によって正規化したH1. 0K180me2抗原濃度

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	0.98	
感度	90%	[87% , 100%]
特異性	89%	[70% , 100%]
PPV	90%	[73% , 100%]
NPV	89%	[70% , 100%]
LR+	8.10	[2.40 , 19.09]
LR-	0.11	[0.00 , 0.39]
ln(OR)	4.28	[1.35 , 7.21]

10

20

【 0 3 9 1 】

図 1 2 C は、総タンパク質レベルによって正規化したヒト血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルを示す。ヒト血清中の H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルを総タンパク質レベルによって正規化するために、Q u b i t (I n v i t r o g e n) を使用して、各試料について、総血清タンパク質を測定した。次いで、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の濃度を、各試料中の測定したタンパク質濃度によって正規化した。図 1 2 C に示すように、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 レベルは、健康な 6 0 歳を超える老齢個体で上昇したが、アルツハイマー病を有する患者は、健康な老齢個体 (6 0 歳を超える) に対して、有意に低い H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 の正規化レベルを示した。図 1 2 C は、血清の総タンパク質組成に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の血清学的定量化を示す。表 7 は、 $4 . 7 6 \times 1 0 ^ { - 4}$ 未満の血清中の総タンパク質に対する H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 抗原の比が、試験前の確率と比較して、2 4 . 8 % の可能性で疾患の存在を示し、P L R は 3 . 0 0 である。

30

【表 7】

表7:総タンパク質によって正規化したH1. 0K180me2抗原濃度

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	4.76 x10 ⁻⁴	
感度	90%	[88% , 100%]
特異性	70%	[35% , 93%]
PPV	75%	[43% , 93%]
NPV	88%	[47% , 99%]
LR+	3.08	[1.14 , 7.81]
LR-	0.14	[0.02 , 0.93]
ln(OR)	3.04	[0.57 , 5.51]

10

20

【 0 3 9 2 】

H1. 0K180me2の血清濃度は、アルツハイマー病患者の特定に十分であるが、総IgG(図12B)または総タンパク質(図12C)による血清試料の正規化の使用は、血清を得るために使用されるプロトコール、操作者の変化、患者の水分補給状態および患者の活動状態などの、全体の血清濃度を変える可能性がある変数にかかわらず、個体間の直接的な比較を可能とする。IgGはヒト血清中に非常に豊富に存在し、血清タンパク質の約11%に相当する。したがって、IgGは、血清濃度の指標として作用することができ、患者間を正規化するために使用されてもよい。総血清タンパク質は、血清濃度の直接的指標を与え、患者間のH1. 0K180me2の濃度を正規化するために使用されてもよい。それぞれの例では、正規化したH1. 0K180me2レベルが、健康に老化すると(60歳を超える)増加することが観察された。アルツハイマー病の血清H1. 0K180me2レベルは、年齢を一致させた対照よりも有意に低く、通常の正規化手順を用いると、観察される傾向は変わらないが、血清採取および処理の手順、または患者の血清の基礎濃度レベルの差異にかかわらず、患者間のH1. 0K180me2レベルの直接的な比較が可能となることが示された。

30

抗H1. 0K180me2 IgG(H1. 0K180me2 IgG自己抗体)レベル

【 0 3 9 3 】

図13Aは、ヒト抗H1. 0K180me2 IgGが、間接的ELISA法を使用して様々なヒトの生体液中で検出される可能性があることを示す。ヒトの血漿、尿、および唾液は、それぞれ、間接的ELISA試験および標識したH1. 0K180me2ペプチドを使用して、H1. 0K180me2 IgG自己抗体に対して試験した。血漿濃度と450nmで測定したO.D.の間の線形関係を、血漿をローディング緩衝液中で500倍、1000倍、および2000倍に希釈した際に検出した。同様に、尿および唾液の濃度と450nmで測定したO.D.の間の線形関係を、これらの流体をローディング緩衝液中で80倍および160倍に希釈した際に検出した。このことは、抗H1. 0K180me2 IgGの間接的ELISA試験が多様なヒトの生体液中の抗H1. 0K180me2 IgGを検出する有用性を有することを示唆する。

40

50

【0394】

関連する実験では、ヒト血清中の抗H1.0K180me2 IgGレベルを、ビオチン化H1.0K180me2捕捉ペプチド(H1.0K180me2自己抗体結合ペプチド)、続いて、IgG自己抗体に特異的な二次抗体を使用する間接的ELISA分析によって定量化した。30~40歳の(n=7)または60歳を超える(n=9)健康な個体、および60歳を超える、臨床的に診断されたアルツハイマー病を有する個体(n=10)由来の等しい体積の血清を分析した(図13B)。

【0395】

図13Bは、アルツハイマー病患者および年齢を一致させた対照における間接的ELISAによって決定した自己抗H1.0K180me2 IgGレベルの定量化を示す。各血清試料中の抗H1.0K180me2 IgGの濃度(間接的ELISAによって決定した自己抗体IgGレベル)を、図12Eに示すELISA実験に含まれるH1.0K180me2特異的抗体の連続希釈により作成した標準曲線を使用して計算した。アルツハイマー病患者は、健康な、年齢を一致させた対照よりも血清抗H1.0K180me2 IgGの高い濃度を示す。抗H1.0K180me2 IgGの血清濃度は、健康な個体からアルツハイマー病を有する患者を有効に分離する可能性があり、アルツハイマー病検出の診断ツールとして作用できる。表8に示すように、8.23ug/mlに等しいまたはそれより高い濃度の自己抗H1.0K180me2抗体の測定値は、試験前の確率と比較して、30%の可能性で疾患の存在を示し、PLRは5.4である。図13Bは、ヒト血清中のH1.0K180me2自己抗体の定量化のための標準曲線を示す。総血清タンパク質は、ブラッドフォードアッセイを使用して各試料について測定した。抗H1.0K180me2 IgG濃度は、各試料中の測定したタンパク質濃度によって正規化した。抗H1.0K180me2 IgGレベルは、健康な若齢個体(30~40歳)に対して、健康な60歳を超える個体で低下する。アルツハイマー病を有する患者は、健康な老齢個体(60歳を超える)に対して、抗H1.0K180me2 IgGの正規化レベルの上昇を示す。

10

20

【表 8】

表8:血清体積によって正規化した抗H1. 0K180me2 IgG濃度

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	8.23	
感度	80%	[33% , 100%]
特異性	67%	[50% , 100%]
PPV	73%	[63% , 100%]
NPV	75%	[62% , 100%]
LR+	2.40	[1.50 , 15.45]
LR-	0.30	[0.00 , 0.56]
In(OR)	2.08	[0.00 , 4.16]

10

20

抗H1. 0K180me2 IgM (H1. 0K180me2 IgM自己抗体) レベル
【0396】

別の関連する実験では、ヒト血清中の抗H1. 0K180me2 IgMレベルを、ビオチン化H1. 0K180me2 捕捉ペプチド (H1. 0K180me2 自己抗体結合ペプチド)、続いて、IgM抗体に特異的な二次抗体を使用する間接的ELISA分析によって定量化した (体積によって正規化した)。60歳を超える健康な個体 (n = 9)、および60歳を超える、臨床的に診断されたアルツハイマー病を有する個体 (n = 10) 由来の等しい体積の血清を分析した (図14Eの生データ; 図15Aの総IgMレベルに対して正規化したデータ)。

30

【0397】

以下の表9は、間接的ELISA分析に由来し、図14D~14Eでさらに分析された生データを示す。ELISAは、各患者試料について三連で実施した。抗H1. 0K180me2 IgM濃度を、図14Dに示す標準曲線から、各複製について計算した。各試料に対する抗H1. 0K180me2 IgMの濃度の平均は、3つの技術的複製から計算した。3つの技術的複製間の試料の標準偏差も計算した。複製間の実施形態の係数は、 $CV\% = \text{標準偏差} / \text{平均} \times 100\%$ として計算した。

40

【0398】

抗H1. 0K180me2の標準曲線は利用可能でなかったため、抗H1. 0K180me2 IgG抗体を使用して標準曲線を創出した (図14D)。抗H1. 0K180me2 IgGのモル濃度を、450nmでODに対してプロットした。次いで、曲線を使用して、各試料中の抗H1. 0K180me2 IgMのモル濃度を推測した。

【表 9】

表9:抗H1. OK180me2 IgMのELISAからの生データ

患者群	患者ID	患者の年齢	繰り返し1		繰り返し2		繰り返し3		抗H1.0 K180me2 IgMの平均(fmol/ml)	標準偏差	%CV
			O.D.	抗H1.0 K180me2 IgM (fmol/ml)	O.D.	抗H1.0 K180me2 IgM (fmol/ml)	O.D.	抗H1.0 K180me2 IgM (fmol/ml)			
AD	NC17	75	0.18	498.9	0.18	510.1	0.18	431.5	480.1	42.5	8.9
AD	NC14	77	0.46	1288.2	0.47	1321.9	0.47	1319.1	1309.7	18.7	1.4
AD	NC15	78	0.23	653.4	0.20	566.3	0.18	498.9	572.8	77.5	13.5
AD	NC11	83	0.13	358.4	0.10	285.4	0.11	313.5	319.1	36.8	11.5
AD	NC20	90	0.38	1063.5	0.37	1021.3	0.38	1049.4	1044.8	21.5	2.1
AD	NC18	91	0.49	1369.7	0.48	1350.0	0.36	1010.1	1243.3	202.1	16.3
AD	NC19	93	0.16	434.3	0.15	428.7	0.16	456.7	439.9	14.9	3.4
AD	NC13	94	0.19	518.5	0.18	512.9	0.19	515.7	515.7	2.8	0.5
AD	NC12	103	0.06	156.2	0.05	147.8	0.06	173.0	159.0	12.9	8.1
対照	WD-32339	63	0.06	176.8	0.05	139.3	0.08	153.4	166.2	18.4	11.8
対照	WD-32347	66	0.06	164.6	0.05	142.1	0.05	147.8	151.5	11.7	7.7
対照	WD-32398	70	0.20	557.9	0.20	569.1	0.20	566.3	564.4	5.8	1.0
対照	WD-36002	70	0.13	347.2	0.12	344.4	0.16	456.7	382.8	64.1	16.7
対照	WD-32351	70	0.12	344.4	0.11	313.5	0.12	330.3	329.4	15.5	4.7
対照	WD-36008	73	0.07	184.3	0.07	192.7	0.08	215.2	197.4	16.0	8.1
対照	WD-36010	74	0.06	161.8	0.07	184.3	0.05	142.1	162.7	21.1	13.0
対照	WD-32346	76	0.15	420.2	0.14	389.3	0.15	417.4	409.0	17.1	4.2
対照	WD-32350	66	0.15	417.4	0.16	451.1	0.20	543.8	470.8	65.5	13.9

10

【0399】

図14Eは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1. OK180me2に対するIgG自己抗体の測定値の有用性を実証する(図は生データを示す)。左のパネルは、全体的な予測性能を評価し、最適閾値のカットオフ値を選ぶために使用して、陽性および陰性の試験結果を区別するROC曲線分析を示す。各可能な閾値におけるパーセント特異性と感度の間の関係を示すようにプロットして、経験上のROC曲線(実線)を創出する。経験上のROC曲線を使用して、右のパネルに描写した最適閾値のカットオフ値を計算した。最適閾値は、経験上のROC曲線に灰色のドットとして示す。図14Eの右のパネルは、アルツハイマー病を有する患者と有さない患者(神経学的対照)の抗H1. OK180me2 IgMの濃度のボックスプロット分布を示す。すべての試料に対する個々の測定値をドットで示し、ボックスプロットは、上位四分位数、下位四分位数、ならびに上位四分位数および下位四分位数から、外れ値でない最大および最小の点までの距離と共に、それぞれの分布について示されている。閾値のカットオフ(破線)より上の試料は、試験に対して陽性であるとみなされる。閾値のカットオフより下の試料は、試験に対して陰性であるとみなされる。図14Eの下2x2のマトリックスは、分布が4つの群に分割される場合があることを示す: 真の陽性(TP; 指数が正であり、ADが存在する); 偽陽性(FP; 指数が正であるが、ADは存在しない); 真の陰性(TN; 指数が負であり、ADが存在しない); および偽陰性(FN; 指数が負であるが、ADが存在する)。各群内にある試料数を2x2マトリックスにプロットした。

20

30

【0400】

以下の表10は、抗H1. OK180me2 IgMの試験性能の評価を生データとして示す。

40

【表 10】

表10: 抗H1.0K180me2の試験性能評価

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	409	
感度	78%	[45% , 94%]
特異性	78%	[45% , 94%]
PPV	78%	[45% , 94%]
NPV	78%	[45% , 94%]
LR+	3.53	[0.98 , 12.47]
LR-	0.29	[0.08 , 1.02]
ln(OR)	2.51	[0.28 , 4.73]

10

20

【0401】

以下の表 11 は、間接的 E L I S A 分析に由来し、図 15 A、図 15 B でさらに分析された正規化データ（総 I g M レベルによって正規化した抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M）を示す。E L I S A は、各患者の試料に対して三連で実施した。抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M の濃度を、図 14 D に示す標準曲線から各複製について計算し、試料中で測定した総 I g M 濃度の平均によって正規化した（図 14 B）。各試料に対する平均の、正規化した抗 H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 I g M の濃度は、3つの技術的複製から計算した。3つの技術的複製の間の試料の標準偏差も計算した。複製間の実施形態の係数は、 $C V \% = \text{標準偏差} / \text{平均} \times 100\%$ として計算した。

30

【表 1 1】

表11:抗H1.0K180me2 IgMのELISAからの正規化データ(総IgMレベルによる)

患者群	患者 ID	患者の年齢	総IgMに対する抗H1.0K180me2 IgMの比 (x10 ⁻⁶)				標準偏差	%CV
			繰り返し 1	繰り返し 2	繰り返し 3	平均		
AD	NC17	75	87.0	89.0	75.3	83.7	7.4	8.9
AD	NC14	77	80.2	82.3	82.1	81.5	1.2	1.4
AD	NC15	78	53.6	46.4	40.9	47.0	6.3	13.5
AD	NC11	83	23.3	18.5	20.4	20.7	2.4	11.5
AD	NC20	90	32.5	31.2	32.1	31.9	0.7	2.1
AD	NC18	91	41.3	40.7	30.4	37.5	6.1	16.3
AD	NC19	93	27.4	27.0	28.8	27.7	0.9	3.4
AD	NC13	94	74.3	73.5	73.9	73.9	0.4	0.5
AD	NC12	103	4.3	4.0	4.7	4.3	0.4	8.1
対照	WD-32339	63	18.6	14.7	16.2	16.5	1.9	11.8
対照	WD-32347	66	9.6	8.3	8.6	8.8	0.7	7.7
対照	WD-32350	66	22.2	23.9	28.9	25.0	3.5	13.9
対照	WD-32398	70	23.9	24.4	24.3	24.2	0.3	1.0
対照	WD-36002	70	22.9	22.7	30.1	25.3	4.2	16.7
対照	WD-32351	70	18.8	17.1	18.0	18.0	0.8	4.7
対照	WD-36008	73	6.3	6.6	7.3	6.7	0.5	8.1
対照	WD-36010	74	10.0	11.4	8.8	10.1	1.3	13.0
対照	WD-32346	76	27.3	25.3	27.1	26.6	1.1	4.2

10

20

30

40

【0402】

図15Aは、アルツハイマー病のバイオマーカーとしてのH1.0K180me2に対するIgM自己抗体の測定値の有用性を実証する(図は正規化したデータを示す)。左のパネルは、全体的な予測性能を評価し、最適閾値のカットオフ値を選ぶために使用して、陽性および陰性の試験結果間を区別するROC曲線分析を示す。各可能な閾値におけるパーセント特異性と感度の間の関係を示すようにプロットして、経験上のROC曲線(実線)を創出する。経験上のROC曲線を使用して、右のパネルに描写した最適閾値のカットオフ値を計算した。最適閾値は、経験上のROC曲線に灰色のドットとして示す。図15Aの右のパネルは、アルツハイマー病を有する患者および有さない患者(神経学的対照)の正規化した抗H1.0K180me2 IgMの濃度のボックスプロット分布を示す。すべての試料に対する個々の測定値をドットで示し、ボックスプロットを各分布について示す。ボックスプロットは、上位四分位数、下位四分位数、ならびに上位四分位数および下位四分位数から、外れ値でない最大および最小の点までの距離と共に、中央値を示す。閾値のカットオフ(破線)より上の試料は、試験に対して陽性であるとみなされる。閾値のカットオフより下の試料は、試験に対して陰性であるとみなされる。図15Aの下に2x2のマトリックスは、分布が4つの群に分割される場合があることを示す: 真の陽性(TP; 指数が正であり、ADが存在する); 偽陽性(FP; 指数が正であるが、ADは存在しない); 真の陰性(TN; 指数が負であり、ADが存在しない); および偽陰性(FN; 指数が負であるが、ADが存在する)。各群内にある試料数を2x2マトリックスにプロットした。図15Bは、試験の特徴が、実験室の設定および異なる操作者によって変動しないことを実証する。

【0403】

以下の表12は、抗H1.0K180me2 IgM/総IgMの試験性能の評価を示す。

【表 1 2】

表 12

メトリック	値	95% 信頼区間
閾値	26.6	
感度	75%	[44% , 92%]
特異性	95%	[88% , 98%]
PPV	94%	[53% , 100%]
NPV	79%	[47% , 95%]
LR+	15.00	[0.98 , 229.3]
LR-	0.26	[0.09 , 0.78]
ln(OR)	4.04	[0.86 , 7.23]

10

20

【 0 4 0 4 】

この試験の結果は、疾患の確率を、試験前の10%から試験後の63%まで修正する。陽性尤度比(LR+)は15.0(95%CI:0.98、229)であり、陽性適中率(PPV)は94%(95%CI:53、100)である。陰性尤度比(LR-)は0.26(95%CI:0.09、0.78)であり、陰性適中率は79%(95%CI:47、95)である。

対照

【 0 4 0 5 】

図14Bは、標準曲線を示す：ヒトIgG希釈系列のモル濃度を、450nmのODに対してプロットした。次いで、曲線を使用して、各試料中の総IgMのモル濃度を外挿法により推定した。

30

【 0 4 0 6 】

以下の表13は、総IgMのELISAからのデータを示す。ELISAは、各患者の試料に対して三連で実施した。総IgMのモル濃度は、図14Bに示した標準曲線から、各複製について計算した。各試料に対する総IgMのモル濃度の平均を3つの技術的複製から計算した。3つの技術的複製の間の試料の標準偏差も計算した。複製間の実施形態の係数は、 $CV\% = \text{標準偏差} / \text{平均} \times 100\%$ として計算した。

【表 1 3】

表13:ELISAアッセイを使用する患者の血清中総IgMレベルの測定

患者群	患者ID	患者の年齢	繰り返し1		繰り返し2		繰り返し3		総IgMの平均 (nmol/ml)	標準偏差	%CV
			O.D.	総IgM (nmol/ml)	O.D.	総IgM (nmol/ml)	O.D.	総IgM (nmol/ml)			
AD	NC17	75	0.11	5.9	0.11	5.3	0.11	5.9	5.7	0.3	6.0
AD	NC14	77	0.22	13.2	0.31	18.7	0.27	16.3	16.1	2.7	17.1
AD	NC15	78	0.21	12.5	0.22	12.8	0.20	11.3	12.2	0.8	6.3
AD	NC11	83	0.26	15.7	0.25	15.3	0.25	15.2	15.4	0.3	1.9
AD	NC20	90	0.51	32.6	0.52	32.7	0.52	32.8	32.7	0.1	0.3
AD	NC18	91	0.51	32.1	0.52	33.1	0.54	34.3	33.2	1.1	3.2
AD	NC19	93	0.27	16.4	0.26	15.7	0.26	15.5	15.9	0.5	2.9
AD	NC13	94	0.12	6.4	0.15	8.1	0.12	6.5	7.0	0.9	13.5
AD	NC12	103	0.65	41.4	0.53	33.7	0.55	35.1	36.7	4.1	11.2
対照	WD-32339	63	0.17	9.8	0.17	9.4	0.16	9.2	9.5	0.3	3.2
対照	WD-32347	66	0.27	16.6	0.29	17.3	0.29	17.5	17.2	0.5	2.9
対照	WD-32398	70	0.38	23.3	0.37	23.1	0.38	23.6	23.3	0.3	1.1
対照	WD-36002	70	0.25	15.1	0.25	15.2	0.25	15.1	15.2	0.0	0.3
対照	WD-32351	70	0.29	17.9	0.31	18.9	0.30	18.2	18.3	0.4	2.4
対照	WD-36008	73	0.46	29.1	0.48	30.4	0.46	28.7	29.4	0.9	3.1
対照	WD-36010	74	0.27	16.5	0.26	15.9	0.27	16.1	16.2	0.3	1.9
対照	WD-32346	76	0.25	14.7	0.27	16.1	0.26	15.4	15.4	0.7	4.8
対照	WD-32350	66	0.29	17.4	0.31	18.8	0.33	20.3	18.8	1.5	7.8

10

【0407】

図14Bは、総IgMレベルが、アルツハイマー病を有する個体と有さない個体を識別しないことを実証する。すべての試料に対する個々の測定値をドットで示し、ボックスプロットは各分布について示す。ボックスプロットは、上位四分位数、下位四分位数、ならびに上位四分位数および下位四分位数から、外れ値でない最大および最小の点までの距離と共に、中央値を示す。

20

【0408】

図16Aは、患者の試料中の総IgMレベルと抗H1.0K180me2 IgMレベルの間に相関がないことを実証する。すべての患者の試料を、測定した総IgM濃度に対する測定した抗H1.0K180me2 IgM濃度に基づく散布図に分布させた。抗H1.0K180me2 IgMレベルは、低いR²値によって証明されるように、患者の血清中の総IgMレベルに影響されない。

30

【0409】

図16Bは、総非修飾H1.0タンパク質レベル(左のグラフ)と総抗H1.0 IgMレベルがアルツハイマー病を有する個体と有さない個体を識別しないことを実証する。左のパネルでは、カスタム化学発光スロットプロットイムノアッセイを使用して、アルツハイマー病および対照患者の血清試料における総H1.0(非修飾)レベルを測定した。右のパネルでは、間接的ELISAを使用して、患者の血清中のH1.0の非修飾ペプチドに対するIgM自己抗体を測定した。非修飾H1.0ペプチドに対するIgM自己抗体のレベルに統計的に有意な差は存在せず(p=0.72)、アルツハイマー病に対する診断の有用性が、患者の血清中の抗H1.0K180me2 IgMに特有であることを示した。すべての試料に対して、両方のパネルに対する相対的な測定値をドットで示し、ボックスプロットは各分布について示す。ボックスプロットは、上位四分位数、下位四分位数、ならびに上位四分位数および下位四分位数から、外れ値でない最大および最小の点までの距離と共に、中央値を示す。

40

抗H1.0K180me2 IgGおよびIgMレベルの相関

【0410】

図17は、H1.0K180me2 IgGおよびIgM自己抗体を測定することにより、アルツハイマー病を有する患者を別個の集団へと階層化できることを実証する。抗H1.0K180me2 IgGレベルをアルツハイマー病患者の試料中で測定し、これらを総IgGレベルによって正規化した。次いで、散布図によって、アルツハイマー病患者の試料中の正規化した抗H1.0K180me2 IgMレベルの、これらの正規化した

50

抗H1.0K180me2 IgGレベルとの相関を調べた。この分析により、アルツハイマー病患者を別個の集団へと階層化することが可能となる。図17で75、77、94、および78とマークした患者は、任意のアルツハイマー病処置に応答する傾向がある。図17で90、91、93、83、および103とマークした患者は、特定のアルツハイマー病処置にのみ、例えば、非免疫調節性アルツハイマー病処置にのみ応答する傾向がある。

(実施例10)

ラパマイシンおよびその誘導体が、DNA損傷後の細胞質内におけるH1.0K180me2の蓄積をブロックする

【0411】

ラパマイシン誘導体がDNA損傷の際のH1.0K180me2の出現をブロックする可能性があるかどうかを試験するために、SRhADSCを、ラパマイシンまたはエベロリムス(ラパマイシンの誘導体)による24時間の前処理ありまたはなしで、プレオマイシンで2時間処理した。次いで、実施例1に記載した方法に従って、細胞を溶解させて、H1.0K180me2、H2A.Xおよび-アクチンについてウエスタンブロットにより分析した。図18に示すように、ラパマイシンとエベロリムスの両方がプレオマイシン処理の際のH1.0K180me2の出現を低減し、エベロリムスもDNA損傷の際のH1.0K180me2の出現をブロックする可能性があることを示唆する。

【0412】

SRhADSCを、塩基除去修復経路を誘発する化合物である、プレオマイシンまたはテモゾロミドにより2時間処理した。次いで、細胞を溶解させて、H1.0K180me2、H2A.Xおよび-アクチンについてウエスタンブロットにより分析した。図19に示すように、プレオマイシンとテモゾロミドの両方が、H1.0K180me2のメチル化を誘導することができた。

(実施例11)

mTORおよびPI3K阻害剤は、DNA損傷後のH1.0K180me2の蓄積をブロックする

【0413】

図20は、H1.0K180me2動態に対するmTORおよびPI3K阻害剤の効果を示す。SRhADSCを、化学阻害剤であるmTOR1、mTOR2および/またはPI3Kによる24時間の前処理ありまたはなしで、プレオマイシンで2時間処理した。細胞を溶解させ、H1.0K180me2、H1.0全体、H2A.XおよびヒストンH4全体についてのウエスタンブロットによる分析のためにクロマチン抽出した。使用した薬物濃度、および各薬物に対する特異的な阻害標的を薬物名の次に与える。試験したすべての阻害剤は、プレオマイシン処理の際のH1.0K180me2の出現を低減することができた。

(実施例12)

in vitroでのG9Aによるメチル化および生成物の分析

【0414】

図21A~21Bは、このin vitroG9Aメチル化アッセイの結果を示す。

【0415】

H1.0ペプチドをメチル化することができるG9Aメチルトランスフェラーゼ(図21A)。次に、メチル化反応をゲル上で分解し、オートラジオグラフィーにより可視化した。4kDaでのバンドの出現は、トリチウム標識したメチル基がペプチドに移行することにより、G9AメチルトランスフェラーゼがH1.0ペプチドをメチル化でき、これにより可視化が可能となることを示す。H1.0ペプチドを欠く対照反応は、トリチウム標識した生成物を生じなかった。

【0416】

全長組換えH1.0をメチル化することができるG9Aメチルトランスフェラーゼ(図21B)。G9Aの量の増加を伴う組換え全長ヒストンH1.0のin vitroメチ

10

20

30

40

50

ル化アッセイを図 2 1 B に示す。G 9 A は、K 1 8 0 において全長 H 1 . 0 をジメチル化することができる。

【 0 4 1 7 】

非修飾 H 1 . 0 ペプチド (A K P V K A S K P K K A K P V K P K (配列番号 3 6)) に関する G 9 A メチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応をセットアップし、LC - MS により生成物を特定した。メチル化反応は、組換え G 9 A、標識されていないメチルドナー (S - アデノシル - L - メチオニン)、および非修飾 H 1 . 0 ペプチドを含んだ。次に、メチル化反応を LC - MS により分析し、各スペクトルピーク (最終反応のペプチド種に対応する) を特定し、スペクトルカウントを使用して定量化した。図 2 2 A における「me」の円の数は、リシン残基のメチル化状態 (モノ - 、ジ - 、またはトリ - メチル化) を表す。図 2 2 A は、非メチル化 H 1 . 0 ペプチドの存在下で、G 9 A が特異的かつ多量に H 1 . 0 K 1 8 0 をジメチル化する (すべてのペプチドの 9 9 . 9 %) ことを示す。

10

【 0 4 1 8 】

より具体的には、データは、G 9 A は、リシン K 1 8 0 をジメチル化するが、同一のペプチド断片に存在する他のリシン (K 1 6 6、K 1 7 4、K 1 7 5 または K 1 7 7) をジメチル化しないことを実証し、メチル化の効率は約 9 9 % と推定された (図 2 2 A および図 2 2 B)。H 1 . 0 ペプチドのリシン 1 8 0 に対する、G 9 A によるメチル化の感受性および特異性をさらに対象とするために、K 1 8 0 me 2 ペプチド (H 1 . 0 A A 1 6 5 ~ 1 8 2) を、同様の *in vitro* でのメチル化実験の基質として使用した。図 2 2 B、図 2 3 に示すように、さらにメチル化されたペプチドはごくわずかの量しか検出されなかった：H 1 . 0 K 1 6 6 me 1 K 1 8 0 me 2 (反応における全ペプチドの 1 . 2 7 %)、H 1 . 0 K 1 7 4 me 1 K 1 8 0 me 3 (反応における全ペプチドの 1 . 0 6 %) および H 1 . 0 K 1 7 4 me 3 K 1 7 5 me 3 K 1 7 7 me 1 K 1 8 0 me 2 (反応における全ペプチドの 0 . 3 5 %)。

20

【 0 4 1 9 】

全長 H 1 . 0 タンパク質に関する G 9 A メチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応をセットアップし、LC - MS により生成物を特定した。メチル化反応は、組換え G 9 A、標識されていないメチルドナー (S - アデノシル - L - メチオニン)、および組換えヒト H 1 . 0 タンパク質を含んだ。次に、メチル化反応を LC - MS により分析し、メチル化の部位を特定した。図 2 4 における「me」の円の数は、リシン残基のメチル化状態 (モノ - 、ジ - 、またはトリ - メチル化) を表す。図 2 4 は、組換え全長 H 1 . 0 の存在下で、G 9 A が、H 1 . 0 K 1 8 0 me 2 を含む C 末端リシン残基をメチル化することを示す。

30

(実施例 1 3)

in vitro での GLP によるメチル化および生成物の分析

【 0 4 2 0 】

非修飾 H 1 . 0 ペプチド (A K P V K A S K P K K A K P V K P K (配列番号 3 6)) での GLP メチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応をセットアップし、生成物を LC - MS により特定した。メチル化反応は、組換え GLP、標識されていないメチルドナー (S - アデノシル - L - メチオニン)、および非修飾 H 1 . 0 ペプチドを含んだ。次に、メチル化反応を LC - MS によって分析し、各スペクトルピーク (最終反応におけるペプチド種に対応する) を特定し、スペクトルカウントを使用して定量化した。図 2 5 における「me」の円の数は、リシン残基のメチル化状態 (モノ - 、ジ - 、またはトリ - メチル化) を表す。図 2 5 は、非メチル化 H 1 . 0 ペプチドの存在下で、GLP が H 1 . 0 K 1 8 0 を特異的にジメチル化する (すべてのペプチドの 9 6 . 6 %) ことを示す。

40

【 0 4 2 1 】

K 1 8 0 ジメチル化 H 1 . 0 ペプチド (A K P V K A S K P K K A K P V K (me 2) P K (配列番号 3)) での GLP メチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応

50

をセットアップし、生成物を LC - MS により特定した。メチル化反応は、組換え GLP、標識されていないメチルドナー (S - アデノシル - L - メチオニン)、および H1.0 K180me2 ペプチドを含んだ。次に、メチル化反応を LC - MS によって分析し、各スペクトルピーク (最終反応におけるペプチド種に対応する) を特定し、スペクトルカウントを使用して定量化した。図 26 における「me」の円の数は、リシン残基のメチル化状態 (モノ -、ジ -、またはトリ - メチル化) を表す。図 26 は、K180ジメチル化 H1.0 ペプチドの存在下で、GLP は H1.0 K180 および H1.0 K174 をさらにメチル化するだけであり、またその効率は非常に低い (ペプチドの 1.02% がさらにメチル化される) ことを示す。

【0422】

全長 H1.0 タンパク質での GLP メチル化の正確な位置を特定するために、メチル化反応をセットアップし、生成物を LC - MS により特定した。メチル化反応は、組換え GLP、標識されていないメチルドナー (S - アデノシル - L - メチオニン)、および組換えヒト H1.0 タンパク質を含んだ。次に、メチル化反応を LC - MS によって分析し、メチル化の部位を特定した。図 27 における「me」の円の数は、リシン残基のメチル化状態 (モノ -、ジ -、またはトリ - メチル化) を表す。図 27 は、組換え全長 H1.0 の存在下で、本明細書に記載されている条件下で、GLP が全長 H1.0 をメチル化しないことを示す。GLP は、本明細書において提供される条件下で、G9A の特異性を欠く、H1.0 の C 末端テールの多数のリシン残基をメチル化する。

(実施例 14)

hADSC における G9A の siRNA ノックダウン
siRNA のトランスフェクション

【0423】

G9A を標的とするよう設計した siRNA プールは Qiagen (GS10919) から入手し、無作為にスクランブルした siRNA プールは ThermoFisher Scientific (4390843) から入手した。siRNA プールは、製造業者のプロトコルに従い、Lipofectamine 3000 (Life Technologies) を使用して、自己複製 hADSC にトランスフェクトした。siRNA のトランスフェクションの 24 時間後に細胞を採取し、qPCR またはウエスタンブロットによって分析した。

qPCR

【0424】

細胞培養物を Trizol (Invitrogen) 中でホモジナイズし、RNeasy キット (Qiagen) を使用して全 RNA を単離した。RNA は Qubit (Invitrogen) で定量化し、製造業者のプロトコル (Invitrogen) に従って、SuperScript III を使用して逆転写した。定量的 PCR 分析を、製造業者のプロトコル (Applied Biosystems) に従い、約 5 ng の cDNA、1 μM の指定されたプライマー対および Fast - SYBR Green PCR master ミックスを用いて、Applied Biosystems 7700 配列検出器を使用して三連で実施した。プライマー対は以下に列挙する。各遺伝子に対する平均サイクル閾値 (Ct) を、同一試料中のベータ - アクチンのレベル (デルタ Ct) に対して正規化した。対合していない 2 つの試料の t 検定を使用して、処置群間の平均デルタ Ct 値の差を決定した。該当する場合、デルタ - デルタ Ct 方法により倍数変化を計算した (倍数 = $2^{-\Delta Ct}$)。

10

20

30

40

【表 1 4】

表 14: プライマー

GLP-フォワード	5'-AGGGGAGTGCTGACACAGAG-3' (配列番号 79)	
GLP-リバース	5'-GGGATCTTTACTGGCTGCAT-3' (配列番号 80)	
ベータ-アクチン-フォワード	5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3' (配列番号 81)	
ベータ-アクチン-リバース	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3' (配列番号 82)	
H1.0-フォワード	5'-CTCAAGCAGACCAAAGGGGT-3' (配列番号 83)	10
H1.0-リバース	5'-GGCGTGGCTACCTTCTTGAT-3' (配列番号 84)	
H1.1-フォワード	5'-AGGCAACGGGTGCATCTAAA-3' (配列番号 85)	
H1.1-リバース	5'-GATTTCCCTTGTTGCCGAGG-3' (配列番号 86)	
H1.2-フォワード	5'-CAAAGAAGGCCAAGGTTGCG-3' (配列番号 87)	
H1.2-リバース	5'-CGCCTTCTTAGGCTTGACAAC-3' (配列番号 88)	
H1.3-フォワード	5'-AGTGGCCAAGAGTGCGAAAA-3' (配列番号 89)	
H1.3-リバース	5'-CTTCGGCTTCCCCGACTTAG-3' (配列番号 90)	20
H1.4-フォワード	5'-ACGCTTGCCTTCAACATGTCC-3' (配列番号 91)	
H1.4-リバース	5'-AGTAATGAGCTCGGACACCG-3' (配列番号 92)	
H1.5-フォワード	5'-CCGGCTAAGAAGAAGGCAAC-3' (配列番号 93)	
H1.5-リバース	5'-GCTCCTTAGAAGCAGCCACA-3' (配列番号 94)	
G9A-フォワード	5'-TGCTGAGGCTGATGTGAGAG-3' (配列番号 95)	
G9A-リバース	5'-GGTCACACAGGTGGTTGATG-3' (配列番号 96)	30

結果

【0425】

自己再生 (SR) ヒト脂肪由来幹細胞 (hADSC) にスクランブルした対照 siRNA または G9A を標的とする siRNA のいずれかをトランスフェクトした。次いで、細胞を 2 時間のプレオマイシン処理に供した。ウエスタンブロット分析により、*in vivo* での G9A ノックダウンにより DNA 損傷の際の H1.0K180me2 の出現の低減が生じることが示された。G9A の公知のメチル化生成物である H3K9me2 を使用して、ノックダウンの際の G9A 活性の損失をモニターした (図 28A)

【0426】

hADSC における G9A の siRNA ノックダウンにより、G9A によってもたらされる公知の PTM である H3K9me2 の低減に付随して、2 時間のプレオマイシン処理の際 (ADD) の H1.0K180me2 レベルの有意な低減がもたらされた (図 28B)。

(実施例 15)

バルクでの *in vitro* でメチル化された H1.0K180me2 タンパク質またはペプチドの生成

【0427】

図 21B および図 24 で観察されたように、G9A は、全長組換えヒト H1.0 の K180 を効率的かつ特異的にジメチル化することができる。生体試料における H1.0K180me2 の検出のための参照標準として、ELISA キット (例えば、サンドイッチ E

10

20

30

40

50

L I S Aキット)に組み込むことができる多量のH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2 全長タンパク質を創出するために、このプロセスを利用してもよい。このプロセスは、1 × H M T 反応緩衝液(50 m M の T r i s - H C l 、 5 m M の M g C l 2 、 4 m M のジチオトレイトール、p H 9 . 0)、組換えヒトまたはマウスG 9 Aメチルトランスフェラーゼ、3 . 2 m M のS - アデノシル - L - メチオニン、およびN末端タグ(H A、H i s、G S T、F L A Gまたは下流での精製に適切な他のタグ)で標識した組換え全長ヒトH 1 . 0を含むバルクメチル化反応をセットアップすることを含む場合がある。反応は、G 9 Aにより媒介されるH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2のメチル化が可能となるように、37 °Cで1時間インキュベートされる。

【0428】

次いで、K 1 8 0 m e 2を含有する全長H 1 . 0は、1または2ステッププロセスで濃縮され、精製される。第1に、反応におけるすべての全長組換えH 1 . 0種は、N末端タグを利用して、親和性精製により、反応混合物から精製される。一例では、H 1 . 0はH Aタグで標識され、カラムまたは樹脂に固定されたH A抗体で精製される。精製後、必要であれば、タンパク質分解による切断を介して、タグを除去できる。このプロセスは、最終生成物中の全長H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2のみを濃縮し、捕捉および検出エピトープの両方が存在したことを保証する。第2のステップは、H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2を含有する全長H 1 . 0種のみをさらに精製するために、カラムまたは樹脂に固定されたH 1 . 0 K 1 8 0 m e 2抗体を利用する。次いで、この最終生成物を濃縮し(例えば、凍結乾燥を使用して)、定量化して、参照標準としてE L I S Aキットに含めるか、または治療薬として使用することができる。H 1 . 0 K 1 8 0 m e 2抗体の精製のみを利用するワンステップ精製アプローチで十分な場合もある。

10

20

【図1A】

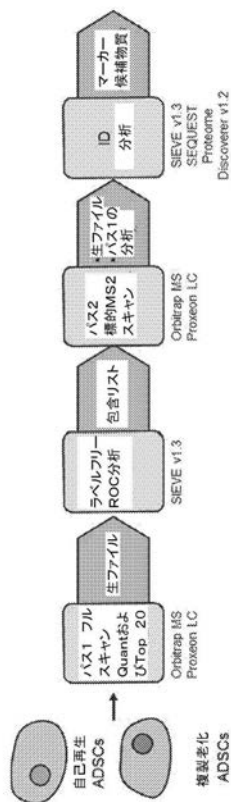


FIG. 1A

【図1B】

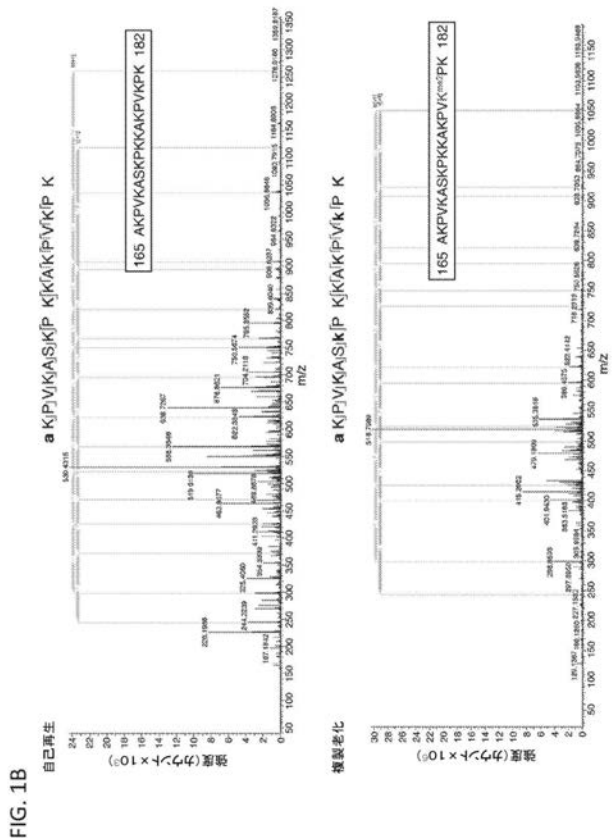


FIG. 1B

【 図 2 A 】

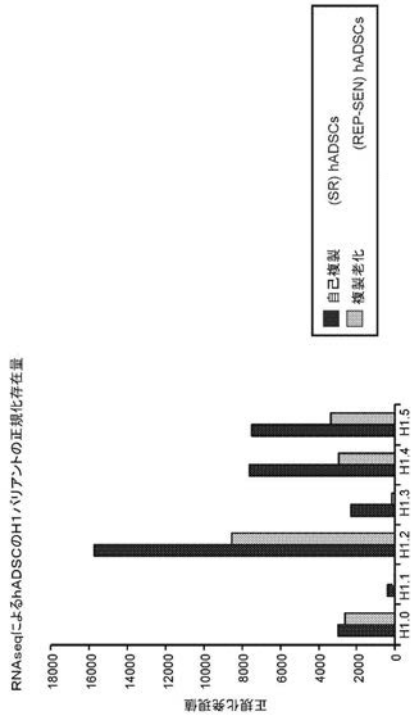


FIG. 2A

【 図 2 B 】



FIG. 2B

【 図 3 A - C 】

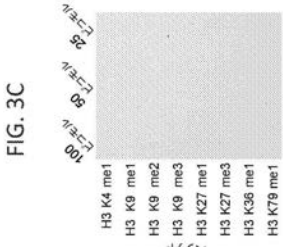


FIG. 3C

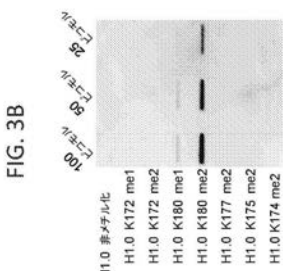


FIG. 3B



FIG. 3A

【 図 3 D 】

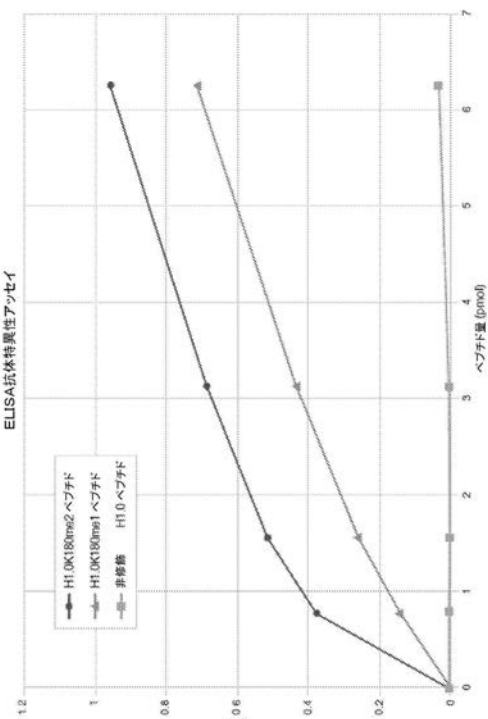


FIG. 3D

ペプチド量 (pmol)	H1.0K180me2		H1.0K180me1		非特異	
	OD	平均 OD	OD	平均 OD	OD	平均 OD
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
2	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
3	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
4	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
5	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
6	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00
7	0.50	0.50	0.14	0.14	0.00	0.00

【 図 6 】

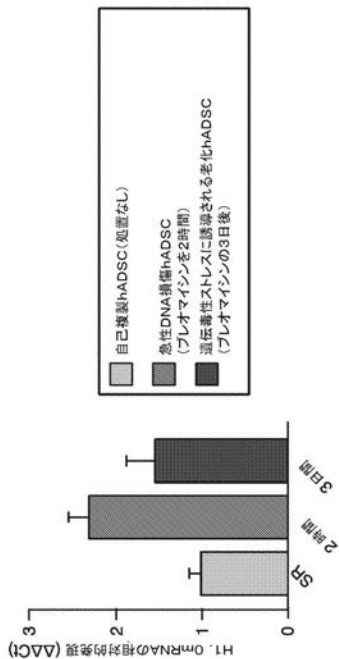


FIG. 6

【 図 7 B 】

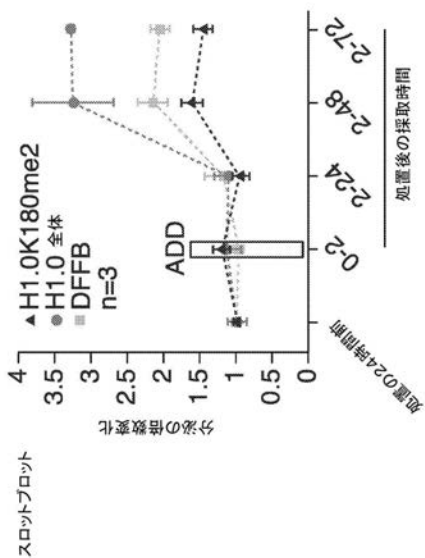


FIG. 7B

【 図 7 A 】

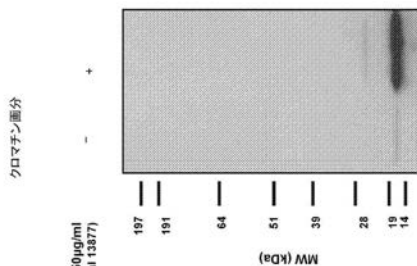


FIG. 7A

【 図 8 】

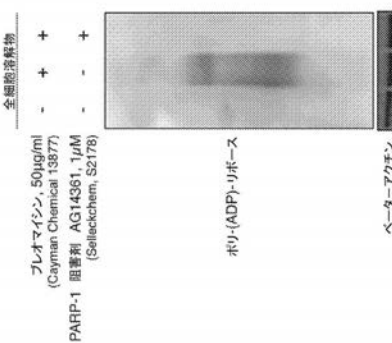
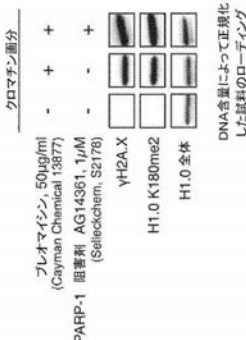


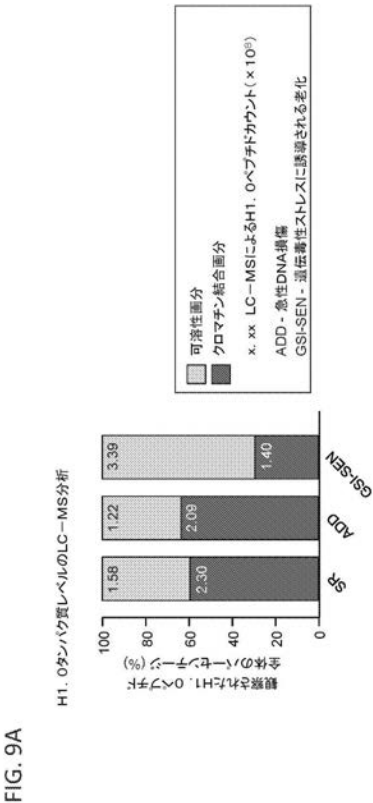
FIG. 8B

FIG. 8A

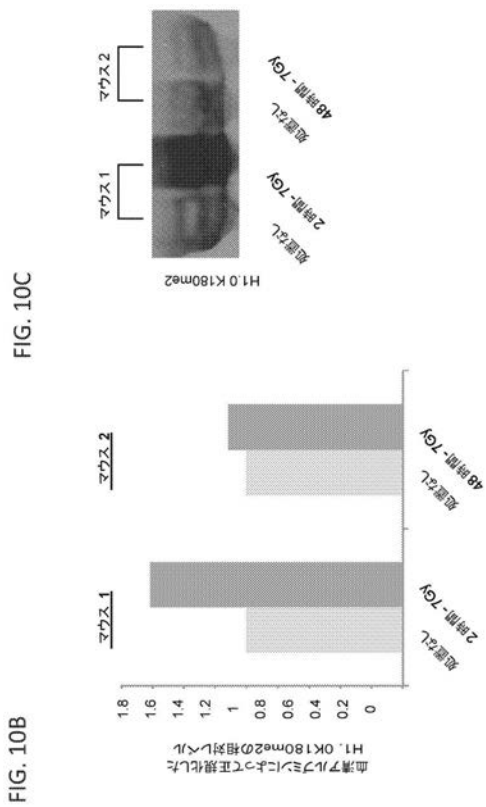


DNA含量によって正規化した試料のローディング

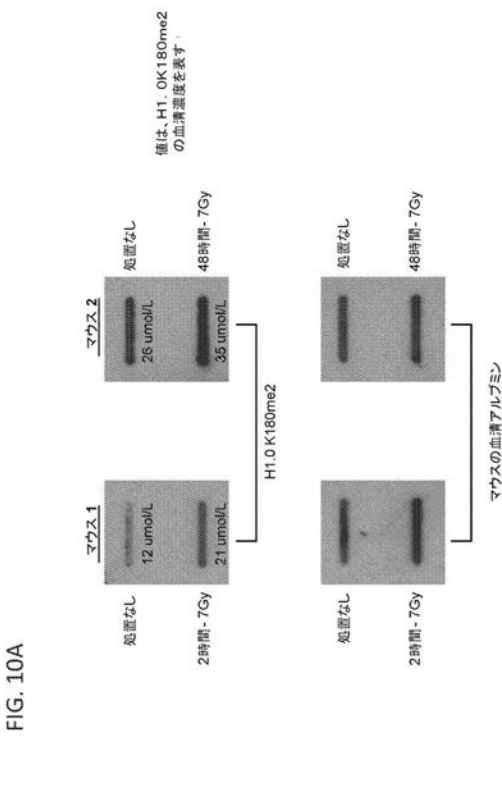
【 図 9 】



【 図 10 B - C 】



【 図 10 A 】



【 図 11 A - B 】

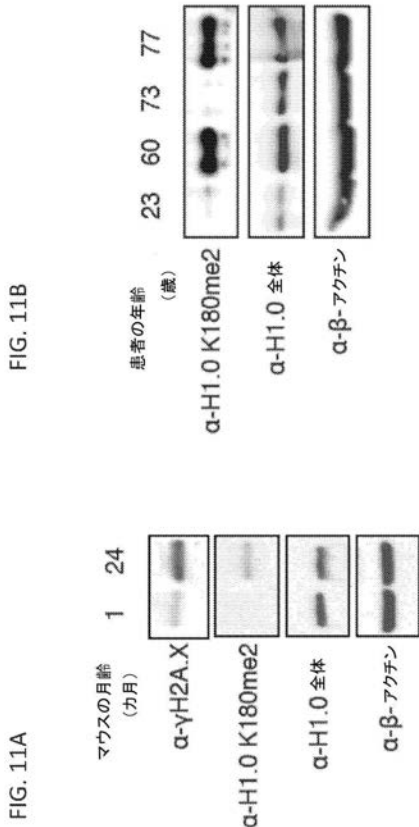


FIG. 10B

FIG. 10C

FIG. 11A

FIG. 11B

【 図 1 1 C 】

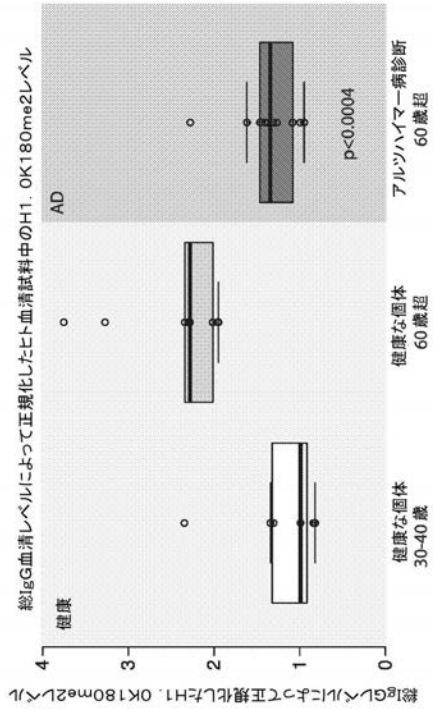


FIG. 11C

【 図 1 2 B 】

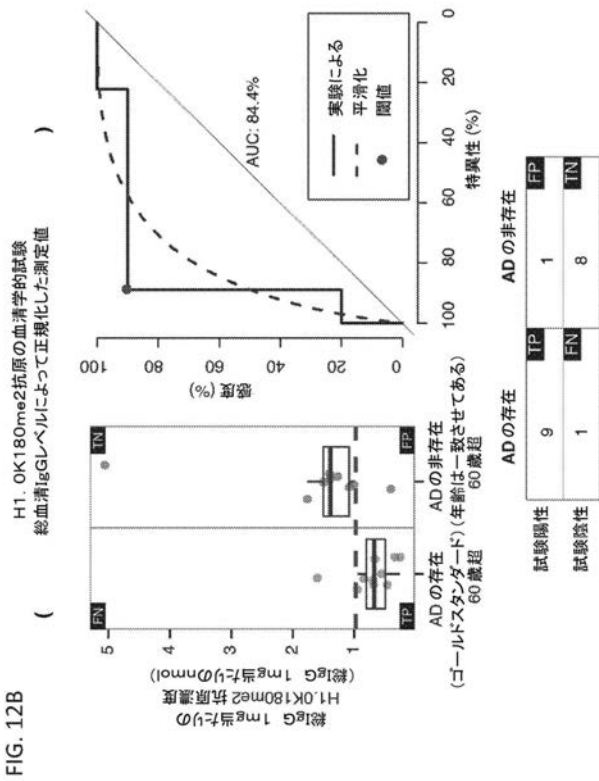


FIG. 12B

【 図 1 2 A 】

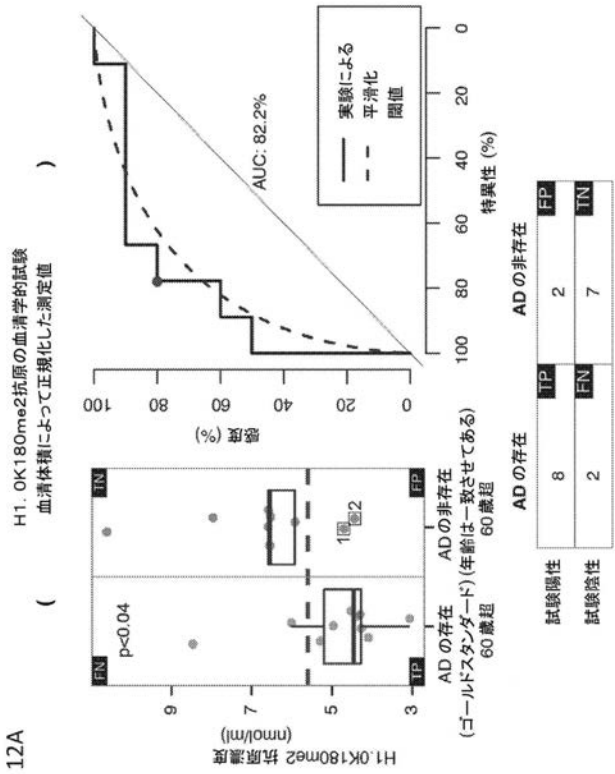


FIG. 12A

【 図 1 2 C 】

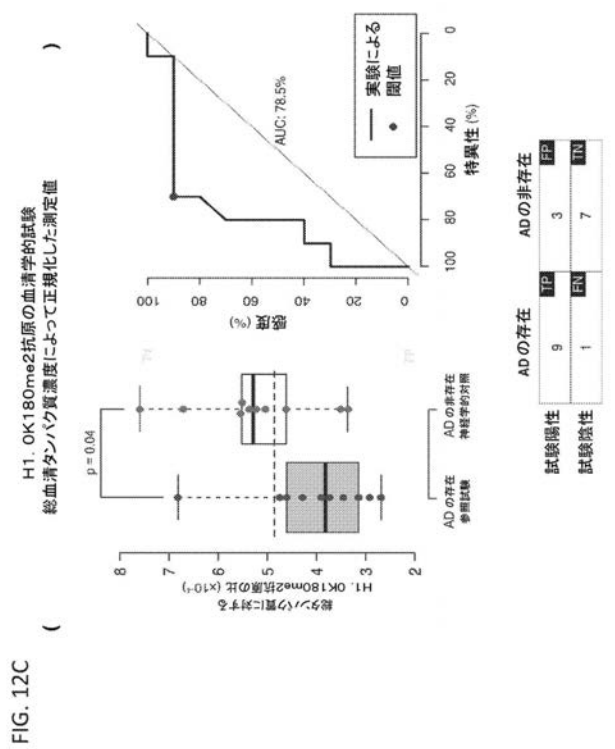


FIG. 12C

【 図 1 4 C 】

ステップ2 体液試料中の自己抗H1. OK180me2 IgMの検出
および定量化のための間接ELISA法

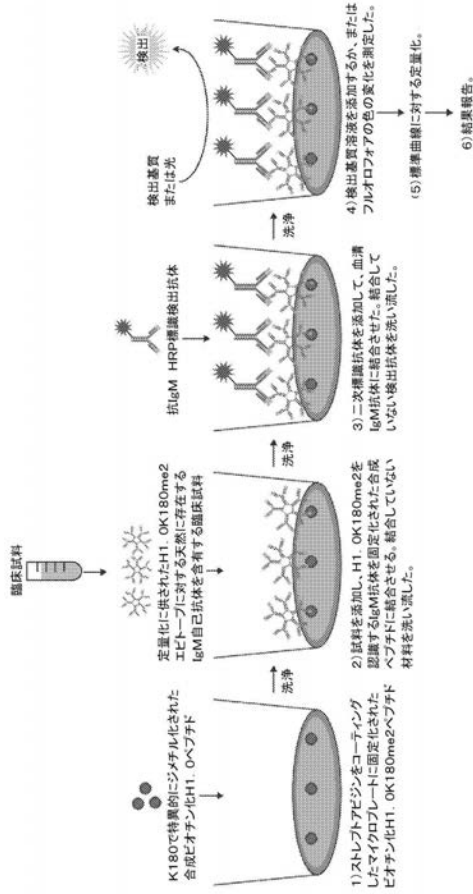


FIG. 14C

【 図 1 4 E 】

ステップ2 体液試料中の自己抗H1. OK180me2 IgMの検出および定量化のための間接ELISA法

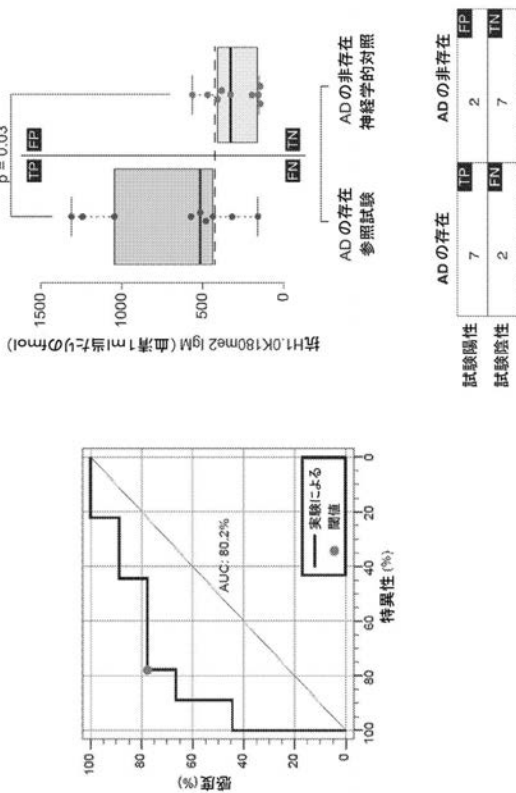


FIG. 14E

【 図 1 4 D 】

ステップ2 体液試料中の自己抗H1. OK180me2 IgMの検出および定量化のための間接ELISA法に対する較正曲線

450nmにおけるODに対する抗H1. OK180me2 IgGモル濃度の標準曲線。IgMモル濃度は曲線から推測した。

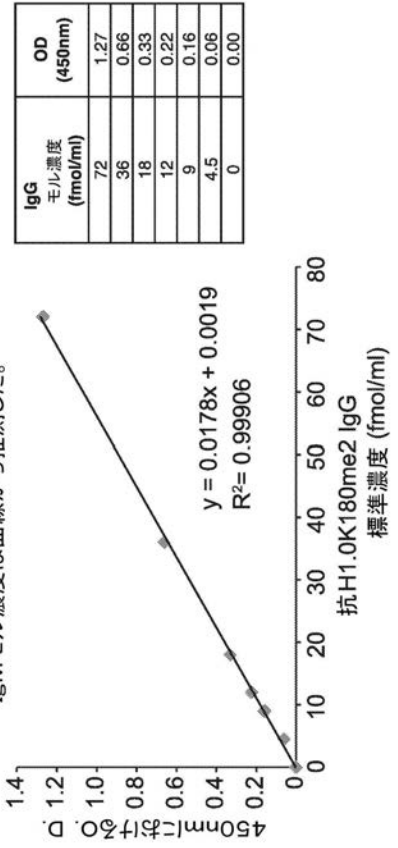


FIG. 14D

【 図 1 5 A 】

ステップ3 体液試料中の自己抗H1. OK180me2 IgMの検出および定量化(ステップ1)におけるIgM測定値全体に対して正規化した)のための正規化間接ELISA法

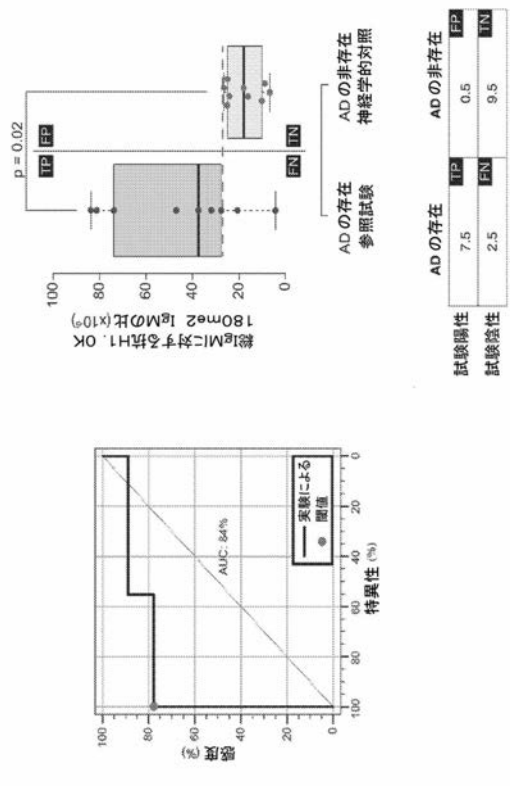


FIG. 15A

【 図 1 5 B 】

異なる操作者と異なる実験室設定
の間の試験の再現性

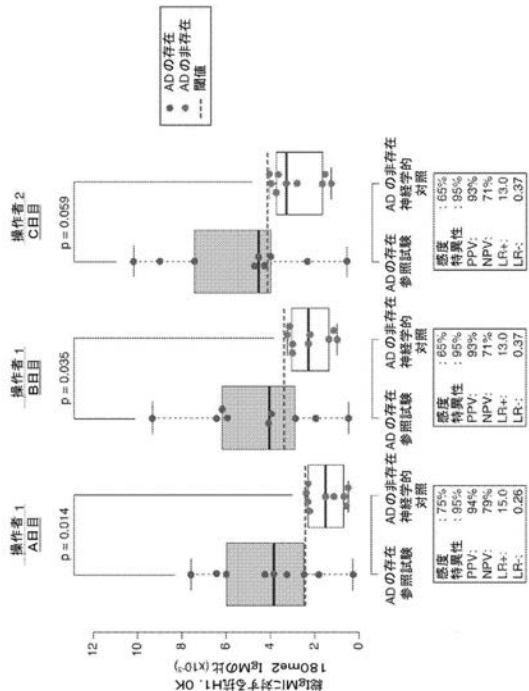
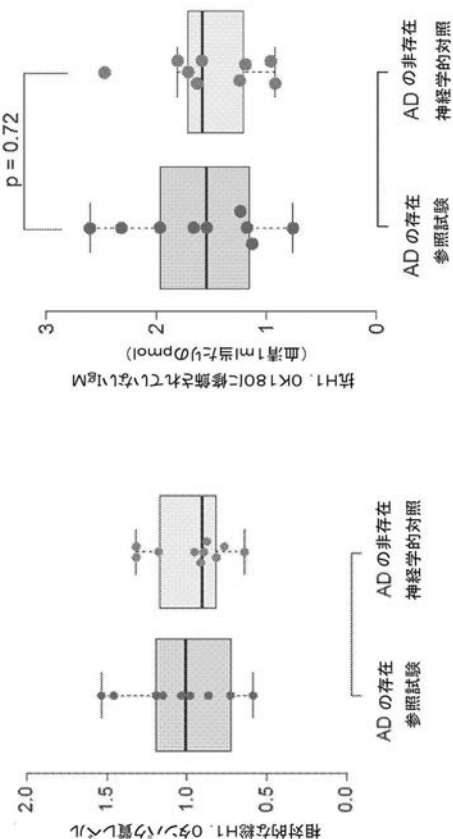


FIG. 15B

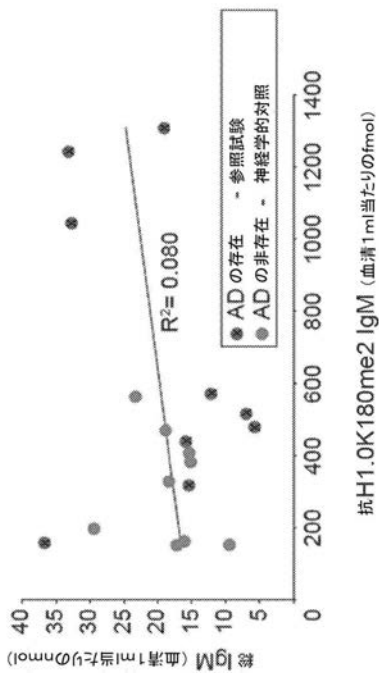
【 図 1 6 B 】

FIG. 16B



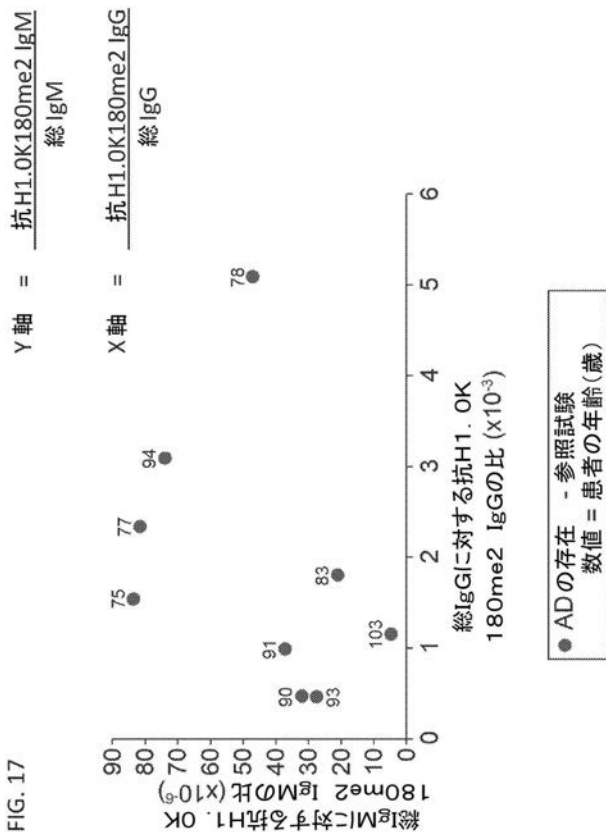
【 図 1 6 A 】

FIG. 16A



【 図 1 7 】

FIG. 17



【 図 2 1 】

FIG. 21B

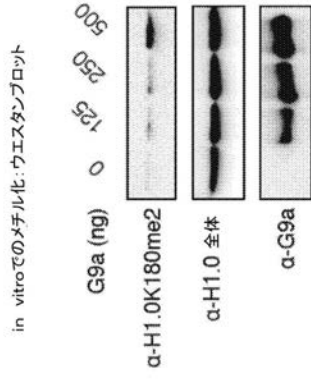
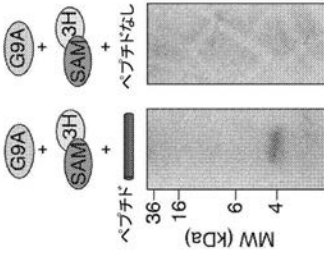


FIG. 21A



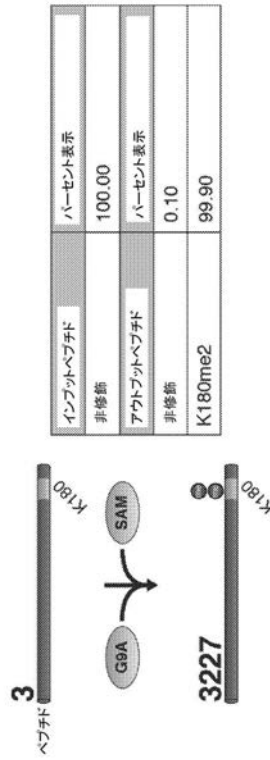
【 図 2 2 B 】

FIG. 22B

酵素	インプット	信頼度	ヘプチド配列	スベクトル カウント	ヘプチド配列内の 修飾リジンの位置	全タンパク質内の 修飾リジンの位置
G9a	非メチル化 ヘプチド	< 95%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	3	-	-
G9a	非メチル化 ヘプチド	< 95%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	3227	K16(ジメチル)	K180(ジメチル)
G9a	K180me2 ヘプチド	≥ 99%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	2815	K16(ジメチル); K21(メチル); K16(ジメチル)	K180(ジメチル); K180(ジメチル)
G9a	K180me2 ヘプチド	≥ 95%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	36	K10(トリメチル); K11(トリメチル); K13(メチル); K16(ジメチル); K16(トリメチル); K10(メチル); K16(トリメチル)	K174(トリメチル); K175(トリメチル); K177(メチル); K180(ジメチル); K174(メチル); K18(トリメチル)
G9a	K180me2 ヘプチド	≥ 99%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	10	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK
G9a	K180me2 ヘプチド	≥ 95%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	30	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK
GLP	非メチル化 ヘプチド	< 95%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	2	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK
GLP	非メチル化 ヘプチド	≥ 99%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	56	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK
GLP	K180me2 ヘプチド	≥ 99%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	1935	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK
GLP	K180me2 ヘプチド	≥ 99%	AKPVKASRPKKAKPVKPK	20	AKPVKASRPKKAKPVKPK	AKPVKASRPKKAKPVKPK

【 図 2 2 A 】

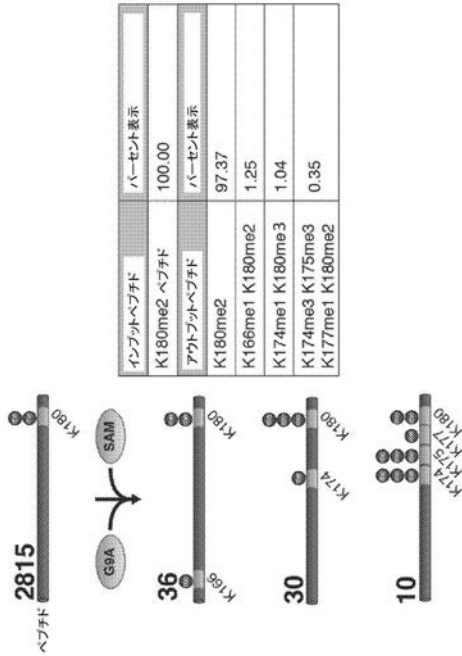
FIG. 22A



数値は、メチル化反応
後に特定された各種の
スベクトルカウントを表す

【 図 2 3 】

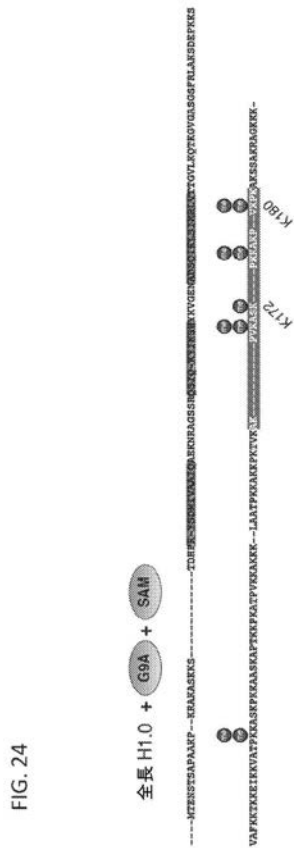
FIG. 23



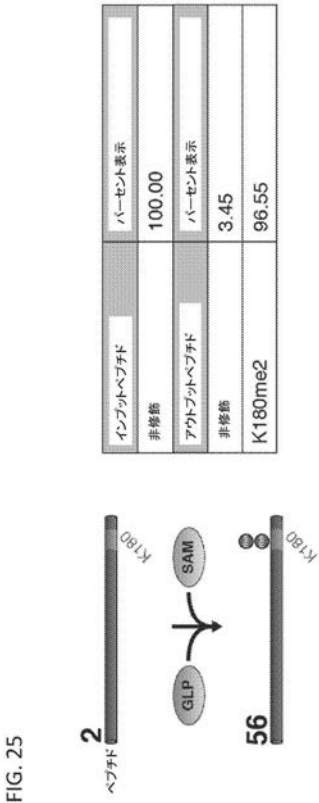
数値は、メチル化反応
後に特定された各種の
スベクトルカウントを表す

インプットヘプチド	パーセント表示
インプットヘプチド	100.00
K180me2 ヘプチド	100.00
アウトプットヘプチド	パーセント表示
K180me2	97.37
K166me1 K180me2	1.25
K174me1 K180me3	1.04
K174me3 K175me3	0.35
K177me1 K180me2	

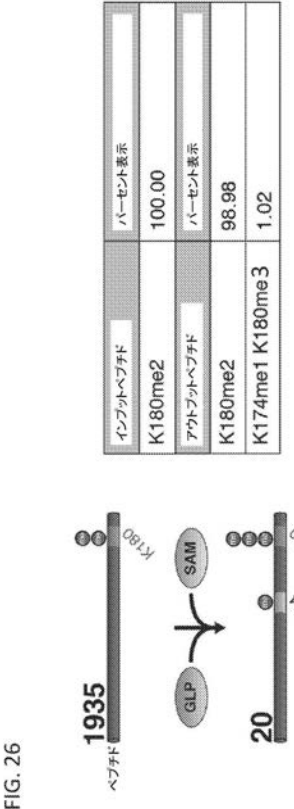
【 図 2 4 】



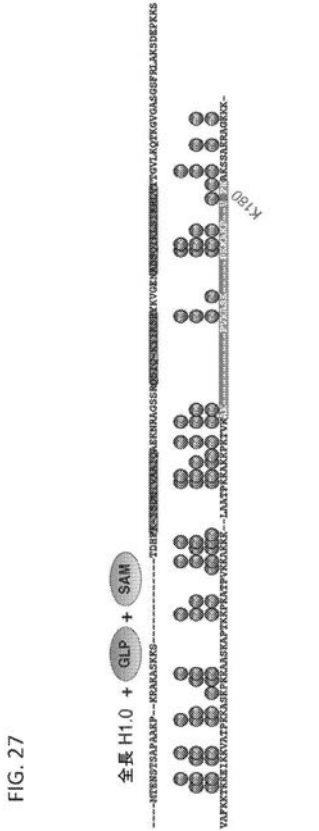
【 図 2 5 】



【 図 2 6 】



【 図 2 7 】



【 図 2 8 A 】

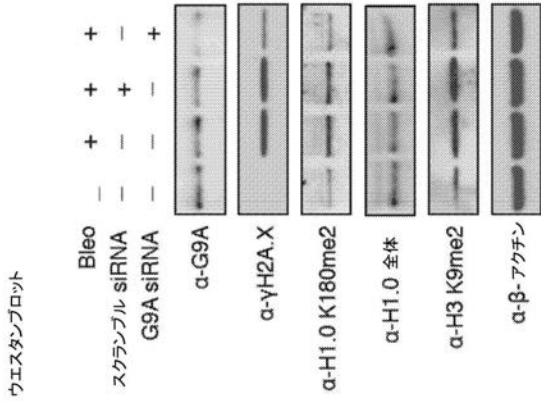


FIG. 28A

【 図 2 8 B 】

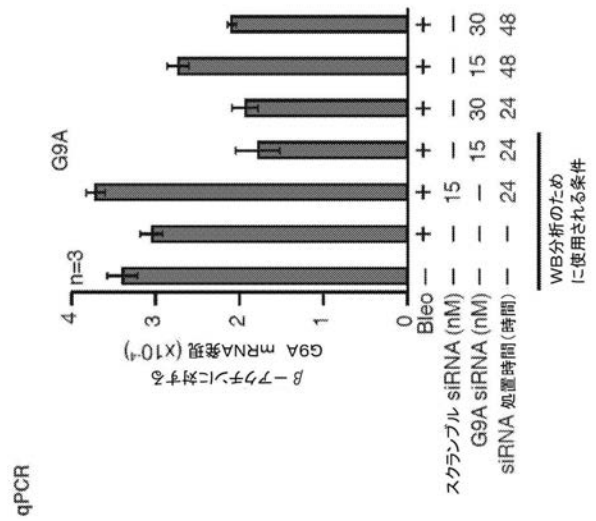


FIG. 28B

【 配 列 表 】

2019521953000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2017/028686
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 16/18; C07K 16/44; G01N 33/68 (2017.01) CPC - C07K 16/18; C07K 16/44; G01N 2440/12 (2017.08)		
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) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 435/7.1; 530/345; 530/358 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 8,981,066 B2 (LUNYAK) 17 March 2015 (17.03.2015) entire document	1, 2, 8-12, 87, 90-93, 108, 110-114
—		
Y		13-15, 88, 89, 109, 142, 151-153, 162, 171, 172, 175, 176, 179, 180
—		
A		3-7, 29-44, 94, 95, 115, 116
Y	US 2013/0230858 A1 (SEQUENOM, INC.) 05 September 2013 (05.09.2013) entire document	13
Y	US 2014/0099305 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 10 April 2014 (10.04.2014) entire document	14, 15, 171, 172, 175, 176
Y	US 2010/0196941 A1 (BRAUN et al.) 05 August 2010 (05.08.2010) entire document	88, 109
Y	POGRIBNY et al. "Fractionated Low-Dose Radiation Exposure Leads to Accumulation of DNA Damage and Profound Alterations in DNA and Histone Methylation in the Murine Thymus", Mol Cancer Res, 01 October 2005 (01.10.2005), Vol. 3, Pgs. 553-61, entire document	89
Y	US 2015/0208985 A1 (MICRO NIPPLE TECHNOLOGY CO., LTD.) 30 July 2015 (30.07.2015) entire document	142, 151, 152
Y	US 2010/0305473 A1 (YUZHAKOV) 02 December 2010 (02.10.2010) entire document	152, 153
<input checked="" 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 "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 26 October 2017		Date of mailing of the international search report 05 DEC 2017
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/028686

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0093865 A1 (CLONTECH LABORATORIES, INC.) 03 April 2014 (03.04.2014) entire document	162
Y	US 2012/0121600 A1 (RAU et al) 17 May 2012 (17.05.2012) entire document	179, 180
A	US 2007/0287166 A1 (KANAI et al) 13 December 2007 (13.12.2007) entire document	29-44
A	US 2013/0029998 A1 (MAYANIL et al) 31 January 2013 (31.01.2013) entire document	29-44
A	US 2003/0092095 A1 (HUANG) 15 May 2003 (15.05.2003) entire document	29-34
A	US 2008/0199964 A1 (SHOKAT et al) 21 August 2008 (21.08.2008) entire document	3-7, 94, 95, 115, 116
A	— CONNOR et al. "A simple method for improving the specificity of anti-methyl histone antibodies", Epigenetics, 01 July 2010 (01.07.2010), Vol. 5, Pgs. 392-395. entire document	3-7, 94, 95, 115, 116
A	— WEISS et al. "Histone H1 variant-specific lysine methylation by G9a/KMT1C and Glp1/KMT1D", Epigenetics & Chromatin, 24 March 2010 (24.03.2010), Vol. 3:7, Pgs. 1-13. entire document	3-7
A	US 2013/0345115 A1 (UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA) 26 December 2013 (26.12.2013) entire document	1-15, 29-44, 87-95, 108-116, 142, 151-153, 162, 171, 172, 175, 176, 179, 180

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/028686

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. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 45-51, 72-86, 143-149, 154-156, 163-165, 181, 182 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 extra sheet(s).	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	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. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-15, 29-44, 87-95, 108-116, 171, 172, 175, and 176; and (in part) claims 142, 151-153, 162, 179, and 180
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> 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. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/028686

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I: claims 1-15, 29-44, 87-95, 108-116, 171, 172, 175, and 176; and (in part) claims 142, 151-153, 162, 179, and 180 are drawn to anti-H1.0K180me2 antibodies, and methods and compositions comprising the same.

Groups II+: claims 16-28, 52-71, 96-107, 117-141, 173, 174, 177, and 178; and (in part) claims 142, 150-153, 157-162, 166-170, 179, and 180 are drawn to H1.0 proteins/peptides comprising a dimethylated lysine residue corresponding to K180 of full length human histone H1.0, and methods and compositions comprising the same.

The first invention of Groups II+ is restricted to an H1.0 peptide, wherein the H1.0 peptide is selected to be SEQ ID NO:3, the H1.0 peptide further comprising a dimethylated lysine residue at K16.

Applicant is invited to elect additional H1.0 proteins/peptides, each with specified SEQ ID NO, to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an H1.0 peptide, wherein the H1.0 peptide is selected to be SEQ ID NO:4, the H1.0 peptide further comprising a dimethylated lysine residue at K15. Additional H1.0 proteins/peptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Group I and Groups II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of Group I, anti-H1.0K180me2 antibodies, are not present in Groups II+; the special technical features of Groups II+, H1.0 proteins/peptides comprising a dimethylated lysine residue corresponding to K180 of full length human histone H1.0, are not present in Group I.

Group I and Groups II+ share the technical features of a human histone H1.0 comprising a dimethylated lysine residue at position K180. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

US 8,981,066 B2 to Lunyak discloses a human histone H1.0 comprising a dimethylated lysine residue at position K180 (where the methylated histone H1 comprises ...one or more methyl groups on H1 residue 180, Col. 4, Lns. 1-3).

The Groups II+ formulas do not share a significant structural element for determining whether an individual has, or is at risk of developing Alzheimer's disease, requiring the selection of alternatives for the H1.0 peptides/proteins, where "the peptide comprises any one of the sequences of SEQ ID NOS:3-35".

The Groups II+ share the technical features of a synthetic histone H1.0 peptide comprising a dimethylated lysine residue or a synthetic histone H1.0 protein comprising a dimethylated lysine residue, wherein the dimethylated lysine residue corresponds to K180 of a human histone H1.0. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 8,981,066 B2 to Lunyak discloses a synthetic histone H1.0 peptide comprising a dimethylated lysine residue or a synthetic histone H1.0 protein comprising a dimethylated lysine residue, wherein the dimethylated lysine residue corresponds to K180 of a human histone H1.0 (Ten to thirteen amino acid synthetic peptides corresponding to the region of 170-182 aa of H1.0 were used. The synthesis of the peptides was performed on an Applied Biosystems 443 peptide synthesizer, Col. 14, Lns. 50-54; the methylated histone H1 comprises ...one or more methyl groups on H1 residue 180, Col. 4, Lns. 1-3).

The inventions listed in Group I and Groups II+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/028686

Box No. 1	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
a.	<input type="checkbox"/> forming part of the international application as filed: <input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file. <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.
b.	<input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
c.	<input checked="" type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: <input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). <input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.	<input checked="" type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3.	Additional comments: SEQ ID NOs: 1-35 were searched.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	V
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	C
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
	A 6 1 K 47/68	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1
	A 6 1 P 25/28	
	C 1 2 N 15/13	

(31)優先権主張番号 62/325,362
(32)優先日 平成28年4月20日(2016.4.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/355,265
(32)優先日 平成28年6月27日(2016.6.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/355,277
(32)優先日 平成28年6月27日(2016.6.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(特許庁注：以下のものは登録商標)

- 1 . T W E E N
- 2 . T R I T O N

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ラニアック, ビクトリア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 1 0 7, サンフランシスコ, サード ストリート 6 6 5, スイート 2 8 0, エアラン セル テクノロジーズ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 トラービー, ジェイムズ ロバート

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 9 0 1, サン ラファエル, フェアヒルズ ドライブ 3 3 1

Fターム(参考) 4C076 AA95 CC41 EE41 EE59 FF31 FF34

4C085 AA13 AA14 AA21 AA33 EE01

4H045 AA11 AA20 AA30 AA40 BA54 BA70 FA74 GA26

专利名称(译)	与K180二甲基化H1.0蛋白相关的组合物和方法		
公开(公告)号	JP2019521953A	公开(公告)日	2019-08-08
申请号	JP2018555492	申请日	2017-04-20
[标]发明人	ラニアックビクトリア		
发明人	ラニアック, ビクトリア トラービー, ジェイムズ ロバート		
IPC分类号	C07K16/18 G01N33/53 C07K14/47 A61K39/395 A61K47/68 A61P43/00 A61P25/28 C12N15/13		
CPC分类号	A61P25/28 C07K14/47 C07K16/44 C12N9/1007 C12P21/02 C12Y201/01 C12Y201/01043 C12P21/06 C07K16/18 G01N33/54306 G01N33/573 G01N33/6896 G01N2800/2821 G01N2800/50		
FI分类号	C07K16/18.ZNA G01N33/53.D C07K14/47 A61K39/395.N A61K39/395.D A61K39/395.V A61K39/395. C A61K39/395.L A61K47/68 A61P43/00.111 A61P25/28 C12N15/13		
F-TERM分类号	4C076/AA95 4C076/CC41 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF31 4C076/FF34 4C085/AA13 4C085 /AA14 4C085/AA21 4C085/AA33 4C085/EE01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/AA40 4H045/BA54 4H045/BA70 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/325392 2016-04-20 US 62/325408 2016-04-20 US 62/325362 2016-04-20 US 62/355265 2016-06-27 US 62/355277 2016-06-27 US		
其他公开文献	JP2019521953A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本文提供了H1.0K180me2抗体，H1.0K180me2蛋白和H1.0K180me2肽，以及用于诊断和治疗的方法。这些H1.0K180me2抗体等可用于治疗个体的甲基化H1.0相关疾病或病症。这些抗体等也可用于检测和定量在赖氨酸残基180处含有二甲基化赖氨酸的组蛋白H1.0蛋白或其片段（H1.0K180me2），这样的组合物和方法可用于检测复制老化，DNA损伤，基因毒性应激，辐射暴露，阿尔茨海默病，用于监测治疗方案，患者分层，药物筛选，可以作为衰老的标志。

FIG. 5A Sandwich ELISA method for detection and quantification of naturally occurring H1.0K180me2 epitope in samples of bodily fluids.

