

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506973

(P2005-506973A)

(43) 公表日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/18	C07K 16/18 ZNA	2G045
C07K 7/06	C07K 7/06	4B024
C07K 7/08	C07K 7/08	4B063
C12Q 1/48	C12Q 1/48 Z	4B064
GO1N 33/15	GO1N 33/15 Z	4H045

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 58 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2003-519091 (P2003-519091)	(71) 出願人	501149684 ユニバーシティ オブ バージニア パテ ント ファウンデーション アメリカ合衆国, バージニア 22903 -2442, シャルロットビル, スイート 1-110, ウエスト メイン ストリ ート 1224
(86) (22) 出願日	平成14年8月1日 (2002.8.1)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稔
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月2日 (2004.2.2)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/024405	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W02003/014142	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(87) 国際公開日	平成15年2月20日 (2003.2.20)		
(31) 優先権主張番号	60/310, 015		
(32) 優先日	平成13年8月3日 (2001.8.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/364, 386		
(32) 優先日	平成14年3月14日 (2002.3.14)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

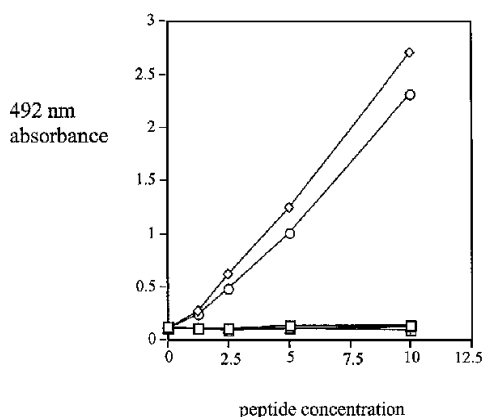
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アポトーシスのマーカーとしてのリン酸化ヒストンH2B

(57) 【要約】

本発明は、ヒストン2B上の -リン酸化セリン14残基に対する抗体の生成に関する。ヒストン2Bのアミノ末端の、この翻訳後修飾は、アポトーシスに入ろうとしているか、または既にアポトーシスを被っている細胞に関連する。これらの抗体は、アポトーシス細胞を同定するのに有用であり、そして診断、およびスクリーニングのツールとして働く。本発明はまた、Mst1キナーゼ、およびMst1の活性を調節する化合物の単離に関する。このキナーゼは、インピボにおいて、ヒストン2B上で、この翻訳後修飾を引き起こすことを担う酵素として同定されている。

Elisa using 1:2000 of H2B serine 14 antibody



【特許請求の範囲】

【請求項1】

CSAPAPKKGSKK (配列番号3)、SAPAPKKGSKK (配列番号1)、およびSAPAPKKGSKK (配列番号2) からなる群より選択される抗原に特異的に結合する、抗体。

【請求項2】

前記抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記抗体が、配列SAPAPKKGSKK (配列番号1) に特異的に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項4】

前記抗体が、配列SAPAPKKGSKK (配列番号2) に特異的に結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項5】

前記抗体が標識される、請求項1に記載の抗体。

【請求項6】

前記抗体が、蛍光マーカを用いて標識される、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

請求項1に記載の抗体、および希釈剤、または薬学的に許容可能な担体を含む、組成物。

【請求項8】

11～20個のアミノ酸配列からなる精製されたペプチドであって、ここで該アミノ酸配列は、以下：SAPAPKKGSKK (配列番号1)、およびSAPAPKKGSKK (配列番号2) からなる群より選択される、配列を含む精製されたペプチド。

【請求項9】

前記ペプチドが、配列CSAPAPKKGSKK (配列番号3) からなる、請求項8に記載の精製されたペプチド。

【請求項10】

脊椎動物種におけるアポトーシス細胞の存在を検出するための方法であって、該方法は、以下の工程：

生物学的サンプルと、S14P抗体とを接触させる工程であって、ここで該サンプルが、該脊椎動物種から単離され、かつクロマチンを含む、工程；ならびに

該クロマチンと該S14P抗体との間で形成された免疫複合体を、該脊椎動物種におけるアポトーシス細胞の存在の指標として同定する工程、

を包含する、方法。

【請求項11】

S14P抗体が標識される、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記生物学的サンプルが、前記脊椎動物種の前記細胞から単離された、本質的に精製されたクロマチンからなる、請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記免疫複合体が、免疫沈降によって同定される、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

請求項10に記載の方法であって、前記S14P抗体が、固体支持体上に固定され、前記免疫複合体を同定する工程が、以下：緩衝液を用いて該結合された抗体を洗浄する工程、次いで、該結合された抗体と、ヒストンH2Bに特異的に結合する第二の標識された抗体とを接触させる工程を、さらに包含する、方法。

【請求項15】

アポトーシス細胞を同定するためのキットであって、該キットは、以下：CSAPAPKKGSKK (配列番号3)、およびSAPAPKKGSKK (配列番号1) からなる群より選択される、ペプチドに特異的に結合する抗体を含む、キット。

【請求項16】

10

20

30

40

50

SAPAPKKGSKK (配列番号2) に特異的に結合する第二の抗体をさらに含む、請求項15に記載のキット。

【請求項17】

アミノ酸配列SAPAPKKGSKK (配列番号2) を含むポリペプチドをさらに含む、請求項15に記載のキット。

【請求項18】

Mst1キナーゼ活性のインヒビターについてのスクリーニングの方法であって、該方法は、以下の工程：

混合物であって、Mst1、配列SAPAPKKGSKK (配列番号2) を含むペプチド、およびMst1の潜在的インヒビターを含む混合物、を調製する工程；

キナーゼ活性を許容させる条件下で、所定の長さの時間、該混合物をインキュベートする工程；ならびに

潜在的なMst1インヒビターの阻害性効果の指標として、形成されたSAPAPKKGSKK (配列番号1) の量を定量する工程、

を包含する、方法。

【請求項19】

請求項18に記載の方法であって、形成された前記SAPAPKKGSKK (配列番号1) の量が、前記インキュベーション工程の後に、前記ペプチドに結合するS14P抗体の量を測定することによって決定される、方法。

【請求項20】

メチル化されたH3ヒストンの存在を検出する方法であって、該方法は、ヒストンタンパク質と、前記ペプチド配列SAPAPKKGSKK (配列番号1) に特異的に結合する抗体とを接触させる工程を包含する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(米国政府の権利)

本発明は、助成金番号GM40922として、米国国立衛生研究所から与えられた、米国政府の支援によってなされた。米国政府は、本発明に特定の権利を有する。

【0002】

(関連出願)

本出願は、その開示が本明細書において援用される、2001年8月3日出願、米国仮出願第60/310,015号、2002年3月14日出願同第60/364,386号、および2002年4月26日出願同第60/375,892号に対して、米国特許法第199条(e)項の規定のもとで優先権を主張する。

【0003】

(技術分野)

本発明は、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾によって作製されたヒストンエピトープに結合する抗体、このような抗体を含む組成物、ならびに診断およびスクリーニングのツールとしてのこのような組成物の使用に関する。より詳細には、本発明は、アポトーシスに関連するヒストン修飾に関する。

【0004】

(背景技術)

アポトーシスは、プログラムされた細胞死であって、発生、および細胞の加齢の両方に関与する天然に存在するプロセスである。これは、身体が、望ましくない細胞、老齢の細胞、または損傷した細胞を、自ら取り除くことができるプロセスである。アポトーシスは、細胞増殖の生物学的な対応事象である。これは、正常な組織の代謝回転、胚発生、および免疫系の成熟のような生物学的プロセスであって、ホルモン欠乏、熱ストレス、および代謝ストレスのような病理学的プロセスを含むプロセスに必須である。(Bowen、およびLockshin(編) Cell Death in Biology and Pathology (Chapman、およびHall, 1981) におけるWyllie, A.H. (9~34頁))。

【0005】

10

20

30

40

50

プログラムされた細胞死を深く研究するほど、プログラムされた細胞死が生じるのには、いくつかの異なる機構が存在し得るということが明らかになってきている。1つの実施形態において、細胞死は、アポトーシスの特徴である、細胞容積の低下、クロマチンの凝縮、細胞出芽、および3'-OH遊離末端を有する180塩基対 (bp) のオリゴマーのラダーへのDNAの断片化によって特徴付けられる。細胞膜は、そのプロセスを通じて細胞膜の完全性を維持しており、そしてリソソームはインタクトなままである。炎症性応答は、アポトーシスのプロセスの間に生じる。罹患した細胞は、隣接する正常細胞による、およびいくつかのマクロファージによる食細胞作用を受ける。あるいは、細胞小器官自体が断片化されている、細胞死の他の機構が現在記載されている。本明細書において用いられる場合、「アポトーシス」という用語は、プログラムされた細胞死の全ての形態を包含することが意図される。

10

【0006】

アポトーシスの機構の背景にある生化学的エフェクター経路は、依然として未知である。アポトーシス機構は、以下を含むということが示唆されている：1つ以上の Ca^{2+}/Mg^{2+} 依存性の内因性エンドヌクレアーゼ (Arendsら (1990) *Am. J. Pathol.* 136: 593~608) ; トランスグルタミナーゼ活性 (Fesusら (1987) *FEBS Lett.* 224: 104~108; Taressら (1992) *J. Biol. Chem. Cell* 75: 653~660) ; および酸素ラジカルの生成 (Hockenberryら (1993) *Cell* 75: 241~251; Butke、およびSandstrom (1994) *Immun. Today* 15: 7~10)。遺伝子発現はアポトーシスに必要であると考えられる。なぜならこのプロセスは、RNA、またはタンパク質合成のインヒビターによって停止され得るからである (Martinら (1988) *J. Cell Biol.* 106: 829~844)。

20

【0007】

アポトーシスは、多数の内因性のシグナル、または外因性のシグナルによって始動され得る。これらのシグナルとしては、以下が挙げられる：軽度の物理的シグナル (例えば、電離放射線、紫外線、または高熱) ; 低度~中度の用量の毒性化合物 (例えば、アジド、または過酸化水素) ; 化学療法剤 (例えば、エトポシド、およびテニポシド)、サイトカイン (例えば、腫瘍壊死因子、およびトランスフォーミング成長因子) ; ならびにT細胞レセプターの刺激。

【0008】

真核生物のクロマチンの基本的単位は、ヌクレオソームであって、この粒子はヒストンコアの八量体 (各々のヒストンH3、H4、H2A、およびH2Bの2つのコピー) の周囲を囲んだ146塩基対のDNAを含む。次に、ヌクレオソームのアレイが、どのように、高次のクロマチンファイバー (これが次に別個の機能的なドメインを規定する) 中にパッケージングされるのかは、十分理解されていない。証拠がますます増えており、これによって、ヒストン翻訳後修飾 (アセチル化、リン酸化、メチル化、など) が、いくつかの場合には、このプロセスの中心である機構の1つを提供するということが示唆される。さらに、最近の証拠では、共有結合的に改変されたヒストンの別個のパターンが、核因子 (未知の機能によって下流の機能を媒介する) を補充し、かつ結合するための「シグナル伝達プラットフォーム」 (すなわち、「ヒストンコード」として機能し得ることが示唆される)。

30

【0009】

ヒストンと、DNAとの間の親密な関連を考慮すれば、アポトーシスを特徴付けるDNAの完全性、およびクロマチンコンパクションの状態の変化は、ヒストン修飾によって媒介され得る。しかし、現在まで、アポトーシスの間に特異的に誘導されるヒストン修飾は、十分規定されていない。ミオチンクロマチンコンパクションは、例えば、セリン10におけるヒストンH3リン酸化に関連するが、この修飾は、アポトーシス誘導性クロマチンコンパクションの間に一貫して観察されてはいない (Cheungら (2000) *Cell* 103, 263~271において概説された)。対照的に、比較的マイナーなヒストン改変体であるH2A.Xのリン酸化は、アポトーシスにおけるDNA断片化の初期段階の間に増大する (Rogakouら (2000) *J Biol Chem* 275, 9390~9395)。しかし、H2A.Xリン酸化 (セリン139における) は、全ての公知の二本鎖DNA分解と関連しており、これによって、このリン酸化が、アポトーシスプロセスに

40

50

関連した特定のクロマチンマークよりも「DNA損傷センサー」として機能することが示唆される。

【0010】

哺乳動物細胞において、アポトーシスに固有に関連している唯一の主なコアヒストン修飾は、ヒストンH2Bリン酸化であるが、アミノ末端におけるリン酸化の代表的な部位には規定されていない。これを踏まえれば、H2Bアミノ末端テール（ただし、他のヒストンテールではない）は、クロマチンコンパクションを誘導するXenopusの無細胞系においてクロマチンコンパクションに必須である。

【0011】

本発明は、ヒトHL60細胞における、アポトーシス性クロマチンコンパクション、およびDNA断片化の発生と特異的に相関する、特定のヒストン（H2B）翻訳後修飾（セリン14リン酸化）に関する。さらに、本発明は、アポトーシスマーカーに特異的に結合する抗体（本明細書において、以降は、「S14P抗体」）、ならびに種々の疾患を診断および処置するためのその抗体の使用を記載する。

【0012】

アポトーシスが調節されない場合、疾患が生じる。調節されないアポトーシスは、ガン、心疾患、神経変性障害、自己免疫障害、ならびにウイルス感染、および細菌感染のような疾患に関与する。ガンは例えば、細胞が増殖することを誘発するだけでなく、アポトーシスをブロックする。ガンは、部分的にはアポトーシスの不全であり、ここでは、アポトーシスによって細胞が自分自身を殺傷する順序がブロックされている。アポトーシスを誘導することを含む、新しいガンの処置が研究されている。

【0013】

（発明の要旨）

本発明は、プログラムされた細胞死に固有に関連するマーカーに関する。このマーカーは、ヒストンH2Bのアミノ末端の翻訳後修飾（セリン14のリン酸化）である。より詳細には、本発明は、ヒストンH2Bの修飾によって作製されたエピトープに特異的に結合し、かつアポトーシスを被る細胞のマーカーとして働く抗体に関する。本発明はまた、ヒストンH2Bのセリン14のリン酸化を担うキナーゼMst1、およびMst1活性を改変し得る化合物を同定するためのアッセイに関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】図1は、S14P抗体が、H2Bホスホセリン14ペプチドのみを認識すること、そしてこの活性が、H2Bホスホセリン14ペプチドによって阻害され得るが、修飾されていないペプチドによっては阻害され得ないことを実証するELISAからのデータを示す。このペプチドは、4 で、一晩、PBS中でペプチドをインキュベートすることによって、示した量で、ELISAプレート上にコーティングされた。このウェルをPBST（PBS含有0.5% Tween-20）を用いて1時間ブロックして、PBSTを用いて3回洗浄した。抗-phos（S14）H2B血清を、1:200希釈で各ウェルに2時間添加し、続いてさらに洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合体化ウサギ二次抗体を、1:5000で含有するPBSTを、各々のウェルに2時間添加した。PBSTを用いる3回の洗浄後、0-フェニレンジアミンジヒドロクロライドペルオキシダーゼ基質（Sigma）を添加して、492nmのODで吸光度によって定量した。固定し、かつ試験されたペプチドは、以下を含む：S14（配列番号2； ）；S14P（配列番号3； ）；S14P（ELISAの前に1mg/mlのS14競合ペプチドを用いてプレインキュベートした血清を用いて行なったELISA）（ ）；S14P（ELISAの前に1mg/mlのS14競合ペプチドを用いてプレインキュベートした血清を用いて行なったELISA）（ ）。

【0015】

（発明の詳細な記載）

（定義）

本発明の詳細な説明および特許請求の範囲において、以下の用語は、以下に記載の定義に従って用いられる。

10

20

30

40

50

【0016】

本明細書において用いる場合、「核酸」という用語は、RNA、ならびに一本鎖および二本鎖のDNAおよびcDNAを包含する。さらに、「核酸」、「DNA」、「RNA」という用語、および同様の用語はまた、核酸アナログ、すなわち、ホスホジエステル骨格以外を有するアナログを包含する。例えば、いわゆる「ペプチド核酸」（当該分野で公知であり、かつその骨格中にホスホジエステル結合の代わりにペプチド結合を有する）は、本発明の範囲内であると考えられる。

【0017】

「ペプチド」という用語は、3つ以上のアミノ酸の配列であって、ここでアミノ酸が天然に存在するか、または合成の（天然には存在しない）アミノ酸であるアミノ酸の配列を包含する。ペプチド模倣物としては、以下の改変の1つ以上を有するペプチドが挙げられる：

1. ペプチドであって、ここで1つ以上のペプチジル - - C(O)NR - - 連結（結合）が、 - - CH₂カルバミン酸塩連結（ - - CH₂OC(O)NR - - ）、亜リン酸塩/エステル連結、 - CH₂ - - スルホンアミド（ - CH₂ - - S(O)₂SNR - ）連結、尿素（ - - NHC(O)NH - - ）連結、 - - CH₂ - 二級アミン連結のような非ペプチジル連結によって置換されているか、またはアルキル化ペプチジル連結（ - - C(O)NR - - ）によって置換されており、ここでRは、C₁ - C₄アルキルである、ペプチド；
2. ペプチドであって、ここでN末端が、NRR₁基に対して、 - - NRC(O)R基に対して、 - - NRC(O)OR基に対して、 - - NRS(O)₂R基に対して、 - - NHC(O)NHR基に対して、誘導体化されており、ここで、RおよびR₁は、水素、またはC₁ - C₄アルキルであり、ただしR、およびR₁は、両方が水素ではないという条件下である、ペプチド；
3. ペプチドであって、C末端が、 - - C(O)R₂に対して誘導体化されており、ここでR₂は、C₁ - C₄アルコキシ、および - - NR₃R₄からなる群より選択され、ここで、R₃およびR₄は、水素、およびC₁ - C₄アルキルからなる群より独立して選択される、ペプチド。

【0018】

ペプチドにおいて天然に存在するアミノ酸残基は、以下のとおり、IUPAC - IUB生化学命名法委員会によって推奨されるように省略される：フェニルアラニンは、Phe、またはFである；ロイシンは、Leu、またはLである；イソロイシンは、Ile、またはIである；メチオニンは、Met、またはMである；ノルロイシンは、Nleである；バリンは、Val、またはVである；セリンは、Ser、またはSである；プロリンは、Pro、またはPである；トレオニンは、Thr、またはTである；アラニンは、Ala、またはAである；チロシンは、Tyr、またはYである；ヒスチジンは、His、またはHである；グルタミンは、Gln、またはQである；アスパラギンは、Asn、またはNである；リジンは、Lys、またはKである；アスパラギン酸は、Asp、またはDである；グルタミン酸は、Glu、またはEである；システインは、Cys、またはCである；トリプトファンは、Trp、またはWである；アルギニンは、Arg、またはRである；グリシンは、Gly、またはGである、そしてXは、任意のアミノ酸である。他の天然に存在するアミノ酸としては、例えば、4 - ヒドロキシプロリン、5 - ヒドロキシリジン、などが挙げられる。

【0019】

本明細書において用いる場合、「保存的アミノ酸置換」という用語は、本明細書においては、以下の5つの群のうちの1つの中での交換として、規定される：

I. 小型の脂肪族の、非極性が、またはわずかに極性の残基：

Ala、Ser、Thr、Pro、Gly；

II. 極性の、負に荷電した残基、およびそれらのアミド；

Asp、Asn、Glu、Gln；

III. 極性の、正に荷電した残基：

His、Arg、Lys；

IV. 大型の脂肪族の非極性残基：

Met、Leu、Ile、Val、Cys

10

20

30

40

50

V. 大型の、芳香族残基：

Phe、Tyr、Trp

【0020】

本明細書において用いる場合、「精製された」という用語、および同様の用語は、それが天然には関連している、他の成分を実質的に含まない（すなわち、少なくとも60%、好ましくは80%、そして最も好ましくは90%を超えて含まない）形態である、分子または化合物の単離物に関する。

【0021】

「作動可能に連結された」とは、並列(juxtaposition)であって、その成分が、それらの有用な機能を実施するように構成される、並列をいう。例えば、コード配列に作動可能に連結された制御配列、またはプロモーターは、コード配列の発現を発効し得る。

【0022】

本明細書において用いる場合、「固体支持体」という用語は、可溶性分子との連結（好ましくは共有結合）を形成し得る溶媒不溶性の基質に関する。この支持体は、事実上生物学的な粒子（例えば、限定はしないが、細胞、またはバクテリオファージ）、または合成の粒子（例えば、限定はしないが、アクリルアミド誘導体、ガラス、プラスチック、アガロース、セルロース、ナイロン、シリカ、または磁気化された粒子）のいずれであってもよい。支持体は、粒子状形態であっても、またはモノリシックなストリップ、もしくはシートであってもよい。このような支持体の表面は、固体であっても、多孔性であっても、任意の都合のよい形状であってもよい。

【0023】

本明細書において用いる場合、「相補的な」、または「相補性」という用語は、塩基対規則によって関連するポリヌクレオチド（すなわち、ヌクレオチドの配列）に関して用いられる。例えば、「A-G-T」という配列は、「T-C-A」という配列に相補的である。

【0024】

「治療剤」、「薬剤」、または「薬物」という用語は、患者における病気、苦痛、疾患、または傷害の処置（予防、診断、軽減、または治療を含む）において用いられ得る、任意の治療用因子、または予防用因子をいう。

【0025】

本明細書において用いる場合、「処置する」という用語は、特定の障害、もしくは状態に関連する症状を軽減する工程、および/またはこの症状を予防もしくは排除する工程を包含する。例えば、ガンを処置するとは、ガン細胞の増殖、および/もしくは分裂を防止、または減速する工程、ならびにガン細胞を殺傷する工程を包含する。

【0026】

本明細書において用いる場合、「薬学的に許容可能な担体」という用語は、任意の標準的な薬学的な担体（例えば、リン酸緩衝化食塩水、水、およびエマルジョン（例えば、油/水エマルジョンまたは水/油エマルジョン））、ならびに種々のタイプの湿潤剤を包含する。

【0027】

本明細書において用いる場合、「H2Bセリン14の抗原性フラグメント」という用語は、ヒストンH2Bのアミノ末端の天然のペプチドフラグメント（ペプチドフラグメントSAPAPKKGSKK（配列番号1）、およびSAPAPKKGSKK（配列番号2）を含む）、ならびにそれらのフラグメントの合成等価物の両方を包含する。

【0028】

本明細書において用いる場合、「抗体」という用語は、ポリクローナル抗体、もしくはモノクローナル抗体、またはそれらの結合フラグメント（例えば、Fab、F(ab')₂、およびFvフラグメント）をいう。

【0029】

本明細書において用いる場合、太字の（訳注；アンダーラインで表す）文字S(S)は、アミノ酸配列の状況において用いる場合、リン酸化されているセリンアミノ酸に相当する。

本明細書において用いる場合、「S(P)」の「Ser(P)」という用語はまた、アミノ酸セリンのリン酸化型をいう。

【0030】

本明細書において用いる場合、「S14P抗体」という用語は、配列CSAPAPKKGSKK(配列番号3)に特異的に結合する抗体である；そして「S14抗体」という用語は、配列CSAPAPKKGSKK(配列番号2)に特異的に結合する抗体である。

【0031】

本明細書において用いる場合、S14P抗体の「生物学的に活性なフラグメント」という用語は、ペプチドCSAPAPKKGSKK(配列番号3)に特異的に結合し得るそれぞれの全長抗体の天然部分、または合成部分を包含する。

【0032】

「リンカー」は、2つの別個の実体を化学的に連結するように機能する分子(または分子の基)である。例えば、ペプチドリンカーは、ペプチド結合を介して2つのポリペプチドを化学的に連結する。

【0033】

本明細書において用いる場合、「非経口の」という用語は、皮下、静脈内、または筋肉内の投与を包含する。

【0034】

(本発明)

本発明は、ヒストンH2Bタンパク質、および他の種に由来する同種のタンパク質のアミノ末端の修飾が、アポトーシスのマーカーとして働き得るという発見に関する。より詳細には、出願人は、クロマチンの表面からヒストンH2Bのアミノ末端が突出していること、およびこのアミノ末端から14番目の位置のセリンアミノ酸(Ser14)が、アポトーシスのプロセスを被るかまたは既にアポトーシスのプロセスを開始している細胞において、選択的にインビボでリン酸化されるということを開発した。従って、本発明の1つの局面に従って、ヒストンH2BのSer14のリン酸化は、脊椎動物種におけるアポトーシスのマーカーとして働き、そしてこのタンパク質のこの部分を認識する抗体は、重要な診断ツールとしての用途を有する。

【0035】

本発明の1つの局面は、リン酸化されたヒストンH2Bタンパク質(PhosH2B)のアミノ末端に特異的な抗体を産生するために用いられる抗原に関する。1つの実施形態において、PhosH2Bのアミノ末端の精製された抗原性フラグメント、またはその合成的な等価物が提供される。この抗原は、配列CSAPAPKKGSKK(配列番号3)を含むアミノ酸フラグメントを含み、ここでCは、ネイティブなH2B配列に付加された人工的なシステイン残基である。1つの好ましい実施形態において、この抗原は、配列SAPAPKKGSKK(配列番号1)、またはSAPAPKKGSKK(配列番号1)とは1つ以上の保存的アミノ酸置換ずつ異なるアミノ酸配列から構成される。本発明はまた、リン酸化されていないH2B配列:SAPAPKKGSKK(配列番号2)を含む抗原を包含する。別の実施形態において、精製された抗原は、ウシ血清アルブミン、またはキーホールリンペットヘモシアニンのような、安定な担体に連結されたポリペプチドを含む。本発明はまた、ペプチド配列SAPAPKKGSKK(配列番号2)をコードする核酸配列に

【0036】

1つの好ましい実施形態において、配列CSAPAPKKGSKK(配列番号3;「S14P抗体」)に特異的に結合するPhosH2B抗体が提供され、そして配列CSAPAPKKGSKK(配列番号2;「S14抗体」)に特異的に結合する未修飾のH2B抗体が提供される。

【0037】

S14P抗体、またはS14抗体を生成するために用いられた1つの方法は、この抗原に特異的な抗体の産生を誘発するための、実験動物(代表的には、ウサギ)に対する各々の抗原の投与を包含する。抗体産生を誘発するための抗原投与の用量およびレジメン、ならびに抗体の精製のための方法は、当業者に周知である。代表的には、このような抗体は、免疫前の

10

20

30

40

50

血清を得るために最初に採血済みの、ニュージーランド白色ウサギに、目的の抗原を皮下投与することによって産生され得る。抗原は、6つの異なる部位で1部位あたり100 μ lの総容積で注射されてもよい。各々の注射された材料は、合成のサーファクタントアジュバントブルロニックポリオール、または微粉碎されたアルリルアミドゲル（SDS - ポリアクリルアミドゲル電気泳動後のタンパク質またはポリペプチドを含む）を含む。

【0038】

次いで、このウサギは最初の注射の2週間後に採血され、そして6週間ごとに、3回、同じ抗原を用いて定期的にブーストされる。次いで、血清のサンプルを各ブーストの10日後に収集する。次いで、抗体を捕獲するための対応する抗体を用いて、アフィニティークロマトグラフィーによって血清からポリクローナル抗体を回収する。最終的に、このウサギをペントバルビタール150mg/Kg IVを用いて安楽死させる。ポリクローナル抗体を産生するためのこの手順、および他の手順は、E. Harlowら、編集、Antibodies: A Laboratory Manual (1988) (これは、参考として本明細書において援用される)に開示されている。抗体の特異性は、酵素結合免疫吸着アッセイ、もしくはイムノブロットイングによって、または当業者に公知の同様の方法によって決定され得る。

10

【0039】

本発明はまた、H2B S14P抗原（すなわち、リン酸化セリン14アミノ酸を含む、ヒストンH2Bのアミノ末端のフラグメント）、または未修飾のH2B S14抗原（すなわち、未リン酸化セリン14アミノ酸を含む、ヒストンH2Bのアミノ末端のフラグメント）のいずれかに特異的に結合するモノクローナル抗体を包含する。モノクローナル抗体産生は、当業者に周知の技術を用いて発効されてもよい。基本的に、このプロセスは、最初に、インビボ、またはインビトロのいずれかで目的の抗原を用いて事前に免疫されている哺乳動物（例えば、マウス）の脾臓から免疫細胞（リンパ球）を得る工程を包含する。次いで、この抗体分泌リンパ球を、細胞培養物中で無期限に複製可能である、ミエローマ細胞、または形質転換された細胞と融合させ、これによって不死の、免疫グロブリン分泌細胞株を産生する。得られた融合細胞、すなわちハイブリドーマを培養して、得られたコロニーを、所望のモノクローナル抗体の産生についてスクリーニングする。このような抗体を産生するコロニーを、クローニングして、インビボ、またはインビトロのいずれかで増殖させて、大量の抗体を産生する。本発明の1つの実施形態は、H2B S14P抗原、またはH2B S14抗原に結合する、モノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマ細胞株に関する。このような細胞を融合する理論的根拠、および実際的な方法論の説明は、本明細書において参考として援用される、Kohler、およびMilstein、Nature、256: 495 (1975)に記載されている。

20

30

【0040】

全抗体に加えて、抗体のフラグメントは、特定の抗原に対する結合特異性を保持し得る。抗体フラグメントは、組み換えDNA技術を用いる、タンパク質分解、または合成を含むが、これに限定されない、いくつかの方法によって生成することができる。このような実施形態の例は、H2B S14P抗体、またはH2B S14抗体の選択的タンパク質分解であって、Fabフラグメントを生成するためのパインによる、またはF(ab')₂フラグメントを生成するためのペプシンによる、選択的タンパク質分解である。これらの抗体フラグメントは、本明細書において参考として援用される、J. Goding、Monoclonal Antibodies: Principles and Practice、第98~118頁（N. Y. Academic Press1983）に記載されるような、従来の手順によって作製することができる。抗体全体の特定の結合を保持するH2B S14P抗体、またはH2B S14抗体の他のフラグメントは、当業者に公知の他の手段によって生成することができる。

40

【0041】

1つの実施形態において、抗体を標識する。本発明が、任意の特定の検出システム、または標識に限定されることは意図されない。抗体は、発蛍光団、放射性同位体、または非同位体標識試薬（例えば、ビオチン、またはジゴキシゲニン）を用いて標識されてもよい；ビオチンを含む抗体は、蛍光色素のような任意の所望の標識に結合体化された、アビジンのような「検出試薬」を用いて検出され得る。1つの実施形態において、本発明のヒスト

50

ン特異的抗体は、二次抗体の使用によって間接的に標識され、ここでこの二次抗体は、標識されており、そして一次（ヒストン特異的）抗体に特異的である。あるいは、このヒストン特異的抗体は、FITC、またはローダミンのような放射性同位体、または蛍光色素を用いて間接的に標識されてもよい；このような場合、二次検出試薬は、標識されたプローブの検出のために必要でなくてもよい。血中での修飾されたヒストンの存在は、次いで、関連の標識された抗体の使用によって検出され得る。

【0042】

本発明の抗体、またはフラグメントは、組成物を形成するために、担体、または希釈剤と合わされてもよい。1つの実施形態において、この担体は、薬学的に許容可能な担体である。「担体」という用語は、希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルであって、活性因子とともに投与されるものをいう。このような担体、および希釈剤としては、リン酸緩衝化生理食塩水、水、油、およびエマルジョン（例えば、油/水エマルジョン、または水/油エマルジョン）のような滅菌液、ならびに種々のタイプの湿潤剤であって、ヒトを含む動物における使用のために、米国連邦政府の監督官庁によって承認されるか、または米国薬局方に列挙された薬剤を含むものが挙げられる。この組成物はさらに、サーファクタント、および他の薬理学的にかつ生物学的に許容可能な担体（アジュバント、賦形剤、または安定剤を含む）の添加を含んでもよい。例示的な油は、石油、動物由来、植物由来、または合成起源の油、例えば、ピーナツ油、大豆油、または鉱油である。一般に、水、食塩水、デキストロース水溶液、および関連の糖溶液、ならびにグリコール（例えば、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）が、特に注射溶液に、好ましい液体担体である。

10

20

【0043】

VP16を用いて処理し、S14P抗体（ペプチドCSAPAPKKGSKKに対する抗体）を用いて染色したHL-60細胞の免疫蛍光は、H2B S14リン酸化が、断片化されたDAPI染色核によって示されるとおり、アポトーシス細胞に局在することを示す染色パターンを、明らかにした。アポトーシスは、エトポシドを用い、そしてKozo Ajiroの文献（Ajiro K. Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells: An association with DNA fragmentation, J Biol Chem. 2000 Jan 7; 275(1): 439~43）のプロトコールに従って誘導された。

【0044】

興味深いことに、アポトーシスに関するH2B Ser14リン酸化の機能は、脊椎動物種にのみあてはまるようである。なぜなら、Ser14および周囲の配列は、カエルからヒトまで、よく保存されているが、ハエでも、ぜん虫でも観察されないからである。このクロマチン修飾は、ヒト、マウス、およびXenopus細胞において実証されているが、 γ -Phos (Ser14) H2B (S14P抗体)での染色は、C. elegansのような無脊椎動物では示されなかった。興味深いことに、H2BにおけるSer32はまた、「脊椎動物付加」であるようであり、そしてこれがまた、少なくともHL-60細胞において、アポトーシスのH2Bリン酸化の部位であり得るといういくつかの証拠が示唆されている。注目に値するのはまた、H2Bアミノ末端のSer36であり、その部位は、酵母からヒトまで保存されており、ハエおよびぜん虫に存在する。H2BにおけるSer36、または無脊椎動物における等価な残基が、アポトーシスプログラムの間にリン酸化されるか否かは未知である。しかし、酵母がこの部位を含むらしいという事実によって、リン酸化は、ここで、それが仮にも存在すれば、アポトーシス以外の生物学的機能を有するという可能性が高くなる。

30

40

【0045】

経時的研究に基づけば、ヒストンH2Bセリン14リン酸化が、DNAラダー化の直前に生じ、このことは、ヒストンH2Bリン酸化が、アポトーシスの間のDNA断片化のための「トリガー」に関与するか、または「トリガー」として作用するというを示唆する。アポトーシスの間にヌクレオソーム間のDNAを切断するいくつかのヌクレアーゼが同定されている。少なくともインビトロにおいては、ヒストンH1、およびHMGが、ヌクレアーゼ機能を増強し、従って、リン酸化されたH2Bは、クロマチンに対する重要なDNase活性の接近可能性を増強するか、クロマチンに対するそれらの補充を促進する、クロマチンの構造的変化をもた

50

らし得る。

【0046】

S14P抗体、またはその生物活性フラグメント、および担体、または希釈剤を含む組成物を、アポトーシスに入ることが運命付けられている細胞、または既にアポトーシスにある細胞を検出するための方法と組み合わせて、用いることができる。さらに本発明の抗体は、アポトーシスプロセスへ誘導され得ない細胞を検出するために用いることが可能であり、従って、前ガン/ガンの細胞および組織を同定するためのマーカーとして機能し得る。この実施形態に従って、細胞を、アポトーシス誘導性因子（例えば、エトポシド、VP-16）の存在下で培養し、次いで、この細胞を固定して、染色し、細胞のかなりの集団が、細胞のコントロールの集団に比べてアポトーシスに入ることができないか否かを決定する。このような方法を、生検において回収された細胞を分析するために用いて、悪性度を診断して、腫瘍の攻撃性、および従って処置のストラテジーの選択を決定することができる。

10

【0047】

1つの実施形態に従って、脊椎動物種（ヒトを含む）における、アポトーシス細胞、またはアポトーシスになりそうな細胞の存在を検出するための方法が提供される。本発明は、脊椎動物種から生物学的サンプルを単離するための最初の工程を包含する。ここでは、生物学的サンプルは、種のクロマチンを含む。代表的には、生物学的サンプルは、個々の脊椎動物種から単離された組織または細胞を含む。1つの実施形態において、クロマチン（すなわち、ヒストンに関連するゲノムDNA）、または個々のヒストンを、生物学的サンプルから精製して、その後、精製されたクロマチン/ヒストンと、S14P抗体とを接触させる。あるいは、脊椎動物種から単離された細胞は固定されて、抗体を用いて直接染色されてもよい。

20

【0048】

アポトーシス細胞の存在を決定するために、個体から単離されたクロマチン、またはヒストンを、標的に対する抗体の特異的結合のための安定な条件下で、S14P抗体と接触させる。非特異的な結合したS14Pは、引き続いて除去されて、クロマチンとS14P抗体との間で形成された免疫複合体は、脊椎動物種におけるアポトーシス細胞の存在の指標として同定および定量される。1つの実施形態において、S14P抗体を標識するか、あるいは標識された二次抗体（S14P抗体、またはヒストンH2Bに特異的）を用いて、免疫複合体の形成を同定し、かつ定量する。形成された免疫複合体の量は、サンプル中に存在するリン酸化されたS14ヒストンH2Bの量に直接比例しており、従ってこの生物学的サンプルの供給源として働いた個体における、アポトーシス活性の指標である。アポトーシス活性の異常なレベルの検出は、ガンを含む種々の疾患状態の診断として働く。

30

【0049】

1つの実施形態に従って、免疫複合体の形成を同定/定量する方法は、細胞、または精製されたクロマチンを固体支持体に固定、または結合させる工程、および標識されたS14P抗体を用いてプローブする工程であって、ここで非特異的に結合した抗体は、緩衝液を用いた洗浄によって除去される工程、を包含する。あるいは、免疫複合体の形成は、免疫沈降によって同定されてもよい。別の実施形態において、S14P抗体は、固体支持体上に固定され、そして固定された抗体は、単離されたクロマチン/ヒストンと接触させられる。次いで、免疫複合体の形成は、緩衝液を用いて、結合された抗体を洗浄すること、およびS14Pエピトープとは別の離れた部位でヒストンH2Bに特異的に結合する二次標識抗体と、この結合抗体とを接触させる工程によって同定される。

40

【0050】

Mst1（哺乳動物Ste20様キナーゼ1；mammalian Ste20-like kinase 1）キナーゼは、その細胞性機能が未知である、遍在的に発現されるセリン/トレオニンキナーゼである。Mst1は、ステライル20様スーパーファミリーのメンバー（その約30までの関連のキナーゼが、ヒトに存在する）である。このキナーゼは、代表的には、アポトーシス、形態形成、および細胞骨格再配列において役割を有する、MAPK経路の上流調節因子としてみなされる。キナーゼは、活性化されたエフェクターカスパーゼ3（C末端調節領域、および活性化された

50

N末端触媒性ドメインを遊離する)によって切断されることが公知である。次いで、この活性化されたドメインは、生物学的な基質が以前に未知である経路において、アポトーシスを誘導する。出願人は、ここで、Mst1の基質の1つが、ヒストン2Bの14番目のセリン残基であることを発見した。

【0051】

本出願におけるデータに基づいて、Mst1のカスパーゼ切断型は、アポトーシスの間のその生物学的標的の1つとして、ヒストンH2Bをリン酸化すると考えられる。次いで、ヒストン末端の共有修飾は、アポトーシスのクロマチンコンパクション、およびDNA断片化を促進して、まだ十分に説明されていない機構による細胞死をもたらす。例えば、Ser14でのヒストンH2Bリン酸化が、アポトーシスの間にクロマチン構造にどのように影響し得るのかは、未知であるが、以前の研究によって、ヒストンH2Bアミノ末端テールが、インビトロクロマチンコンパクションに必須であることが示されている。従って、H2Bリン酸化は、アポトーシスの間のクロマチンコンパクションに関与することが予測される。

10

【0052】

アポトーシスの間のクロマチン変化の機構を理解することは、薬物標的化のための別の手段であって、細胞死を誘導または阻害し得る手段を提供する。凝縮、およびDNA断片化のようなクロマチンの変化は、アポトーシスの最後の方向付けられた段階とみなされている。アポトーシスを被ることによってストレス下で多くの細胞が死ぬということを示唆する、かなりの証拠が存在する。しかし、カスパーゼインヒビターの使用は、最初のストレス(例えば、虚血)が生じた後の細胞死の減少に対して有効ではない。おそらく、エフェクターであるカスパーゼが、規定されたクロマチン変化をもたらす死亡経路を起動した後、カスパーゼはもはや必要ではない。従って、細胞死の有効な防止は、カスパーゼインヒビターを、アポトーシスの間のクロマチン変化に影響するMst1のような下流の活性を標的する薬物と合わせることによって、最高にもたらされ得る。1つの実施形態によれば、カスパーゼインヒビター、およびMst1のインヒビターを用いて細胞を処理することによって細胞死を阻害するための方法が提供される。

20

【0053】

1つの実施形態において、サンプルのキナーゼ活性、より詳細にはMst1活性を検出するための方法が提供される。この方法は、配列CSAPAPKKGSKK(配列番号2)を含むペプチドと、キナーゼ活性を有することが疑われるサンプルとを、所定の長さの時間接触させる工程を包含する。基質に結合するS14P抗体の量は、基質が、所定の時間の間、リン酸化された程度と直接、相関しており、従ってこのサンプルのキナーゼ活性を示す。このアッセイはまた、Mst1活性の潜在的な調節因子(インヒビターを含む)、およびMst1活性の刺激因子についてスクリーニングするために用いることもできる。例えば、1つの実施形態において、Mst1活性のインヒビターについてのスクリーニングの方法は、以下の工程: サンプルを提供する工程であって、ここでこのサンプルが、キナーゼ(すなわち、Mst1)、およびそのキナーゼによってメチル化される基質(例えば、ペプチドCSAPAPKKGSKK; 配列番号2)が、Mst1活性についての基質として用いられる)を含む工程、キナーゼの潜在的なインヒビターをサンプルに投与する工程、ならびにこのサンプルを、代表的には(すなわち、インキュベート化合物の非存在下で)、キナーゼ活性について、好ましい/許容される条件下で、所定の長さの時間インキュベートする工程、を包含する。好ましい実施形態において、このサンプルは、最大キナーゼ活性を仮定して、この基質の少なくとも半分が修飾される時間でインキュベートされる。Mst1キナーゼが基質を修飾することを可能にするのに十分な時間の後に、この基質を、回収して、リン酸化された基質(ただし、リン酸化されていない基質ではない)に特異的に結合する抗体と接触させる。1つの実施形態では、この抗体は、ペプチドCSAPAPKKGSKK(配列番号3)に特異的に結合する。基質ペプチドに結合されるS14P抗体の量を定量することは、サンプル中のキナーゼの活性レベルと直接相関する。同様に、Mst1活性の刺激因子は、同じアッセイ、および同定化合物(基質がリン酸化される速度を増強する)を用いて同定されてもよい。

30

40

【0054】

50

本発明の1つの実施形態に従って、Mst1活性の変更因子を単離するための化合物のライブラリーをスクリーニングする方法が提供される。この方法は、均等に分割されたMst1基質を、別の反応チャンバ（代表的には、マイクロタイターディッシュの別のウェル）中に、最初に提供する工程を包含する。好ましくは、Mst1基質は、配列SAPAPKKGSKK（配列番号2）を含むタンパク質/ペプチドであって、そして1つの実施形態において、このペプチドは、リンカーを直接、または間接的のいずれかで介してマイクロタイターディッシュの表面に共有結合される。次いで、Mst1基質は、Mst1酵素、および多数の化合物ライブラリーと接触させられて、キナーゼ反応混合物を形成する。1つの実施形態において、化合物を調整する単一の候補物を、各々のウェルに添加するが、別の実施形態では、2つ以上の化合物ライブラリーのメンバーを、各々の個々の反応チャンバに添加する。このキナーゼ反応混合物（Mst1基質、Mst1、および化合物を調節する候補物を含む）を、Mst1キナーゼ活性について代表的に許容される条件下（すなわち、Mst1インヒビターの非存在下）でインキュベートする。Mst1基質のリン酸化を可能にするのに十分な適切な長さの時間後に、反応を停止させて基質を回収する。基質がリン酸化される程度（Mst1活性についての確立された標準曲線、またはコントロールの反応試行に対して、同時に）は、Mst1酵素の活性に対する、添加されたライブラリー化合物の効果を調整することに直接関連する。このようなMst1調整化合物は、不適切なアポトーシス活性と関連する疾患（ガンを含む）を処置するための治療剤として用いられ得る。

10

【0055】

Mst1基質のリン酸化を測定することは、アミノ酸配列SAPAPKKGSKK（配列番号2）を基質として、およびS14P抗体を含むポリペプチドを用いて達成することができる。1つの実施形態に従って、共有結合、イオン結合、水素結合、または他の化学的結合を介して、反応容器の表面に直接、または間接的に（すなわち、連結部分を介して）この基質を連結する。1つの実施形態では、この基質は、反応チャンバにMst1基質を添加すること、およびPBS中で4で一晚インキュベートすることによって、この反応チャンバの表面に結合される。あるいは、このペプチドは、当業者に公知の標準的な反応基、および反応を用いて、この反応チャンバの表面に共有結合される。Mst1酵素、および潜在的なインヒビターの存在下で、この基質をインキュベートした後、反応混合物を、この反応チャンバから除いて、このチャンバを緩衝液を用いて必要に応じて洗浄する。次いで、その基質への特定の結合を可能にする条件下で、S14P抗体をこの反応チャンバに添加し、次いで、この反応チャンバを、緩衝液を用いて洗浄して、非特異的に結合した材料を取り除く。1つの実施形態に従って、このペプチドに対する抗体の特定の結合は、ELISA反応を通じて検出される。別の実施形態において、この基質は、反応チャンバに結合されず、そしてこのペプチドに対する抗体の特異的な結合は、免疫沈降によって検出される。

20

30

【0056】

本発明の抗体は、アポトーシスのマーカーとしての使用を含む、多数の潜在的用途を有する。アポトーシスは、ガン、神経変性性疾患、発作などにおいて生じることが公知である。さらに、このマーカーはまた、治療処置の進行を評価、およびモニターするために用いることができる。S14P抗体はまた、アポトーシスの間に生じる、クロマチンの変化のマーカーとして用いることができる。この抗体はまた、ヒストン修飾（H2B ser 14リン酸化）を担うシグナル、およびこの修飾がアポトーシスにどのように関与するのかを研究するために用いることができる。

40

【0057】

本発明の1つの実施形態において、アポトーシス細胞を検出するためのキットが提供される。このキットは、配列SAPAPKKGSKK（配列番号1）を含むリン酸化されたセリン修飾ペプチドに特異的に結合する抗体を含む。1つの実施形態において、このキットは、配列SAPAPKKGSKK（配列番号2）を含むヒストンH2Bペプチドの非リン酸化アミノ末端に特異的に結合する抗体をさらに含む。1つの実施形態において、この抗体は、不溶性の支持体に付着される。ここでこの支持体は、モノリスの固体であるか、または特定の形態のいずれかである。1つの好ましい実施形態において、この抗体は、モノクローナル抗体であり、そして

50

さらなる実施形態においては、この抗体は、標識される。この目的を達成するために、本発明の抗体は、種々の容器（例えば、バイアル、チューブ、マイクロタイターウェルプレート、ボトル、など）内にパッケージングされてもよい。他の試薬は、別の容器に含まれてもよく、キットとともに提供されてもよい；例えば、陽性コントロールサンプル、陰性コントロールサンプル、緩衝液、細胞培養培地など。

【0058】

1つの実施形態に従って、このキットは、キナーゼ活性の基質として作用するペプチドをさらに含む。より詳細には、このペプチドは、配列 SAPAPKKGSKK（配列番号2）を含む。1つの好ましい実施形態では、このペプチド基質は、固体基質に対して、直接、または連結部分を介してのいずれかで、共有結合される。

10

【0059】

本発明のキットは、一旦標的抗原に結合されれば、抗体を検出するための試薬をさらに備えてもよい。必要に応じて、核タンパク質を、免疫学的結合のために接近可能にさせるように、細胞または組織を処理するための試薬（ペプシン、希釈塩酸）がまた、免疫蛍光検出試薬（抗免疫グロブリン抗体、または抗ヒストンH2B抗体（フルオレセインまたはローダミンで誘導体化された）、またはビオチン化抗免疫グロブリン抗体（フルオレセインまたはローダミンと誘導体化されたアビジンまたはストレプトアビジンと一緒に））、免疫組織化学、または免疫細胞化学検出試薬（抗免疫グロブリン抗体、または抗ヒストンH2B抗体（アルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼと誘導体化された）、またはビオチン化抗免疫グロブリン抗体（アルカリホスファターゼ、または西洋ワサビペルオキシダーゼと誘導体化されたアビジン、またはストレプトアビジンと一緒に））と同様に含まれてもよい。1つの実施形態において、このキットは、免疫ペルオキシダーゼ染色のための1つ以上の試薬（西洋ワサビペルオキシダーゼと誘導体化された抗免疫グロブリン抗体、またはビオチン化された抗免疫グロブリン抗体（西洋ワサビペルオキシダーゼと誘導体化されたアビジン、またはストレプトアビジンと一緒に））を、それらのための色素生産性基質（例えば、ジアミノベンジジン）と一緒に、含む。

20

【0060】

（実施例1）

（アポトーシスのマーカーとしてのH2Bのリン酸化セリン14の同定）

（実験手順）

30

細胞培養、薬物、およびUV処理、ならびにタンパク質およびDNAの収集：HL-60細胞を、10% FBSを用いてRPMI中で培養し、一方293T、HeLa、HepG2、およびIMR90を、10% FBSを含むDMEM中で増殖させた。エトポシド、アニソマイシン、および抗Fasを、Sigmaから購入した。アポトーシスを誘導するために、エトポシドについては、20 μg/mL、25ng/mlのアニソマイシン、および15ng/mlの抗Fasの濃度で、薬物を用いた。アポトーシスのUV誘導については、40~100J/m²を用いた（Biorad GS Gene Linker UVチャンバ）。アポトーシスの誘導後、増殖培地を変えて、種々の時間後に収集した。コントロール細胞を、DMSOで処理するか、または偽の処理のいずれかをした。

【0061】

所望の処置の後に、細胞を以下のうちのいずれかに供した：SDS溶解緩衝液（レムリのサンプル緩衝液）における再懸濁、核抽出、ヒストンの酸抽出、またはゲノムDNA抽出。Strahlら（2001）Curr Biol 11,996~1000に記載のように、界面活性剤中での溶解、および低速スピンのよって核を単離した。これらの核を、核タンパク質（以下を参照のこと）について塩抽出するか、または0.4N H₂SO₄中で酸抽出してもよい。氷上での2~4時間のインキュベーションの後、高速の遠心分離を行なって、不溶性のペレットを除去する。5.4%の過コール酸を、上清に添加して、沈殿したヒストンを水に再懸濁した。

40

【0062】

細胞ペレットを10mM Tris pH 9.0, 1mM EDTA, 10mM NaCl, 1% w/v SDS, 1mg/mLのプロテイナーゼKに、4~5時間、50℃で溶解することによって、ゲノムDNAを収集した。タンパク質を除去するために、フェノール/クロロホルム抽出を実施し、次いで、0.3M酢酸ナトリ

50

ウムおよび70%エタノール中にDNAを沈殿させた。遠心分離後、ペレットをTEに再懸濁して、1mg/mL Rnase Aに室温で1時間添加することによって、RNAを消化した。1.2%アガロースTAEゲルにおいて、DNAを分離した。

【0063】

(塩での核抽出、およびインゲルのキナーゼアッセイ)

HL-60由来の核を、20mM Hepes pH7.8、0.42M NaCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA、0.5mM PMSF、0.5mM DTT、25% (v/v) グリセロール中で、氷上で3~4時間抽出した。14Kで20分間の遠心分離後、可溶性画分を単離して、インビトロにおけるキナーゼアッセイ、インゲルのキナーゼアッセイ、およびウエスタンブロットに用いた(以下を参照のこと)。SDS-PAGEは、Laemmliによって記載されたとおり行なった。インゲルアッセイのために、10~12% SDS-PAGEゲルを、0.1 mg/mLのニワトリのコアヒストン、または0.1mg/mLの精製ニワトリH2Bを用いて重合化した。インゲルは、本質的に、(Sasson-Corsiら(1999) Science 285,886-891)に記載のように行なった。要するに、核抽出物、または画分をこれらのゲル中に泳動させた。次いで、SDSを除去するために、このゲルを30mM Tris HCl pH 7.4、1mM DTT、0.1mM EDTA、20% (v/v) イソプロパノール中で、各回について20分間、繰り返し(3回)洗浄した。タンパク質を変性するために、このゲルを8M尿素中、30mM Tris HCl (pH 7.4)、1mM DTT、0.1mM EDTA中で1時間インキュベートした。次いで、このゲルを30mM Tris HCl (pH 7.4)、5mM MgCl₂、2mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、0.05% Tween 40中に、4で一晚浸漬して、タンパク質を変性させた。変性後、50mCiのg-ATPを含有する30mM Tris HCl pH 7.4、5mM MgCl₂、2mM MnCl₂、1mM DTTを用いて、30で2時間、インビトロのキナーゼ反応を実施した。次いで、このゲルをクマーシーブルーを用いて染色し、脱染して、オートラジオグラフィに乾燥させた。

【0064】

(核抽出分画、インビトロキナーゼアッセイ、およびウエスタンブロット)

核抽出物を、Pharmacia SMARTシステムを用いて、superose 6 PC 3.2/300 カラム (Amersham/Pharmacia) において分画した。この溶出物は、200mM NaCl、50mM NaPO₄ (pH7.0)、5mM MgCl₂、20% v/vグリセロールから構成される。流速は、4で40mL/分であった。カスパーゼ切断Mst1を含有するアポトーシス画分は、約66kDaの分子量で外れるが、全長のMst1では約150kDaで外れる。10mLの画分を、インビトロキナーゼ反応、およびウエスタンブロットングのために用いた。インビトロキナーゼアッセイのために、0.5mgのヒストンH2Bを、30mM Tris (pH 7.5)、5mM MgCl₂、10mM DTT、0.1mg/mL マイクロシスチン、10mM ATPに加えて0.5 mCiのg-P32 ATP中で用いた。この反応を30で20分間インキュベートして、P81濾紙上にスポットした。次いで、この濾紙を0.75% H₃PO₄中で洗浄して、シンチレーションカウンターを用いて、P³²取り込みを測定した。非放射性反応(コールド)について、g-P³² ATPは用いなかった。そしてこの反応は、ウエスタンブロット解析のためにSDS-PAGEゲル中に行なった。

【0065】

記載されたとおり (Briggsら (2001) Genes Dev 15, 3286-3295)、ウエスタンブロット分析を実施した。1:1000の -phos (S14) H2B、1:2500の -N-Mst1、1:400の -myc (Santa Cruzの9E10)、1:800の -PARP (UBI)、1:1000の -phos H2A. X (UBI)、および1:5000の -Acetyl H4一次抗体を用いた。HRP結合体化ウサギ二次 (Amersham Pharmacia) を1:5000で用いた。化学発光については、ECLプラスキット (Amersham Pharmacia) を検出に用いた。

【0066】

(アポトーシス細胞培養、およびXenopusの尾部に対する免疫蛍光)

細胞を4%パラホルムアルデヒド中で10分間固定し、次いでPBS中で洗浄した。0.2% Triton X-100で5分間細胞を浸透させ、次いで細胞を2%ヤギ血清PBS中でブロックした。1:500~1:1000の -phos (S14) H2Bを用いて、37で細胞を1時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を、ブロックで3回洗浄した。洗浄後、細胞を、1:500~1:800のヤギ抗ウサギCy3結合体化二次抗体中で1時間インキュベートして、ブロック中で3回洗

浄した。次いで、細胞を含有するカバーガラスを、DAPIを含有するVectashield封入培地中に据え付けた。

【0067】

退縮している尾部を、64期のカエルの仔から切り出して、Bouin fixative (Sigma) 中で2時間固定して、70%エタノール中で一晚洗浄し、脱水し、Histoclear中で浄化して、パラプラスチック中に包埋した。10mmの切片を脱パラフィン処理して、水和して、30分間、0.1% BSA含有PBS - 0.05% Tween20中でブロックした。切片を - phos (S14) H2B (1% BSA含有PBS - 0.05% Tween20中で、1:5000希釈) を用いて、30分間インキュベートして、PBS - Tween中で、各10分間、2回洗浄した。洗浄後、抗ウサギフルオレセイン結合体二次抗体 (1% BSA含有PBS - Tween中で、1:200希釈) を用いて、切片を30分間インキュベートして、PBS - Tween中で、各10分間、2回洗浄した。切片を、Hoechst (2 µg/ml) 含有Antifade (分子プローブ) 中に据え付けた。

10

【0068】

(一過性トランスフェクション、免疫沈降、およびキナーゼアッセイ)

リポフェクタミンプラスキット (Gibco Invitrogen) によってトランスフェクションを行った。トランスフェクションの24~48時間後、293T細胞を、40mM Hepes (pH 7.5)、1% Triton X-100、0.05% NP-40、150mM NaCl、50mM NaF、1mM EDTA、1mM EGTA、10% (v/v) グリセロール、1mM フッ化フェニルメチルスルホニル、0.5mg/mL ミクロシスチン、1mg/mL アプロチニン、1mg/mL ペプスタイン、1mg/mL ロイペプチン中で収集した。上清を14,000rpmでの20分間の遠心分離後に保管した。免疫沈降 (IP) のために、1mgの - myc (Santa Cruzの9E10) を、4 で2時間、上清とともにインキュベートし、次いで、タンパク質G-Sepharose (Amersham Pharmacia) を用いて、4 でさらに2時間沈殿させた。IPを、TBST (20mM Tris pH 7.5、150mM NaCl、0.1% Tween 20) 中で5~6回洗浄した。次いで、ビーズを、1mgのH2B、40mM Hepes 7.5、20mM MgCl₂、0.1mg/mL ミクロシスチン、10mM ATP、1mCi g-P32 ATP中で、30 で30分間インキュベートした。この反応物を、15% SDS-PAGEゲル上で分離して、オートラジオグラフィー用に乾燥させた。

20

【0069】

(結果)

(セリン14でのH2Bのリン酸化は、アポトーシスを被っているHL-60細胞中で強力に誘導される)

30

以前に、インビボの標識研究によって、H2Bリン酸化が、アポトーシスの間、アミノ末端のテールで特異的に起こることが示されている。従って、部位特異的な、H2Bセリン14リン酸化 - 特異的抗体 (S14P抗体) を、生成して、これらの関係をさらに検討した。最初に、HL-60 (ヒト白血球細胞株) 細胞をエトポシド (VP-16) を用いて処理して、アポトーシスを誘導する。種々の長さの時間の処理の後、ヒストンを、酸抽出によって単離して、S14P抗体を用いてウエスタンブロットによって検討した。H2Bリン酸化シグナルは、VP-16処理後約4時間で強力に増強される。アポトーシスの誘導を確実にするため、同一の時点で、並行のサンプルから、可溶性DNAを抽出した。「DNAラダー」の出現 (アポトーシスのDNAフラグメントの指標) は、処理後4時間で、H2B Ser14リン酸化の出現と正確に同時に発生する。さらに、H2B S14リン酸化の増大は、エトポシドに対する曝露時間と相関することが観察された。これらのデータによって、2つの事象が時間的に関連していたことが実証される。

40

【0070】

セリン14でのH2Bのリン酸化が、アポトーシス細胞において特異的に生じることを確認するため、VP-16処理したHL-60細胞を、S14P抗体を用いて免疫染色した。著しいことに、大部分のS14P抗体シグナルが、DAPI染色によって同定される、特徴的なアポトーシス性染色質体に局在したことが見出される。これらのデータによって、セリン14でのH2Bのリン酸化が、アポトーシスのHL-60細胞において特異的に生じることを示唆される。対照的に、他のヒストン抗体 (「有糸分裂の」H3 (Ser10) ホスホ抗体を含む) は、これらのアポトーシス核を染色しない。同様に、S14P抗体は、凝集した有糸分裂の染色体を染色できず

50

、これらの別個のヒストンリン酸化事象の生物学的特異性（有糸分裂対アポトーシス）を連想させる。VP16の予期されないあらゆる効果を除外するために、他のアポトーシス誘導因子を、異なる細胞株で試験した。表1に要約したとおり、異なる細胞株、および周知のアポトーシス誘導因子がまた、アポトーシスの間、種々の程度にかかわらず、H2B (Ser14) リン酸化をもたらした。従って、本発明者らのデータによって、セリン14でのヒストンH2Bリン酸化が、複数の哺乳動物細胞株において、凝縮したアポトーシスクロマチンに関連していることが明白に実証される。

アポトーシスを被っている種々の細胞株が、H2B S14リン酸化の増大を示す

【表1】

試験した細胞株	細胞傷害性因子	H2B S14 Phos誘導のレベル
HL-60	エトポシド (VP16)	高
	UV	高
	抗-Fas	高
	アニソマイシン	高
NIH3T3	UV	高
HeLa	UV	中
IMR90	UV	中
HepG2	MMS	中
293T	UV	低

10

細胞傷害性因子の処理後、細胞を収集した。 - Phos (S14) H2Bを用いるウエスタンブロットによって、H2B S14リン酸化のレベルを決定する。

20

【0071】

(H2B (Ser14) リン酸化は、発生上のスカルプチャリング事象の間のプログラムされた細胞死の間に増大される)

H2B (Ser14) リン酸化がまた、より生物学的なモデルにおいてアポトーシスに関連しているか否かを決定するために、プログラムされた細胞死が周知であり、そして十分特徴付けられている動物において、この修飾を検討した。ヒストンH2Bアミノ末端の一次アミノ酸配列の検査によって、セリン14が、Xenopusを含む、脊椎動物種の中で保存されていることが明らかになる。形態発生の間、再吸収が、Xenopus laevisの尾部で生じ、これらの細胞のクラスターは、発生上のプログラムされたアポトーシスによって死ぬ。64期のカエルの仔由来の退縮中の尾部を、S14P抗体を用いる免疫蛍光によって検討した。この抗体からのシグナルは代表的に、この尾部におけるアポトーシス細胞のポケットを染色し、そしてHoechst - denseアポトーシス凝縮核と、正確に同時局在する。これらのデータによって、H2B (Ser14) リン酸化がまた、正常なXenopusの発生の際にアポトーシス細胞において生じることが示される。対照的に、非アポトーシスの染色は、S14P抗体を用いて、Caenorhabditis、またはDrosophilaにおいて、セリンがこれらの無脊椎動物において存在しないという観察と一致して観察される。

30

【0072】

(アポトーシス細胞由来の核抽出物は、34kDa H2B Ser14キナーゼを含む)

H2B (Ser14) リン酸化と、アポトーシスとの間の関連をさらに理解するため、このリン酸化事象の責任を担うキナーゼを同定するための試みを行なった。HL - 60細胞が、これらの研究の開始点として選択された。なぜなら、H2BのSer14リン酸化は、VP - 16処理されたHL - 60細胞中で強力に増大されるからである。偽の処理をしたHL - 60細胞、およびVP - 16処理をしたHL - 60細胞由来の核抽出物を、予備的なキナーゼアッセイ、およびウエスタンブロットのために用いた。最初に、「アポトーシスの」核抽出物が、刺激された細胞で大きく増大される、H2B Ser14キナーゼ活性を含むことが決定された。

40

【0073】

ヒストンH2Bに基づく、インゲルキナーゼアッセイを用いて、粗アポトーシス抽出物における、潜在的なアポトーシスH2Bキナーゼの分子量を、研究して、観念的に決定する。基

50

質として、H2B、またはコアヒストンの混合物のいずれかを用いて、突出したアポトーシス誘導性ヒストンキナーゼを検出した。多数のバンドが、共通して、H2B含有ゲルと、「基質なし」ゲルとの間に出現するが（自己リン酸化に起因する可能性が高い）、約34kDaの見かけの分子量を有する、1つのバンドが、H2B含有ゲルにおいて一貫して検出される。これらのデータによって、刺激された（アポトーシスの）HL-60核抽出物が、誘導された34kDa H2Bキナーゼ（本明細書において、以降は、34H2Bapok）を含むことが示唆される。

【0074】

Mst1（哺乳動物ステライル20）は、約34kDaのカスパーゼ活性化Ser/Thrタンパク質キナーゼであり、その活性は、いくつかの生物学的設定下でアポトーシスを誘導するのに原因となる役割を果たす。しかし、プログラムされた細胞死に対する、このキナーゼの生物学的標的は、以前には未知であった。34H2Bapokが、実際にMst1であるか否かを決定するため、VP-16刺激されたHL-60細胞から調製された核抽出物を、最初にMst1に対するアミノ末端抗体（ α -N-Mst1；この抗体は、Mst1のN末端触媒性ドメインを検出する（Gravesら（1998）EMBO 17,2224~2234））を用いてプローブして、Mst1のカスパーゼ切断型が、インゲルH2Bキナーゼアッセイによって検出されるように、34H2Bapokを含有する画分中に存在するか否かを決定した。ウエスタンブロット解析によって、Mst1の切断型が、これらの核抽出物に存在すること、およびその分子量が、アポトーシス誘導性H2Bキナーゼに対して、もし同一でなくても、同様であることが示される。

10

【0075】

（Mst1のカスパーゼ切断型は、H2B（Ser14）キナーゼ活性で同時断片化する）
アポトーシス誘導性H2Bキナーゼをさらに特徴付けるため、アポトーシス核抽出物を、サイズ排除カラム（Superose 6）を用いて分画して、このキナーゼを部分的に精製した。「アポトーシスの」、および「正常な」核抽出物からのH2Bキナーゼ活性の比較によって、アポトーシス抽出物の画分18は、偽の処理をした抽出物由来の同じ画分よりも、H2Bキナーゼ活性が2~3倍濃いことが示された。この濃さは、画分18におけるポリペプチドの自己リン酸化の増大には起因しない。なぜなら、基質なしに実施したキナーゼアッセイでは、コントロールと、アポトーシス画分との間の変化が示されなかったからである。他の画分は、ヒストンH2Bキナーゼ活性を示すが、偽の処理をした抽出物と、VP16処理をした抽出物との間では有意な相違は検出されず、このことは、アポトーシス誘導性H2Bキナーゼが、これらの画分に存在しないことを示唆する。画分18を含んだH2Bキナーゼ活性が、Ser14
30
でH2Bをリン酸化することを確認するため、基質として非放射性ATP、およびH2Bを用いるキナーゼ反応を実施して、S14P抗体を用いるウエスタンブロットによって解析した。予想通り、画分18のみが、セリン14キナーゼ活性を増強した。

20

30

【0076】

α -N-Mst1を用いた、画分18のすぐ周辺の画分のウエスタンブロットによって、アポトーシス抽出物由来の画分18のみが、Mst1のカスパーゼ切断型を含むことが示される。まとめると、アポトーシスの核抽出物から調製された画分18における、H2B Ser14キナーゼ活性の増大、およびMst1のカスパーゼ活性型の存在の同時出現によって、Mst1切断産物が、34H2Bapokであることが強力に示唆される。この仮説をさらに立証するため、基質としてニワトリH2Bを用い、正常な核抽出物、およびアポトーシスの核抽出物からの画分18を用いて、インゲルのキナーゼアッセイを、実施した。このインゲルのキナーゼアッセイによって、この画分が実際に、コントロール画分には存在しない、34kDaのH2Bキナーゼ活性を含むことが示される。従って、これらのデータは、34H2Bapokが、Mst1の切断型であることと一致する。

40

【0077】

（Mst1は、インビトロ、およびインビボにおいて、セリン14でヒストンH2Bをリン酸化し得る）

Mst1が、ヒストンH2Bをリン酸化し得るか否かを直接試験するため、myc-タグ化全長（FL）型のMst1、キナーゼ死滅（KD）型のMst1、またはC末端短縮型（DC）のMst1のいずれかを含有する、CMV駆動プラスミドを、293T細胞にトランスフェクトした。次いで、mycに対

50

する抗体を用いる、これらの型のMst1の免疫沈降 (IP) を、 $g(^{32}P)$ - ATPの存在下で、またはコールドATPとともに、そしてヒストンH2Bを基質として用いて、実施したインビトロキナーゼアッセイによって解析した。コールドの反応を、 γ - myc、および γ - phos (S14) H2Bを用いたウエスタンブロッティングによって解析した。H2Bの強力なリン酸化を、全長のMst1、およびDC Mst1の両方を用いて検出した。その結果は、DC Mst1がMst1のカスパーゼ切断型を模倣するという知見と一致する。対照的に、キナーゼ死滅型Mst1 (シングルポイントミューテーションを含む) は、H2Bをリン酸化せず、このことは、Mst1 IPに関連する他のヒストンキナーゼの可能性に反論する。Mst1によるヒストン優先を決定するために、基質として個々のコアヒストンを用いて、同様のIPキナーゼ反応を実施した。ここでも、Mst1 FL、およびDCは、ヒストンH2Bについて強力な優先を示す。まとめると、これらのデータによって、H2Bが、インビトロにおいてMst1の生物学的に関連する核基質であることが示唆される。

10

【0078】

Mst1が、Ser14でH2Bをリン酸化し得るか否かを試験するため、H2B、および非放射性ATPを用いて、同様のIPキナーゼ反応を実施した。次いで、Mst1タンパク質発現レベルについては γ - myc、そしてS14P抗体を用いて、ウエスタンブロッティングによって反応を解析した。予想どおり、Mst1のFL、およびDCの両方が、S14P抗体によって検出されるとおり、Ser14でH2Bをリン酸化するが、キナーゼ死滅Mst1はリン酸化しない。従って、全長のMst1、および短縮型Mst1は、Ser14でヒストンH2Bを直接リン酸化し得る。

【0079】

Mst1は、HeLa細胞において過剰発現される場合、アポトーシス様クロマチンコンパクションを誘導し得る。Mst1が、HeLa細胞で発現される場合、H2Bをリン酸化し得るか否かを決定するため、全長Mst1、およびキナーゼ死滅バージョンのMst1を、HeLa細胞にトランスフェクトして、次いで、S14P抗体を用いて、細胞抽出物のウエスタンブロットをプローブした。H2B Ser14リン酸化の増大は、Mst1全長構築物 (WT) を保有する細胞においてのみ検出された。キナーゼ死滅変異体を用いた場合、かなり少ないシグナルが検出される。これらのデータによって、Mst1が、これらのアッセイ条件下で、細胞中で、H2B Ser14キナーゼとして機能すること、およびH2Bが、Mst1についての重要な生物学的な基質であり得る (なぜなら、それは、アポトーシスの染色体凝縮に関連するから) ことが示唆される。

20

【0080】

(H2B Ser14リン酸化の反応速度論は、アポトーシスの間のMst1の切断と同様である) Mst1切断が、アポトーシスの間にH2B Ser14リン酸化を確立するのに重要である場合、両方の事象の反応速度論は、同様であるはずである。HL-60細胞を、アポトーシスを被るように誘導し、そしてウエスタン解析のために30分間隔で収集した。経時的解析 (S14P抗体、および γ - N - Mst1抗体を用いてウエスタンブロットをプローブする) によって、H2Bリン酸化の発現が、誘導後2時間でカスパーゼ切断Mst1の最初の出現と同時に出現することが示される。アポトーシスのためのマーカーとして、同一のプロットをまた、細胞がアポトーシスを被るときに切断する、 γ - PARP (ポリ (ADP - リボース) ポリメラーゼを用いてプローブし、そして単離されたゲノムDNAを、特徴的なDNAラダーの出現について評価した。興味深いことに、PARPの切断、およびDNAラダーの出現は、H2Bリン酸化、およびMst1の切断の両方の直後に (誘導後約2.5時間) 生じる。タイミングの相違は、これらのアポトーシスマーカーの間の検出感度の相違を反映し得るが、このデータによって、H2Bリン酸化が、DNAラダー化に先行し、従って、依然として未知の機構によってアポトーシスDNA断片化を確立することにおいて役割を果たし得ることが示唆される。より重要なことには、カスパーゼ切断Mst1の発現は、アポトーシス誘導の時間経過の間のH2B Ser14リン酸化の出現に密接に関連している。

30

40

【0081】

(アポトーシスの間のH2Bセリン14リン酸化と、他のヒストン修飾との間の反応速度論の比較)

ヒストンH4のアセチル化は、アポトーシスの間に低下する。なぜなら、細胞が、凝縮、お

50

よびDNA断片化を被り、そしてより詳細には、ヒストンH4脱アセチル化が、H2Bリン酸化の出現の直後に生じるからである。従って、H2Bリン酸化が、アポトーシスのクロマチンコンパクションの間の過剰アセチル化された(活性の)クロマチンドメインの損失に起因して生じるという可能性は低いようである。H2A.Xリン酸化はまた、二本鎖DNA分解に関連している。VP16(エトポシド)も、DNA分解を生じるので、H2A.Xリン酸化の反応速度論をまた評価した。予想どおり、H2A.Xリン酸化は、VP16処理の1時間内に生じ、このことは、VP16によって誘導されるDNA分解が、アポトーシス経路の初期に生じることを示唆する。H2B(Ser14)リン酸化は、H2A.Xリン酸化よりも後に、ただし他の周知のアポトーシスマーカーの前に(または同時に)生じるので、これらのデータによって、H2Bリン酸化は、DNA分解に単純に関連しないことが示唆される。むしろ、H2Bリン酸化は、HL-60細胞において、アポトーシスについての固有のクロマチンマーカーであると考えられる。

10

【0082】

(H2B Ser14リン酸化、およびMst1の切断は、カスパーゼ3依存性である)
カスパーゼは、アポトーシスプログラムの多くの不可欠の部分に参与しているので、本発明者らは、もし存在するなら、H2B Ser14リン酸化がどの程度まで、活性化されたエフェクターカスパーゼによって制御されるかを決定しようと努力した。さらに、Mst1切断は、カスパーゼ3に依存性であり、次いで、核輸出シグナル(NES; 活性化されたカスパーゼ3によって脱落される)を失っているMst1のN末端切断型は、核に転位される。次いで、短縮されたMst1は、核に移動して、クロマチンコンパクション、およびアポトーシスを誘導する。

20

【0083】

H2B(Ser14)リン酸化が、Mst1の切断に依存する場合、このヒストン修飾は、DEVDペプチドのような立証されたカスパーゼ3インヒビターに感受性であるはずである。この予測を試験するため、HL-60細胞を、種々の量のz-DEVD-fmk(Trevigen)を用いてプレインキュベートし、その後引き続き、VP16を用いて4時間処理した。次いで、細胞抽出物を、ウエスタン解析のために収集した。Mst1 N末端、およびH2B S14 phos抗体を用いるウエスタンプロットによって、200mMのz-DEVD-fmkを用いたインキュベーションが、Mst1切断、およびH2B Ser14リン酸化の両方を阻害したことが示された。さらに低用量の、20mMのz-DEVD-fmkでは、全長のMst1、およびH2Bリン酸化を超える短縮されたMst1の割合のごく軽度の低下が観察される。これらのデータによって、H2B Ser14リン酸化は、アポトーシスの間のMst1自体の切断と同様に、カスパーゼ3依存性であることが実証される。従って、H2Bは、カスパーゼ3生成された型のMst1によって、Ser14でインビボでリン酸化される可能性が高い。さらに、このデータによって、H2Bが、この活性についての以前に認識されていない核基質であること、およびSer14におけるH2Bのリン酸化が、少なくとも脊椎動物において、アポトーシスの「ヒストンコード」の一部であるという可能性の示唆が示される。

30

【 図 1 】

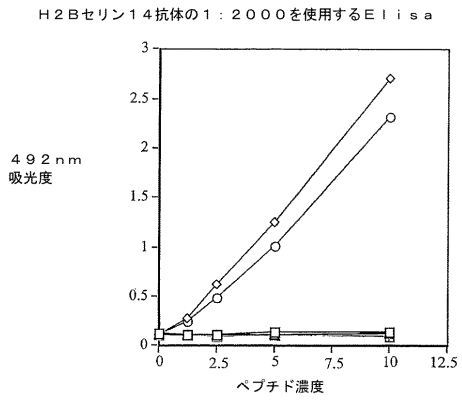


FIG. 1

【国際公開パンフレット】

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/014142 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C07K [JP/JP]; Takada 66-2, Kashiwa-shi, Chiba-ken 277-0861 (JP).
- (21) International Application Number: PCT/US02/24405
- (22) International Filing Date: 1 August 2002 (01.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
 - 60/310,015 3 August 2001 (03.08.2001) US
 - 60/364,386 14 March 2002 (14.03.2002) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): UNIVERSITY OF VIRGINIA PATENT FOUNDATION [US/US]; 1224 West Main Street, Suite 1-110, Charlottesville, VA 22903 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): ALLIS, C., David [US/US]; 21 Old Farm Road, Charlottesville, VA 22903 (US). CHEUNG, Wang, L. [US/US]; 315 15th Street, Apt. 102, Charlottesville, VA 22903 (US). AJIRO, Kozo
- (74) Agent: BREEN, John, P.; University of Virginia Patent Foundation, 1224 West Main Street, Suite 1-110, Charlottesville, VA 22903 (US).
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GN, GW, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

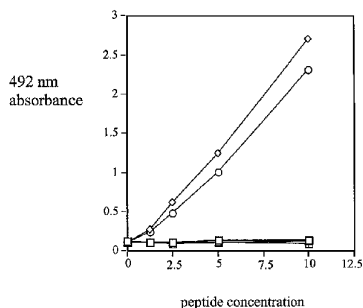
[Continued on next page]



WO 03/014142 A2

(54) Title: PHOSPHORYLATED HISTONE H2B AS AN APOPTOSIS MARKER

Elisa using 1:2000 of H2B serine 14 antibody



(57) Abstract: The present invention is directed to the generation of antibodies against an α -phosphorylated serine 14 residue on Histone 2B. This posttranslational modification of the amino terminus of Histone 2B is associated with cells that are about to enter or are already undergoing apoptosis. These antibodies are useful in identifying apoptotic cells and serve as diagnostic and screening tools. The present invention is also directed to the Mst1 kinase and the isolation of compounds that modulate the activity of Mst1. This kinase has been identified as the enzyme responsible for creating this posttranslational modification on Histone 2B *in vivo*.

WO 03/014142 A2 

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Phosphorylated Histone H2B as an Apoptosis Marker**US Government Rights**

This invention was made with United States Government support
5 under Grant No. GM 40922, awarded by the National Institutes of Health. The United States Government has certain rights in the invention.

Related Application

This application claims priority under 35 USC §199(e) to US
10 Provisional Application Serial Nos. 60/310,015, filed August 3, 2001, 60/364,386, filed March 14, 2002 and 60/375,892, filed April 26, 2002, the disclosures of which are incorporated herein.

Field of the Invention

15 The present invention is directed to antibodies that bind to histone epitopes created by posttranslational modification of the histone protein, compositions comprising such antibodies, and the use of such compositions as diagnostic and screening tools. More particularly, the present invention is directed to a histone modification that is associated with apoptosis.

20

Background of the Invention

Apoptosis is programmed cell death, a naturally occurring process
involved in both the development and aging of cells. It is the process whereby the
body can rid itself of unwanted, old, or damaged cells. Apoptosis is the physiological
25 counterpart of cell proliferation. It is essential for both biological processes such as normal tissue turnover, embryonic development, and maturation of the immune system, including pathological processes, such as hormone deprivation, thermal stress and metabolic stress. (Wyllie, A. H., in Bowen and Lockshin (eds.) Cell Death in Biology and Pathology (Chapman and Hall, 1981), at 9-34).

30

As more is learned of programmed cell death it is becoming apparent that
there may be several different mechanisms in which programmed cell death occurs.
In one embodiment, the cell death is characterized by a decrease in cell volume, a

WO 03/014142

PCT/US02/24405

condensation of chromatin, cellular budding, and the fragmentation of DNA into a ladder of 180 base pair (bp) oligomers with 3'-OH free ends, a hallmark of apoptosis. Cell membranes maintain their integrity through the process, and lysosomes remain intact. No inflammatory response occurs during the process of apoptosis. Affected cells undergo phagocytosis by adjacent normal cells and by some macrophages. Alternatively, other mechanisms of cell death have recently been described wherein the cell organelles themselves are fragmented. As used herein the term "apoptosis" is intended to cover all forms of programmed cell death.

The biochemical effector pathways that underlie the apoptotic mechanisms are as yet unknown. It has been suggested that the apoptotic mechanism involves one or more Ca^{2+}/Mg^{2+} -dependent endogenous endonucleases (Arends et al., (1990) *Am. J. Pathol.* 136:593-608); transglutaminase activity (Fesus et al., (1987) *FEBS Lett.* 224:104-108; Taress et al., (1992) *J. Biol. Chem. Cell* 75:653-660); and the generation of oxygen radicals (Hockenberry et al., (1993) *Cell* 75:241-251; Butke and Sandstrom (1994) *Immun. Today* 15:7-10). It appears that gene expression is required for apoptosis as this process can be stopped by inhibitors of RNA or protein synthesis (Martin et al., (1988) *J. Cell Biol.* 106:829-844).

Apoptosis can be activated by a number of intrinsic or extrinsic signals. These signals include the following: mild physical signals, such as ionization radiation, ultraviolet radiation, or hyperthermia; low to medium doses of toxic compounds, such as azides or hydrogen peroxides; chemotherapeutic drugs, such as etoposides and teniposides, cytokines such as tumour necrosis factors and transforming growth factors; and stimulation of T-cell receptors.

The fundamental unit of eukaryotic chromatin is the nucleosome, a particle containing 146 base pairs of DNA wrapped around a histone core octamer (two copies each of histone H3, H4, H2A, and H2B). How nucleosomal arrays are then packaged into higher-order chromatin fibers that, in turn, define distinct functional domains is poorly understood. An increasing body of evidence suggests that histone post-translational modifications (acetylation, phosphorylation, methylation, etc.) provide one mechanism that is central to this process in some instances. In addition, recent evidence suggest that distinct patterns of covalently-modified histones can act as 'signaling platforms' (i.e. a 'histone code') to recruit and

WO 03/014142

PCT/US02/24405

bind nuclear factors that mediate downstream functions by mechanisms that remain unclear.

Given the intimate association between histones and DNA, changes in the integrity of DNA and the state of chromatin compaction that characterize apoptosis may be mediated by histone modifications. However, to date, histone modifications that are specifically induced during apoptosis remain poorly defined. Mitotic chromatin condensation, for example, is associated with histone H3 phosphorylation at serine 10, but this modification has not been consistently observed during apoptotic-induced chromatin condensation (reviewed in Cheung et al., (2000) Cell 103, 263-271. In contrast, phosphorylation of a relatively minor histone variant, H2A.X, increases during early stages of DNA fragmentation in apoptosis (Rogakou et al., (2000) J Biol Chem 275, 9390-9395). However, H2A.X phosphorylation (at serine 139) correlates with all known double-stranded DNA breaks suggesting that it acts more as a 'DNA-damage sensor' than a specific chromatin mark linked to the apoptotic process.

In mammalian cells, the only major core histone modification that has been uniquely associated with apoptosis is histone H2B phosphorylation, although the responsible sites of phosphorylation in its amino terminus are poorly defined. In keeping, the H2B amino terminal tail, but not other histone tails, is essential for chromatin condensation in *Xenopus* cell-free systems that induce chromatin condensation.

The present invention is directed to a specific histone (H2B) post-translational modification (serine14 phosphorylation) that specifically correlates with the onset of apoptotic chromatin condensation and DNA fragmentation in human HL-60 cells. Furthermore, the present invention describes an antibody that specifically binds to this apoptosis marker (hereafter the "S14P antibody") and the use of that antibody to diagnose and treat various disease states.

When apoptosis is unregulated, disease results. Unregulated apoptosis is involved in diseases such as cancer, heart disease, neurodegenerative disorders, autoimmune disorders, and viral and bacterial infections. Cancer, for example, not only triggers cells to proliferate but also blocks apoptosis. Cancer is partly a failure of

WO 03/014142

PCT/US02/24405

apoptosis wherein the orders for the cells to kill themselves by apoptosis are blocked. New cancer treatments that involve inducing apoptosis are being researched.

Summary of the Invention

5 The present invention is directed to a marker uniquely associated with programmed cell death. The marker is a post translational modification (phosphorylation of serine 14) of the amino-terminus of histone H2B. More particularly, the present invention is directed to antibodies that specifically bind to the epitope created by the modification of histone H2B and serve as markers of cells
10 undergoing apoptosis. The present invention is also directed to the kinase, Mst1, responsible for phosphorylating serine 14 of histone H2B and assays for identifying compounds capable of modifying Mst1 activity.

Brief Description of the Drawings

15 Fig. 1 shows the data from an ELISA demonstrating that the S14P antibody recognizes only the H2B phosphoserine 14 peptides, and this activity can be inhibited by the H2B phosphoserine 14 peptide but not the unmodified peptide. The peptides were coated onto ELISA plates in the indicated amounts by incubating the peptides in PBS overnight at 4°C. The well was blocked using PBST (PBS containing
20 0.5%Tween-20) for 1 hour and washed three times with PBST. Anti-phos(S14) H2B serum was added at 1:2000 dilution to each well for 2 hours and then followed by more washing. Horseradish peroxidase conjugated rabbit secondary antibody at 1:5000 in PBST was added to each well for 2 hours. After three washes using PBST, o-phenylenediamine dihydrochloride peroxidase substrate (Sigma) was added and
25 quantitated by absorbance at OD of 492nm. The peptides immobilized and tested include: S14 (SEQ ID NO: 2; □); S14P (SEQ ID NO: 3; ◇); S14P with ELISA conducted using sera pre-incubated with 1 mg/ml of S14 competitor peptide prior to the ELISA. (○); S14P with ELISA conducted using sera pre-incubated with 1 mg/ml of S14P competitor peptide prior to the ELISA (Δ).

30

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Detailed Description of the Invention**Definitions**

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

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

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

1. peptides wherein one or more of the peptidyl --C(O)NR-- linkages (bonds) have been replaced by a non-peptidyl linkage such as a --CH₂-carbamate linkage (--CH₂OC(O)NR--), a phosphonate linkage, a --CH₂-sulfonamide (-CH₂-S(O)₂NR--) linkage, a urea (--NHC(O)NH--) linkage, a --CH₂-secondary amine linkage, or with an
20 alkylated peptidyl linkage (--C(O)NR--) wherein R is C₁-C₄ alkyl;
2. peptides wherein the N-terminus is derivatized to a --NRR₁ group, to a --NRC(O)R group, to a --NRC(O)OR group, to a --NRS(O)₂R group, to a --NHC(O)NHR group where R and R₁ are hydrogen or C₁-C₄ alkyl with the proviso that R and R₁ are not both hydrogen;
- 25 3. peptides wherein the C terminus is derivatized to --C(O)R₂ where R₂ is selected from the group consisting of C₁-C₄ alkoxy, and --NR₃R₄ where R₃ and R₄ are independently selected from the group consisting of hydrogen and C₁-C₄ alkyl.

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

30 follows: Phenylalanine is Phe or F; Leucine is Leu or L; Isoleucine is Ile or I; Methionine is Met or M; Norleucine is Nle; Valine is Val or V; Serine is Ser or S; Proline is Pro or P; Threonine is Thr or T; Alanine is Ala or A; Tyrosine is Tyr or Y;

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Histidine is His or H; Glutamine is Gln or Q; Asparagine is Asn or N; Lysine is Lys or K; Aspartic Acid is Asp or D; Glutamic Acid is Glu or E; Cysteine is Cys or C; Tryptophan is Trp or W; Arginine is Arg or R; Glycine is Gly or G, and X is any amino acid. Other naturally occurring amino acids include, by way of example,
5 4-hydroxyproline, 5-hydroxylysine, and the like.

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

- I. Small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues:
Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;
- 10 II. Polar, negatively charged residues and their amides:
Asp, Asn, Glu, Gln;
- III. Polar, positively charged residues:
His, Arg, Lys;
- IV. Large, aliphatic, nonpolar residues:
15 Met, Leu, Ile, Val, Cys
- V. Large, aromatic residues:
Phe, Tyr, Trp

As used herein, the term "purified" and like terms relate to the isolation
20 of a molecule or compound in a form that is substantially free (i.e. at least 60% free, preferably 80% free, and most preferably greater than 90% free) from other components with which they are naturally associated.

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

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

WO 03/014142

PCT/US02/24405

surface of such supports may be solid or porous and of any convenient shape.

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

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

10 As used herein, the term "treating" includes alleviating the symptoms associated with a specific disorder or condition and/or preventing or eliminating said symptoms. For example, treating cancer includes preventing or slowing the growth and/or division of cancer cells as well as killing cancer cells.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier"
15 encompasses any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water and emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents.

As used herein, the term "antigenic fragment of H2B serine 14"
20 encompasses both natural peptide fragments of the amino terminus of histone H2B (including the peptide fragments SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) and SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2)) and synthetic equivalents of those fragments.

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

25 As used herein the letter S in bold face type (**S**), when used in the context of an amino acid sequence, will represent a serine amino acid that has been phosphorylated. The terms "Ser(P)" or "S(P)" as used herein, also refer to the phosphorylated form of the amino acid serine.

As used herein, the term "S14P antibody" is an antibody that binds
30 specifically to the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3); and the term "S14 antibody" is an antibody that binds specifically to the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).

WO 03/014142

PCT/US02/24405

As used herein, the term "biologically active fragments" of the S14P antibody encompasses natural or synthetic portions of the respective full-length antibody that are capable of specific binding to the peptide CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3).

5 A "linker" is a molecule (or group of molecules) that serves to chemically link two disparate entities. For example a peptide linker chemically links two polypeptides via a peptide bond.

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

10

The Invention

The present invention is directed to the discovery that modification of the amino terminus of the histone H2B protein, and homologous proteins from other species, can serve as a marker of apoptosis. More particularly, applicants have discovered that the amino terminus of histone H2B protrudes from the surface of the chromatin and the serine amino acid at the 14th position from the amino terminus (Ser14) is selectively phosphorylated *in vivo* in cells that will undergo or have already begun the process of apoptosis. Therefore, in accordance with one aspect of the present invention phosphorylation of Ser14 of histone H2B serves as a marker of apoptosis in vertebrate species, and antibodies recognizing this portion of the protein have use as important diagnostic tools.

One aspect of the present invention is directed to antigens used to produce antibodies specific to the amino terminus of the phosphorylated histone H2B protein (Phos H2B). In one embodiment, a purified antigenic fragment of the amino terminus of Phos H2B or a synthetic equivalent thereof is provided. The antigen comprises an amino acid fragment comprising the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3), wherein C is an artificial cysteine residue added to the native H2B sequence. In one preferred embodiment the antigen consists of the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) or an amino acid sequences that differ from SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) by one or more conservative amino acid substitutions. The present invention also encompasses an antigen that comprises the

25
30

WO 03/014142

PCT/US02/24405

non-phosphorylated H2B sequence: SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2). In an alternative embodiment, the purified antigen comprises a polypeptide linked to a suitable carrier, such as bovine serum albumin or Keyhole limpet hemocyanin. The present invention is also directed to nucleic acid sequences that encode for the peptide
5 sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).

In one preferred embodiment a Phos H2B antibody is provided that binds specifically to the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3; the "S14P antibody"), and an Unmodified H2B antibody is provided that binds specifically to the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2; the "S14 antibody").

10 One method used to generate the S14P antibody or the S14 antibody involves administration of the respective antigen to a laboratory animal, typically a rabbit, to trigger production of antibodies specific for the antigen. The dose and regiment of antigen administration to trigger antibody production as well as the methods for purification of the antibody are well known to those skilled in the art.
15 Typically, such antibodies can be raised by administering the antigen of interest subcutaneously to New Zealand white rabbits which have first been bled to obtain pre-immune serum. The antigens can be injected at a total volume of 100 ul per site at six different sites. Each injected material will contain synthetic surfactant adjuvant pluronic polyols, or pulverized acrylamide gel containing the protein or polypeptide
20 after SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

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

The present invention also encompasses monoclonal antibodies that specifically bind to either the H2B S14P antigen (i.e. a fragment of the amino

WO 03/014142

PCT/US02/24405

terminus of histone H2B containing the phosphorylated serine 14 amino acid) or the unmodified H2B S14 antigen (i.e. a fragment of the amino terminus of histone H2B containing the unphosphorylated serine 14 amino acid). Monoclonal antibody production may be effected using techniques well-known to those skilled in the art.

5 Basically, the process involves first obtaining immune cells (lymphocytes) from the spleen of a mammal (e.g., mouse) which has been previously immunized with the antigen of interest either *in vivo* or *in vitro*. The antibody-secreting lymphocytes are then fused with myeloma cells or transformed cells, which are capable of replicating indefinitely in cell culture, thereby producing an immortal, immunoglobulin-secreting

10 cell line. The resulting fused cells, or hybridomas, are cultured, and the resulting colonies screened for the production of the desired monoclonal antibodies. Colonies producing such antibodies are cloned, and grown either *in vivo* or *in vitro* to produce large quantities of antibody. One embodiment of the invention is directed to a hybridoma cell line which produces monoclonal antibodies which bind the H2B S14P

15 or the H2B S14 antigens. A description of the theoretical basis and practical methodology of fusing such cells is set forth in Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), which is hereby incorporated by reference.

In addition to whole antibodies, fragments of antibodies can retain binding specificity for a particular antigen. Antibody fragments can be generated by

20 several methods, including, but not limited to proteolysis or synthesis using recombinant DNA technology. An example of such an embodiment is selective proteolysis of the H2B S14P or the H2B S14 antibody by papain to generate Fab fragments, or by pepsin to generate a F(ab')₂ fragment. These antibody fragments can be made by conventional procedures, as described in J. Goding, *Monoclonal*

25 *Antibodies: Principles and Practice*, pp. 98-118 (N.Y. Academic Press 1983), which is hereby incorporated by reference. Other fragments of the H2B S14P or the H2B S14 antibodies which retain the specific binding of the whole antibody can be generated by other means known to those skilled in the art.

In one embodiment the antibodies are labeled. It is not intended that

30 the present invention be limited to any particular detection system or label. The antibody may be labeled with a fluorophore, a radioisotope, or a non-isotopic labeling reagent such as biotin or digoxigenin; antibodies containing biotin may be detected

WO 03/014142

PCT/US02/24405

- using "detection reagents" such as avidin conjugated to any desirable label such as a fluorochrome. In one embodiment the histone specific antibodies of the present invention are indirectly labeled through the use of a secondary antibody, wherein the secondary antibody is labeled and is specific for the primary (histone specific) antibody. Alternatively, the histone specific antibody may be directly labeled with a radioisotope or fluorochrome such as FITC or rhodamine; in such cases secondary detection reagents may not be required for the detection of the labeled probe. The presence of the modified histones in the blood can then be detected through the use of the relevant labeled antibody.
- The antibodies or fragments of the present invention can be combined with a carrier or diluent to form a composition. In one embodiment, the carrier is a pharmaceutically acceptable carrier. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient or vehicle with which an active agent is administered. Such carriers and diluents include sterile liquids such as phosphate buffered saline solution, water, oils and emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents including those agents approved by a regulatory agency of the US Federal government or listed in the US Pharmacopeia for use in animals, including humans. The compositions may further include the addition of a surfactant and other pharmaceutically and physiologically acceptable carrier, including adjuvants, excipients or stabilizers. Illustrative oils are those of petroleum, animal, vegetable, or synthetic origin, for example, peanut oil, soybean oil, or mineral oil. In general, water, saline, aqueous dextrose, and related sugar solution, and glycols such as, propylene glycol or polyethylene glycol, are preferred liquid carriers, particularly for injectable solutions.
- Immunofluorescence of HL-60 cells treated with VP16 and stained using the S14P antibody (directed against the peptide CSAPAPKKGSKK) revealed a staining pattern showing that H2B S14 phosphorylation is localized to apoptotic cells as indicated by fragmented DAPI stained nuclei. Apoptosis was induced using etoposide and following the protocol in Kozo Ajiro's paper (Ajiro K. Histone H2B phosphorylation in mammalian apoptotic cells: An association with DNA fragmentation, *J Biol Chem.* 2000 Jan 7;275(1):439-43).

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Interestingly, the function of H2B Ser14 phosphorylation with respect to apoptosis appears to apply only to vertebrate species since Ser14 and surrounding sequences are well conserved from frogs to humans, but are not observed in flies or worms. This chromatin modification has been demonstrated in human, mouse and *Xenopus* cells but staining with α -Phos (Ser 14) H2B (the S14P antibody) was not seen in invertebrates such as *C. elegans*. Interestingly, Ser32 in H2B also appears to be a 'vertebrate addition', and some evidence has suggested that this may also be a site of apoptotic H2B phosphorylation, at least in HL-60 cells. Noteworthy also is Ser36 in the H2B amino terminus, a site which is conserved from yeast to humans and is present in flies and worms. Whether Ser36 in H2B, or the equivalent residue in invertebrates, is phosphorylated during their apoptotic programs is not known. However, the fact that yeast appear to contain this site make it likely that phosphorylation here, if it occurs at all, has other biological functions outside of apoptosis.

Based on time course studies, histone H2B serine 14 phosphorylation occurs immediately before DNA laddering suggesting that histone H2B phosphorylation might be involved in or act as a 'trigger' for DNA fragmentation during apoptosis. Several nucleases that cleave internucleosomal DNA during apoptosis have been identified. At least *in vitro*, histone H1 and HMG enhance nuclease function, and thus, phosphorylated H2B could lead to chromatin structural alterations that enhance accessibility of key DNase activities to chromatin or facilitate their recruitment to the chromatin.

The compositions comprising the S14P antibody, or a bioactive fragment thereof, and a carrier or diluent can be used in conjunction with a method to detect cells that are destined to enter into apoptosis or cells that already are in apoptosis. In addition, the antibodies of the present invention can be used to detect cells that fail to be induced into the apoptosis process and thus serve as a marker for identifying precancer/cancerous cells and tissues. In accordance with this embodiment, cells are cultured in the presence of an apoptosis inducing agent (such as the etoposide, VP-16) and the cells then fixed and stained to determine if a substantial population of cells fail to enter apoptosis relative to a control population of cells. Such a method can be used to analyze cells recovered in a biopsy to diagnose

WO 03/014142

PCT/US02/24405

malignancies and determine the aggressiveness of a tumor and thus the selection of treatment strategies.

In accordance with one embodiment, a method for detecting the presence of apoptotic cells or cells about to become apoptotic in a vertebrate species, including humans is provided. The method comprises the steps of first isolating a biological sample from the vertebrate species, wherein the biological sample comprises the species' chromatin. Typically, the biological sample comprises tissues or cells isolated from the individual vertebrate species. In one embodiment the chromatin (i.e. genomic DNA associated with histones) or individual histones are purified from the biological sample prior to contacting the purified chromatin/histones with the S14P antibody. Alternatively, cells isolated from the vertebrate species can be fixed and directly stained with the antibody.

To determine the presence of apoptotic cells, chromatin or histones isolated from the individual are contacted with the S14P antibody under conditions suitable for specific binding of the antibody to its target. Non-specific bound S14P is subsequently removed and the immunocomplexes formed between the chromatin and the S14P antibody are identified and quantitated as an indicator of the presence of apoptotic cells in the vertebrate species. In one embodiment the S14P antibody is labeled, or alternatively a labeled secondary antibody (specific for the S14P antibody or histone H2B) is used, to identify and quantitate the formation of the immunocomplexes. The amount of immunocomplexes formed is directly proportional to the amount of phosphorylated S14 histone H2B that is present in the sample and is thus indicative of apoptotic activity in the individual that served as a source of the biological sample. The detection of an abnormal level of apoptotic activity serves as a diagnostic of various disease states, including cancer.

In accordance with one embodiment, the method of identifying/quantitating the formation of the immunocomplexes comprises the steps of fixing or binding cells, or the purified chromatin, to a solid support and probing with labeled S14P antibody, wherein non-specifically bound antibody is removed by washing with buffered solutions. Alternatively, the formation of the immunocomplexes can be identified by immunoprecipitation. In another embodiment, the S14P antibody is immobilized on a solid support and the

WO 03/014142

PCT/US02/24405

immobilized antibody is contacted with the isolated chromatin/histones. The formation of immunocomplexes is then identified by washing the bound antibody with a buffered solution and contacting the bound antibody with a second labeled antibody that specifically binds to histone H2B at a site separate and distinct from the S14P epitope.

The Mst1(mammalian Ste20-like kinase 1) kinase is a ubiquitously expressed serine/threonine kinase whose cellular function is unknown. Mst1 is a member of the sterile 20-like superfamily of which ~30 related kinases exist in humans. This kinase is typically regarded as an upstream regulator of MAPK pathways with roles in apoptosis, morphogenesis and cytoskeletal rearrangements. The kinase is known to be cleaved by activated effector caspase 3, releasing a C-terminal regulatory region, and the activated N-terminal catalytic domain. This activated domain then induces apoptosis in a pathway where physiological substrates were previously unknown. Applicants have now discovered that one substrate for Mst1 is the 14th serine residue of histone 2B.

Based on the data in the present application, it is believed that the caspase- cleaved form of Mst1 phosphorylates histone H2B as one of its physiological targets during apoptosis. Covalent modification of the histone termini then facilitates apoptotic chromatin condensation and DNA fragmentation leading to cell death by mechanisms that remain poorly understood. For example, how histone H2B phosphorylation at Ser14 can affect the chromatin structure during apoptosis is not known, although previous work has shown that the histone H2B amino terminus tail is essential for *in vitro* chromatin condensation. Thus, it is anticipated that H2B phosphorylation is involved in chromatin condensation during apoptosis.

Understanding the mechanism of chromatin changes during apoptosis will provide another avenue for drug targeting that may either induce or inhibit cellular death. Chromatin changes such as condensation and DNA fragmentation have been viewed as the last committed step of apoptosis. Considerable evidence exists suggesting many cells die under stress by undergoing apoptosis. However, the use of caspase inhibitors has not been effective to decrease cell death after the initial stress (such as ischemia) has occurred. Perhaps, after effector caspases initiate the death pathway leading to defined chromatin changes, caspases are no longer needed.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Accordingly, effective prevention of cell death may be best brought about by combining caspase inhibitors with drugs that target downstream activities such as Mst1 that affect chromatin changes during apoptosis. In accordance with one embodiment a method is provided for inhibiting cell death by treating cells with caspases inhibitors and an inhibitor of Mst1.

In one embodiment, a method is provided for detecting the kinase activity of a sample, and more particularly Mst1 activity. The method comprises contacting a peptide comprising the sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2) for a predetermined length of time with a sample that is suspected of having kinase activity. The amount of S14P antibody that binds to the substrate is a direct correlation of the extent the substrate was phosphorylated during the predetermined time length and thus indicates the kinase activity of the sample. This assay can also be used to screen for potential modulators of Mst1 activity, including inhibitors and stimulants of Mst1 activity. For example, in one embodiment a method of screening for inhibitors of Mst1 activity comprises the steps of providing a sample, wherein the sample comprises a kinase (i.e. Mst1) and a substrate that is methylated by that kinase (for example the peptide CSAPAPKKGSKK; SEQ ID NO: 2 will be used as the substrate for Mst1 activity), adding a potential inhibitor of the kinase to the sample, and incubating the sample for a predetermined length of time under conditions that are typically (i.e. in the absence of an inhibitor compound) favorable/permisive for kinase activity. In preferred embodiments the sample is incubated for a time that allows for at least half of the substrate to be modified, assuming maximal kinase activity. After allowing sufficient time for the Mst1 kinase to have modified the substrate, the substrate is recovered and contacted with an antibody that binds specifically to the phosphorylated substrate, but not the non-phosphorylated substrate. In one embodiment, the antibody specifically binds to the peptide CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3). Quantifying the amount of S14P antibody that is bound to the substrate peptide is a direct correlation of the level activity of the kinase in the sample. Similarly, stimulants of Mst1 activity can be identified using the same assay and identifying compounds that enhance the rate that the substrate gets phosphorylated.

In accordance with one embodiment of the present invention a method is provided for screening a library of compounds to isolate modifiers of Mst1 activity.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

The method comprises the steps of first providing an Mst1 substrate that has been equally portioned into separate reaction chambers (typically separate wells of a microtiter dish). Preferably, the Mst1 substrate is a protein/peptide comprising the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2) and in one embodiment the peptide is

5 covalently bound to the surface of the microtiter dish either directly or indirectly through a linker. The Mst1 substrate is then contacted with the Mst1 enzyme, and members of the compound library to form a kinase reaction mixture. In one embodiment a single candidate modulating compound is add to each well, however in an alternative embodiment 2 or more compound library members are added to each

10 individual reaction chamber. The kinase reaction mixture comprising the Mst1 substrate, Mst1 and the candidate modulating compound is incubated under conditions typically permissive for Mst1 kinase activity (i.e. in the absence of a Mst1 inhibitor). After an appropriate length of time sufficient to allow for phosphorylation of the Mst1 substrate the reaction is stopped and the substrate is recovered. The extent that the

15 substrate is phosphorylated (relative to an established standard curve for Mst1 activity or a control reaction run simultaneously) is directly related to the modulating effect of the added library compound on the activity of the Mst1 enzyme. Such Mst1 modulating compounds can be used as therapeutics to treat diseases associated with inappropriate apoptotic activity, including cancer.

20 Measuring the phosphorylation of the Mst1 substrate can be accomplished using a polypeptide comprising the amino acid sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2) as the substrate and the S14P antibody. In accordance with one embodiment the substrate is linked to the surface of the reaction vessel directly or indirectly (i.e. through a linking moiety) via covalent, ionic,

25 hydrogen or other chemical bond. In one embodiment the substrate is bound to the surface of the reaction chamber by adding the Mst1 substrate to the reaction chamber and incubating in PBS overnight at 4°C. Alternatively, the peptides are covalently linked to the surface of the reaction chamber using standard reactive groups and reactions known to those skilled in the art. After incubating the substrate in the

30 presence of the Mst1 enzyme and the potential inhibitor, the reaction mixture is removed from the reaction chamber and the chamber is optionally washed with buffer. The S14P antibody is then added to the reaction chambers under conditions that allow

WO 03/014142

PCT/US02/24405

for specific binding to its substrate and then the reaction chambers are washed with buffer to remove non-specifically bound material. In accordance with one embodiment specific binding of the antibody to the peptides is detected through an ELISA reaction. In an alternative embodiment the substrate is not bound to the reaction chamber, and the specific binding of the antibody to the peptides is detected by immunoprecipitation.

The antibodies of the present invention have a number of potential uses including their use as markers of apoptosis. Apoptosis has known to occur in cancer, neurodegenerative diseases, stroke etc. In addition the marker can also be used to assess and monitor the progress of a therapeutic treatment. The S14P antibody can also be used as a marker of the changes in chromatin that occurs during apoptosis. The antibodies can also be used to study the signals that are responsible for the histone modification (H2B ser 14 phosphorylation) and how this modification is involved in apoptosis.

In one embodiment of the present invention a kit is provided for detecting apoptotic cells. The kit comprises an antibody that specifically binds to a phosphorylated serine modified peptide comprising the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1). In one embodiment the kit further comprises an antibody that specifically binds to the non-phosphorylated amino terminus of the histone H2B peptide comprising the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2). In one embodiment the antibodies are attached to an insoluble support, wherein the support is either a monolithic solid or is in particulate form. In one preferred embodiment the antibodies are monoclonal antibodies and in a further embodiment the antibodies are labeled. To this end, the antibodies of the present invention can be packaged in a variety of containers, e.g., vials, tubes, microtiter well plates, bottles, and the like. Other reagents can be included in separate containers and provided with the kit; e.g., positive control samples, negative control samples, buffers, cell culture media, etc.

In accordance with one embodiment the kits further comprise peptides that serve as substrates for kinase activity. More particularly, the peptides comprise the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2). In one preferred embodiment the peptide substrate is covalently bound either directly or through a linking moiety to a solid substrate.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

The kits of the present invention may further comprise reagents for detecting the antibody once it is bound to the target antigen. Optionally, reagents (pepsin, dilute hydrochloric acid) for treating cells or tissue to render nuclear proteins accessible for immunological binding may also be included, as may

5 immunofluorescent detection reagents (an anti-immunoglobulin antibody, or anti-histone H2B antibody, derivatized with fluorescein or rhodamine, or a biotinylated anti-immunoglobulin antibody together with avidin or streptavidin derivatized with fluorescein or rhodamine), immunohistochemical or immunocytochemical detection

10 reagents (an anti-immunoglobulin antibody, or anti-histone H2B antibody, derivatized with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase, or a biotinylated anti-immunoglobulin antibody together with avidin or streptavidin derivatized with alkaline phosphatase or horseradish peroxidase). In one embodiment, the kit includes one or more reagents for immunoperoxidase staining (an anti-immunoglobulin antibody derivatized with horseradish peroxidase, or a biotinylated

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

Example 1

20 **Identification of Phosphorylated Serine 14 of H2B as a Marker for Apoptosis**
Experimental Procedures

Cell culture, drug and UV treatment, and harvesting for protein and DNA: HL-60 cells were cultured in RPMI with 10%FBS whereas 293T, HeLa, HepG2, and IMR90 were grown in DMEM with 10%FBS. Etoposide, anisomycin,

25 and anti-Fas were purchased from Sigma. To induce apoptosis, drugs were used in these concentration 20ug/mL for etoposide, 25ng/mL anisomycin and 15ng/mL anti-Fas. For UV induction of apoptosis, 40-100 J/m² was used (Biorad GS Gene Linker UV chamber). After induction of apoptosis the growth media was changed and harvested at various times afterward. Control cells were either treated with DMSO or

30 mock-treated.

After the desired treatment, cells were subjected to any of the following: resuspension in SDS-lysis buffer (Laemmli's sample buffer), nuclear

WO 03/014142

PCT/US02/24405

extraction, acid extraction for histones, or genomic DNA extraction. Nuclei were isolated by lysis in detergent and low speed spin as described in Strahl et al., (2001) Curr Biol 11, 996-1000. These nuclei can either be salt extracted for nuclear proteins (see below) or acid extracted in 0.4 N H₂SO₄. After incubating on ice for 2-4 hours, high speed centrifugation is done to remove the insoluble pellet. 5.4 % of Perchloric acid was added to the supernatant and the precipitated histones were resuspended in water.

Genomic DNA was harvested by lysing the cell pellet in 10mM Tris pH 9.0, 1mM EDTA, 10mM NaCl, 1% w/v SDS, 1mg/mL of proteinase K at 50°C for 4-5 hours. To remove proteins, a phenol/chloroform extraction was performed and then the DNA was precipitated in 0.3M sodium acetate and 70% Ethanol. After centrifugation, the pellet was resuspended in TE and the RNA was digested by adding 1mg/mL Rnase A for 1 hour at room temp. DNA was separated in 1.2% agarose TAE gel.

Salt nuclear extraction and in-gel kinase assay

Nuclei from HL-60 were extracted in 20mM Hepes pH 7.8, 0.42M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5mM DTT, 25% (v/v) glycerol for 3-4 hours on ice. After centrifugation at 14K for 20 minutes, soluble fraction was isolated and used for *in vitro* kinase assay, in-gel kinase assay, and Western blotting (see below). SDS-PAGE was done as described by Laemmli. For in-gel assay, 10-12% SDS-PAGE gel was polymerized with 0.1 mg/mL chicken core histones or 0.1 mg/mL purified chicken H2B. In-gel was done as essentially described in (Sassone-Corsi et al., (1999) Science 285, 886-891. Briefly, nuclear extracts or fractions were run into these gels. Then to rid the SDS, the gel was washed repeatedly (three times) in 30mM Tris HCl pH 7.4, 1mM DTT, 0.1mM EDTA, 20% (v/v) isopropanol for 20 minutes each time. To denature the proteins, the gel was incubated in 8M urea, 30mM Tris HCl pH 7.4, 1mM DTT, 0.1mM EDTA for one hour. The gel was then immersed in 30mM Tris HCl pH 7.4, 5mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, 1mM DTT, 100mM NaCl, 0.05% Tween 40 at 4°C overnight to renature the proteins. After renaturation, an *in vitro* kinase reaction was performed using 50mCi of γ -ATP in 30mM Tris HCl

WO 03/014142

PCT/US02/24405

pH 7.4, 5mM MgCl₂, 2mM MnCl₂, 1mM DTT at 30°C for 2 hours. The gel is then stained with Coomassie Blue, destained, and dried down for autoradiography.

Nuclear extract fractionation, *in vitro* kinase assay and Western blotting

5 Nuclear extracts were fractionated in a superose 6 PC 3.2/300 column (Amersham/Pharmacia) using the Pharmacia SMART system. The eluent consists of 200mM NaCl, 50mM NaPO₄ pH7.0, 5mM MgCl₂, 20% v/v glycerol. The flow rate was 40 mL/min at 4°C. The apoptotic fraction containing the caspase cleaved Mst1 comes off at molecular weight of approximately 66 kDa whereas, the full length Mst1
10 comes off at around 150 kDa. 10 mL of fractions were used for *in vitro* kinase reaction and Western blotting. For the *in vitro* kinase assay, 0.5mg of histone H2B was used in 30mM Tris pH 7.5, 5mM MgCl₂, 10mM DTT, 0.1mg/mL microcystin, 10mM ATP plus 0.5 mCi of g-P32 ATP. The reaction was incubated for 20 minutes at 30°C and spotted on P81 filter paper. Then filter papers were washed in 0.75%
15 H₃PO₄ and a scintillation counter was used to measure P³² incorporation. For non-radioactive reaction (cold), no g-P³² ATP was used and the reactions were run in an SDS-PAGE gel for Western blot analysis.

Western blot analysis is performed as described in (Briggs et al., (2001) Genes Dev 15, 3286-3295) 1:1000 of α-phos (S14) H2B, 1:2500 of α-N-Mst1,
20 1:400 of α-myc (9E10 from Santa Cruz), 1:800 of α-PARP (UBI), 1:1000 of α-phos H2A.X (UBI), and 1:5000 of α-Acetyl H4 primary antibodies were used. HRP-conjugated rabbit secondary (Amersham Pharmacia) was used at 1:5000. For chemiluminescence, the ECL plus kit (Amersham Pharmacia) was used for detection.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Immunofluorescence on apoptotic cell culture and Xenopus tails

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 10 minutes and then washed in PBS. 0.2% Triton X-100 for 5 minutes to permeabilize cells and then cells were blocked in 2% goat serum PBS. Cells were incubated for 1 hour with 1:500-
5 1:1000 of α -phos (S14) H2B at 37°C. Following incubation, cells were washed three times with block. After washing, cells were incubated for 1 hour in 1:500-1:800 of Goat anti-rabbit Cy3 conjugated secondary antibody and washed three times in block. The coverslip containing cells was then mounted in Vectashield mounting media containing DAPI.

10 Degenerating tails were cut off from stage 64 froglets and fixed in Bouin fixative (Sigma) for 2 hr, washed overnight in 70% ethanol, dehydrated, cleared in HistoClear and embedded in paraplast. 10 mm sections were de-paraffinated, hydrated and blocked for 30 min in 0.1%BSA in PBS -0.05%Tween 20. Sections were incubated for 30 min with α -phos (S14) H2B (1:5000 dilution in 1% BSA in PBS-
15 0.05%Tween 20), washed twice, 10 min each, in PBS-Tween. After washing, sections were incubated for 30 min with anti-rabbit fluorescein conjugated secondary antibody (1:200 dilution in 1%BSA in PBS-Tween) and washed twice, 10 min each in PBS-Tween. Sections were mounted in Antifade (Molecular probes) containing Hoechst (2 ug/ml).

20

Transient transfection, immunoprecipitation, and kinase assay

Transfection was done according to the lipofectamine plus kit (Gibco Invitrogen). After 24-48 hours of transfection, 293T cells were harvested in 40mM Hepes pH 7.5, 1% Triton X-100, 0.05% NP-40, 150 mM NaCl, 50mM NaF, 1mM
25 EDTA, 1mM EGTA, 10% v/v glycerol, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.5mg/mL microcystin, 1mg/mL aprotinin, 1mg/mL pepstatin, 1mg/mL leupeptin. Supernatant was saved after 20 min of centrifugation at 14,000 rpm. For immunoprecipitation (IP), 1mg of α -myc (9E10 from Santa Cruz) was incubated with supernatant for 2 hours at 4°C and then precipitated with protein G-Sepharose
30 (Amersham Pharmacia) for another 2 hours at 4°C. IPs were washed in TBST (20mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 5-6 times. Then the beads were incubated in 1mg of H2B, 40mM Hepes 7.5, 20mM MgCl₂, 0.1mg/mL microcystin,

WO 03/014142

PCT/US02/24405

phosphorylation at serine 14 is associated with condensed apoptotic chromatin in multiple mammalian cell lines.

Table 1

Different Cell Lines Undergoing Apoptosis Display
Increase in H2B S14 Phosphorylation

	<u>Cell Lines Tested</u>	<u>Cytotoxic Agents</u>	<u>Levels of H2B S14 Phos</u>	
			<u>Induction</u>	
5	HL-60	Etoposide (VP16)	High	
		UV	High	
		Anti-Fas	High	
		Anisomycin	High	
	NIH3T3	UV	High	
10	HeLa	UV	Medium	
		IMR90	UV	Medium
		HepG2	MMS	Medium
		293T	UV	Low

After Cytotoxic agent treatments, cells were harvested. The level of H2B S14

15 phosphorylation is determined by Western blots using α -Phos (S14) H2B.

**H2B (Ser14) phosphorylation is increased during program cell death during
developmental sculpturing events**

To determine whether H2B (Ser14) phosphorylation is also associated
20 with apoptosis in a more physiological model, this modification was examined in an
animal where programmed cell death is well known and well characterized.
Inspection of the primary amino acid sequence of histone H2B amino termini reveals
that serine 14 is conserved among vertebrate species, including *Xenopus*. During
metamorphosis, resorption occurs in *Xenopus laevis* tails and clusters of these cells
25 die by developmentally programmed apoptosis. Degenerating tails from stage 64
froglets were examined by immunofluorescence using the S14P antibody. Signal

WO 03/014142

PCT/US02/24405

from this antibody typically stains pockets of apoptotic cells in the tail and co-localizes precisely with the Hoechst-dense apoptotic condensed nuclei. These data indicate that H2B (Ser14) phosphorylation also occurs in apoptotic cells during normal *Xenopus* development. In contrast, no apoptotic staining is observed with the S14P antibody in *Caenorhabditis* or *Drosophila* consistent with the observation that this serine does not exist in these invertebrates.

Nuclear extracts from apoptotic cells contain a 34 kDa H2B Ser14 kinase

To further understand the link between H2B (Ser14) phosphorylation and apoptosis, attempts were made to identify the kinase(s) responsible for this phosphorylation event. HL-60 cells were chosen as a starting point for these studies, since Ser14 phosphorylation of H2B is strongly increased in VP-16-treated HL-60 cells. Nuclear extracts from mock-and VP-16-treated HL-60 cells were used for preliminary kinase assays and Western blots. Firstly it was determined that 'apoptotic' nuclear extracts contain a H2B Ser14 kinase activity that is greatly increased in stimulated cells.

A histone H2B-based, in-gel kinase assay was used to search for, and ideally, determine the molecular weight(s) of potential apoptotic H2B kinases in crude apoptotic extracts. Using either H2B or mixtures of core histones as substrate, a prominent apoptotic-induced histone kinase was detected. While numerous bands appear in common between the H2B-containing and the 'no substrate' gels (likely due to autophosphorylation), one band is consistently detected in the H2B-containing gel that has an apparent molecular weight of approximately 34 kDa. These data suggest that stimulated (apoptotic) HL-60 nuclear extracts contain an induced, 34 kDa H2B kinase (hereafter 34H2BapoK).

Mst1 (Mammalian Sterile Twenty) is a caspase-activated Ser/Thr protein kinase of approximately 34 kDa whose activity plays causal role in inducing apoptosis under some biological settings. However, the physiological targets of this kinase, relative to programmed cell death, was previously unknown. To determine if 34H2BapoK is in fact Mst1, nuclear extracts prepared from VP-16-stimulated HL-60 cells were first probed with an amino terminal antibody to Mst1 (α -N-Mst1; this antibody detects the N-terminal catalytic domain of Mst1, (Graves et al., (1998)

WO 03/014142

PCT/US02/24405

EMBO 17, 2224-2234)) to determine if the caspase-cleaved form of Mst1 is present in fractions containing ³⁴H2BapoK as detected by the in-gel H2B kinase assay. Western blot analyses show that the cleaved form of Mst1 is present in these nuclear extracts, and its molecular weight is similar, if not identical, to the apoptotic-induced H2B
5 kinase.

The caspase-cleavage form of Mst1 co-fractionates with the H2B (Ser14) kinase activity

To further characterize the apoptotic-induced H2B kinase, the
10 apoptotic nuclear extract was fractionated using a size exclusion column (Superose 6) to partially purify the kinase. Comparison of H2B kinase activities from 'apoptotic' and 'normal' nuclear extracts, showed that fraction 18 of the apoptotic extract has 2-3 fold enrichment in H2B kinase activity over the same fraction from mock-treated extracts. This enrichment is not due to increased autophosphorylation of polypeptides
15 in fraction 18 as kinase assays performed without substrate did not exhibit changes between control and apoptotic fractions. While other fractions exhibit histone H2B kinase activity, no significant differences were detected between mock-treated and VP16-treated extracts suggesting that the apoptotic-induced H2B kinase is not present in these fractions. To confirm that the H2B kinase activity contained fraction 18
20 phosphorylates H2B at Ser14, kinase reactions using non-radioactive ATP and H2B as the substrate were performed and analyzed by western blot using the S14P antibody. As expected, only fraction 18 has the enhanced H2B serine 14 kinase activity.

Western blotting of the fractions immediately surrounding fraction 18 with the α -N-Mst1 show that only fraction 18 from apoptotic extracts contains the
25 caspase-cleaved form of Mst1. Taken together, the coincidence of the increased H2B Ser14 kinase activity and the presence of the caspase-activated form of Mst1 in fraction 18 prepared from apoptotic nuclear extracts strongly suggests that Mst1-cleavage product is ³⁴H2BapoK. To further substantiate this hypothesis, an in-gel kinase assay was performed with fraction 18 from normal and apoptotic nuclear extracts
30 using chicken H2B as the substrate. The in-gel kinase assay shows that this fraction indeed contains a 34 kDa H2B kinase activity that is not present in the control

WO 03/014142

PCT/US02/24405

fraction. Therefore, these data are consistent with the 34H2BapoK being the cleaved form of Mst1.

Mst1 can phosphorylate histone H2B at serine 14 *in vitro* and *in vivo*

5 To directly test whether Mst1 can phosphorylate histone H2B, CMV driven plasmids containing either myc-tagged full length (FL), kinase dead (KD), or a C-terminal truncated form (DC) of Mst1 were transfected into 293T cells. Immunoprecipitation (IP) of these forms of Mst1, using antibodies against myc, were then analyzed by *in vitro* kinase assays performed in the presence of γ -³²P-ATP or
10 with cold ATP and using histone H2B as substrate. Cold reactions were assayed by Western blotting with α -myc and α -phos (S14) H2B. Strong phosphorylation of H2B was detected with both full length and DC Mst1, a result consistent with findings that DC Mst1 mimics the caspase-cleaved form of Mst1. In contrast, the kinase dead form Mst1 (which contains a single point mutation) did not phosphorylate H2B, arguing
15 against the possibility of other histone kinases associating with the Mst1 IPs. To determine histone preferences by Mst1, similar IP kinase reactions were performed using individual core histone as substrates. Again, only Mst1 FL and DC show strong preference for histone H2B. Taken together, these data suggest that H2B is a physiologically-relevant nuclear substrate for Mst1 *in vivo*.

20 To test whether Mst1 can phosphorylate H2B at Ser14, similar IP kinase reactions were performed with H2B and non-radioactive ATP. Reactions were then analyzed by western blotting using α -myc for Mst1 protein expression level and the S14P antibody. As predicted, both Mst1 FL and DC phosphorylate H2B at Ser14 as detected by the S14P antibody whereas kinase dead Mst1 does not. Hence, full
25 length and truncated forms of Mst1 can directly phosphorylate histone H2B at Ser14.

Mst1 can induce apoptotic-like chromatin condensation when overexpressed in HeLa cells. To determine if Mst1 can phosphorylate H2B when expressed in HeLa cells, full length and kinase dead versions of Mst1 were transfected into HeLa cells, and western blots of cell extracts were then probed with the S14P
30 antibody. An increase in H2B Ser14 phosphorylation was only detected in cells harboring the Mst1 full length construct (WT). Considerably less signal is detected with the kinase dead mutant. These data suggest that Mst1 functions as an H2B Ser14

WO 03/014142

PCT/US02/24405

kinase in cells under these assay condition and that H2B might be an important physiological substrate for Mst1 as it relates to apoptotic chromosome condensation.

Kinetics of H2B Ser14 phosphorylation is similar to cleavage of Mst1 during apoptosis

If Mst1 cleavage is important in establishing H2B Ser14 phosphorylation during apoptosis, the kinetics of both events should be similar. HL-60 cells were induced to undergo apoptosis and were harvested at half-hour interval for western analysis. Time-course analyses (probing western blots with the S14P antibody and the α -N-Mst1 antibody) indicate that the onset of H2B phosphorylation coincides with the first appearance of the caspase-cleaved Mst1 at two hours post induction. As a marker for apoptosis, identical blots were also probed with α -PARP (poly (ADP-ribose) polymerase which gets cleaved as cells undergo apoptosis and isolated genomic DNA was evaluated for the appearance of characteristic DNA laddering. Interestingly, cleavage of PARP and the appearance of DNA ladder occur immediately after both H2B phosphorylation and cleavage of Mst1 (approximately 2.5 hr post induction). While timing differences may reflect differences in detection sensitivity between these apoptotic markers, the data suggest that H2B phosphorylation precedes DNA laddering and hence, may play a role in establishing apoptotic DNA fragmentation by mechanisms that remain unclear. More importantly, the onset of caspase-cleaved Mst1 is closely linked to the appearance of H2B Ser14 phosphorylation during the time course of apoptotic induction.

Comparison between the kinetics of H2B serine 14 phosphorylation and other histone modifications during apoptosis

Acetylation of histone H4 is decreased during apoptosis as cells undergo condensation and DNA fragmentation, and more specifically, histone H4 deacetylation occurs soon after the appearance of H2B phosphorylation. Thus, it seems unlikely that H2B phosphorylation results due to the loss of hyperacetylated (active) chromatin domains during apoptotic chromatin condensation. H2A.X phosphorylation has also been associated with double-strand DNA breaks. Since VP16 (etoposide) also causes DNA breaks, the kinetics of H2A.X phosphorylation

WO 03/014142

PCT/US02/24405

were also evaluated. As expected, H2A.X phosphorylation occurs within one hour of VP16 treatment which suggests that DNA breaks, induced by VP16, occur early during the apoptotic pathway. Since H2B (Ser14) phosphorylation occurs later than H2A.X phosphorylation, but before (or concurrently with) other well known apoptotic markers, these data suggest that H2B phosphorylation is not simply associated with DNA breaks. Rather, H2B phosphorylation appears to be a unique chromatin marker for apoptosis in HL-60 cells.

H2B Ser14 phosphorylation and cleavage of Mst1 are caspase 3 dependent

Since caspases are involved in many integral parts of the apoptotic programs, we sought to determine to what extent, if any, H2B Ser14 phosphorylation is controlled by activated, effector caspases. In addition, Mst1 cleavage is dependent on caspase 3 and the N-terminal cleavage form of Mst1, missing nuclear export signals (NES; cleaved off by activated Caspase 3), is then translocated into the nucleus. The truncated Mst1 then travels into the nucleus and induces chromatin condensation and apoptosis.

If H2B (Ser14) phosphorylation is dependent on the cleavage of Mst1, this histone modification should be sensitive to documented caspase 3 inhibitors such as the DEVD peptide. To test this prediction, HL-60 cells were pre-incubated with varying amounts of z-DEVD-fmk (Trevigen) before subsequent treatment with VP16 for 4 hours. Cell extracts were then harvested for western analysis. Western blots using Mst1 N-terminal and H2B S14 phos antibodies showed that incubation with 200mM of z-DEVD-fmk inhibited both Mst1 cleavage and H2B Ser14 phosphorylation. At a lower dose, 20mM of z-DEVD-fmk, only a modest decrease in the proportion of truncated Mst1 over full length Mst1 and H2B phosphorylation is observed. These data demonstrate that H2B Ser14 phosphorylation, like cleavage of Mst1 itself during apoptosis, is dependent on caspase 3. Accordingly, H2B is likely phosphorylated *in vivo* at Ser14 by the caspase 3-generated form of Mst1. Moreover, the present data indicate that H2B is a previously unrecognized nuclear substrate for this activity, and hint at the possibility that phosphorylation of H2B at Ser14 is part of an apoptotic 'histone code', at least in vertebrates.

WO 03/014142

PCT/US02/24405

Claims:

1. An antibody that binds specifically to an antigen selected from the group consisting of CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3), SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) and SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).
5
2. The antibody of claim 1, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 10 3. The antibody of claim 1, wherein the antibody specifically binds to the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1).
4. The antibody of claim 1, wherein the antibody specifically binds to the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).
15
5. The antibody of claim 1, wherein the antibody is labeled.
6. The antibody of claim 5, wherein the antibody is labeled with a fluorescent marker.
20
7. A composition comprising the antibody of claim 1 and a diluent or pharmaceutically acceptable carrier.
8. A purified peptide consisting of an 11 to 20 amino acid sequence
25 wherein said amino acid sequence comprises a sequence selected from the group consisting of SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) and SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).
9. The purified peptide of claim 8 wherein the peptide consists of the
30 sequence CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3).

WO 03/014142

PCT/US02/24405

10. A method for detecting the presence of apoptotic cells in a vertebrate species, said method comprising the steps of
contacting a biological sample with an S14P antibody, wherein said sample is isolated from said vertebrate species and comprises chromatin; and
5 identifying immunocomplexes formed between the chromatin and the S14P antibody as an indicator of the presence of apoptotic cells in the vertebrate species.
11. The method of claim 10 wherein the S14P antibody is labeled.
- 10 12. The method of claim 10 wherein the biological sample consists essentially of purified chromatin isolated from the cells of the vertebrate species.
13. The method of claim 10 wherein the immunocomplexes are identified by immunoprecipitation.
- 15 14. The method of claim 10 wherein the S14P antibody is immobilized on a solid support; and the step of identifying the immunocomplexes further comprises the steps of washing the bound antibody with a buffered solution and then contacting the bound antibody with a second labeled antibody that specifically binds to histone
20 H2B.
15. A kit for identifying apoptotic cells, said kit comprising an antibody that specifically binds to a peptide selected from the group consisting of CSAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 3) and SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1).
- 25 16. The kit of claim 15 further comprising a second antibody that specifically binds to SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).
17. The kit of claim 15 further comprising a polypeptide comprising the
30 amino acid sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2).

WO 03/014142

PCT/US02/24405

18. A method of screening for inhibitors of Mst1 kinase activity, said method comprising the steps of
preparing a mixture comprising Mst1, a peptide comprising the sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 2) and a potential inhibitor of Mst1;
5 incubating said mixture for a predetermined length of time under conditions permissive to kinase activity; and
quantifying the amount of SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) formed as an indication of the inhibitory effect of the potential Mst1 inhibitor.
- 10 19. The method of claim 18 wherein the amount of SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1) formed is determined by measuring the amount of S14P antibody that binds to the peptide after the incubation step.
- 15 20. A method of detecting the presence of methylated H3 histones, said method comprises the steps of contacting histone proteins with an antibody that specifically binds to the peptide sequence SAPAPKKGSKK (SEQ ID NO: 1).

20

Elisa using 1:2000 of H2B serine 14 antibody

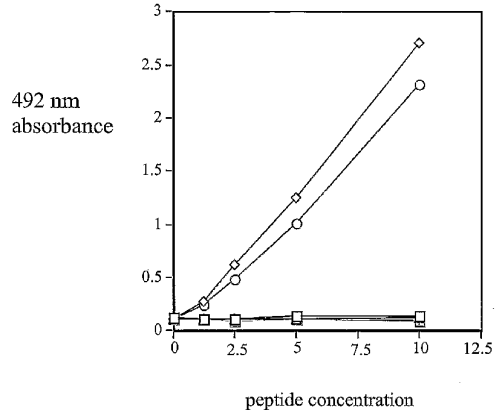


FIG. 1

WO 03/014142

PCT/US02/24405

SEQUENCE LISTING

5 <110> The University of Virginia Patent Foundation
 Allis, C. David
 Cheung, Wang
 Ajiro, Kozo

10 <120> Phosphorylated Histone H2B as an Apoptosis Marker
 <130> 00596-03
 <150> 60/310,015
 <151> 2001-08-03

15 <150> 60/364,386
 <151> 2002-03-14
 <150> 60/375,892
 20 <151> 2002-04-26
 <160> 3
 <170> PatentIn version 3.0

25 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(9)
 <223> Phosphorylation

35 <400> 1
 Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys Lys
 1 5 10

40 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

WO 03/014142

PCT/US02/24405

```
<400> 2
Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys Lys
1          5          10

5
<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10
<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Phosphorylation

15
<400> 3
Cys Ser Ala Pro Ala Pro Lys Lys Gly Ser Lys Lys
1          5          10
```

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 P 21/08	

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

(72) 発明者 シー・デイビッド・アリス
 アメリカ合衆国 1 0 0 2 1 ニューヨーク州ニューヨーク、イースト・6 3 ストリート 5 0 4 番、ア
 パートメント 2 3 - ピー

(72) 発明者 ワン・エル・チュン
 アメリカ合衆国 2 2 9 0 3 バージニア州シャーロットビル、ワートランド・ストリート 1 1 0 7 -
 1 / 2 番、アパートメント 5

(72) 発明者 網代 廣 三
 千葉県柏市高田 6 6 - 2

F ターム(参考) 2G045 BB10 BB24 BB29 BB46 BB50 CB01 DA36 FB03 FB09 FB12
 4B024 AA11 BA44 CA04 CA05 CA06 DA02 EA04 GA01 GA11 GA27
 HA03 HA08 HA14
 4B063 QA01 QA18 QQ20 QR07 QR42 QR48 QR67 QS12 QS28 QS36
 QX02 QX07
 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
 4H045 AA10 AA11 AA30 BA10 BA70 CA40 DA76 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005506973A5	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2003519091	申请日	2002-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚大学专利基金会		
申请(专利权)人(译)	弗吉尼亚专利大学基金会		
[标]发明人	シーデイビッドアリス ワンエルチュン 網代廣三		
发明人	シー・デイビッド・アリス ワン・エル・チュン 網代 ▲廣▼三		
IPC分类号	G01N33/50 C07K7/06 C07K7/08 C07K16/18 C07K16/44 C12N15/02 C12P21/08 C12Q1/48 G01N33/15 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/44 C07K16/18		
FI分类号	C07K16/18.ZNA C07K7/06 C07K7/08 C12Q1/48.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.Y C12N15/00.C C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB24 2G045/BB29 2G045/BB46 2G045/BB50 2G045/CB01 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB09 2G045/FB12 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/GA27 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QR07 4B063/QR42 4B063/QR48 4B063/QR67 4B063/QS12 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX02 4B063/QX07 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/310015 2001-08-03 US 60/364386 2002-03-14 US		
其他公开文献	JP2005506973A		

摘要(译)

本发明涉及在组蛋白2B上产生针对14个 α -磷酸化丝氨酸残基的抗体。组蛋白2B的氨基末端的这种翻译后修饰与即将进入细胞凋亡或已经患有细胞凋亡的细胞相关。这些抗体可用于鉴定凋亡细胞并用作诊断和筛选工具。本发明还涉及Mst1激酶的分离，以及调节Mst1活性的化合物。已经在组蛋白2B上体内鉴定了该激酶作为负责引起这种翻译后修饰的酶。