



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108107215 A

(43)申请公布日 2018.06.01

(21)申请号 201711384538.7

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2012.08.31

G01N 33/574(2006.01)

(30)优先权数据

1115098.4 2011.09.01 GB

61/530304 2011.09.01 US

(62)分案原申请数据

201280053594.1 2012.08.31

(71)申请人 比利时意志有限责任公司

地址 比利时伊讷

(72)发明人 J.V.米克莱夫

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 黄希贵

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

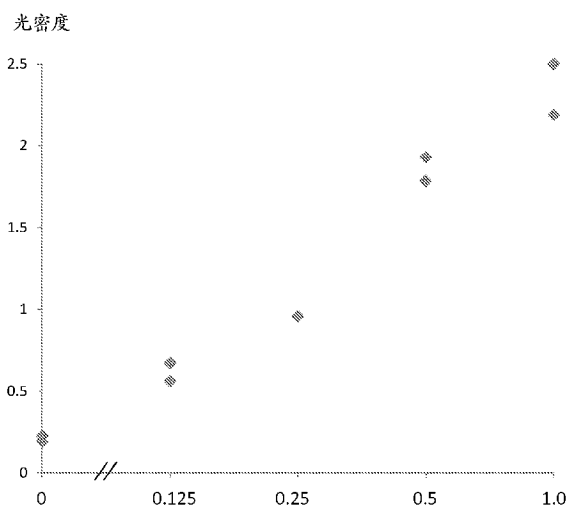
权利要求书2页 说明书27页 附图12页

(54)发明名称

用于检测含组蛋白变体的核小体的方法

(57)摘要

本发明涉及用于检测和测定含特定组蛋白变体的单核小体和寡核小体及核小体的存在的方法以及所述测定用于检测和诊断疾病的用途。本发明亦涉及鉴定组蛋白变体生物标志物以用于检测和诊断疾病的方法并涉及经所述方法鉴定的生物标志物。



用小牛血清稀释的健康人血核小体制品的比例

1. 对作为生物标记的无细胞核小体内组蛋白变体或组蛋白同种型特异的配体或结合物在制备用于诊断以下疾病的试剂或试剂盒中的用途：癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病或类风湿性关节炎，其中在血液、血清或血浆样品中测定组蛋白变体或组蛋白同种型。

2. 如权利要求1中定义的用途，其中所述核小体为单核小体或寡核小体。

3. 如权利要求1或权利要求2中定义的用途，其中在血样中测定包含组蛋白变体或组蛋白同种型的所述无细胞核小体。

4. 如权利要求1-3中任一项所定义的用途，其中所述癌症为膀胱、乳腺、结肠、宫颈、食道、肾、大肠、肺、口腔、卵巢、胰腺、前列腺、直肠、皮肤或胃的癌症。

5. 如权利要求4中定义的用途，其中所述癌症为结肠、肺、口腔或胰腺的癌症。

6. 一种用于检测血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的无细胞核小体的存在的体外方法，所述方法包括步骤：

(i) 使所述样品与第一结合剂接触，所述第一结合剂与核小体结合；

(ii) 使所述核小体或样品与第二结合剂接触，所述第二结合剂与所述组蛋白变体或组蛋白同种型结合；

(iii) 检测或定量所述第二结合剂与样品中组蛋白变体或组蛋白同种型的结合；和

(iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

7. 一种用于检测血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的体外方法，所述方法包括步骤：

(i) 使所述样品与第一结合剂接触，所述第一结合剂与所述组蛋白变体或组蛋白同种型结合；

(ii) 使所述核小体或样品与第二结合剂接触，所述第二结合剂与所述核小体结合；

(iii) 检测或定量所述第二结合剂与样品中核小体的结合；和

(iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

8. 如权利要求6或7所定义的方法，其中所述组蛋白同种型为存在于全部或大部分核小体中以测试核小体本身的常见组蛋白同种型。

9. 如权利要求6-8中任一项所定义的方法，其中用于结合组蛋白的结合剂靶向结合所述组蛋白中这样的区，其为所述组蛋白部分的全部或大部分组蛋白变体或同种型所共有并存在于全部或大部分核小体中，以测试核小体本身。

10. 如权利要求6-9中任一项所定义的方法，其中所述结合剂为抗体。

11. 与作为生物标记的无细胞核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型特异的结合剂在制备用于检测动物或人受试者中的疾病状态的试剂或试剂盒中的用途，所述检测包括步骤：

(i) 检测受试者血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体；和

(ii) 采用检测到的核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型的水平鉴定受试者的疾病状态；

其中所述疾病选自癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病

或类风湿性关节炎。

12. 与作为生物标记的无细胞核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型特异的结合剂在制备用于评估动物或人受试者适于医疗治疗的试剂或试剂盒中的用途,包括步骤:

(i) 检测受试者血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(ii) 采用检测到的核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型水平作为选择适于受试者的治疗的参数;

其中所述治疗是治疗癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病或类风湿性关节炎。

13. 与作为生物标记的无细胞核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型特异的结合剂在制备用于监测动物或人受试者治疗的试剂或试剂盒中的用途,包括步骤:

(i) 检测受试者血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;

(ii) 一个或多个情况下重复检测受试者血液、血清或血浆样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(iii) 采用检测到的组蛋白变体或组蛋白同种型相关的核小体水平的任何变化作为受试者病症任何改变的参数;

其中所述治疗是治疗癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病或类风湿性关节炎。

14. 如权利要求11-13中任一项所定义的用途,其中将所述核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型作为一组测定中的一种来检测。

用于检测含组蛋白变体的核小体的方法

[0001] 本申请是分案申请,其发明名称与母案相同,母案的中国申请号是201280053594.1,国际申请号是PCT/GB2012/052131,申请日是2012年8月31日。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于检测和测定含特定组蛋白变体的单核小体和寡核小体及核小体的存在的方法以及所述测定用于检测和诊断疾病的用途。本发明亦涉及鉴定组蛋白变体生物标志物以用于检测和诊断疾病的方法并涉及经所述方法鉴定的生物标志物。

[0003] 发明背景

人体包含数百种细胞类型。所有这些细胞类型含有相同的基因组,但具有广泛不同的表型以及在体内的不同功能。这样的表型多样性是因基因组在不同细胞类型中的差异表达所致。虽然不完全了解差异基因表达的调控,但是基本机制包括通过与所述基因有关的大量相互连接的表观遗传信号的基因调节,其包括将染色质包装为常染色质或异染色质的调控、核小体定位和核酸酶可接近位点的调控、DNA的甲基化和在其周围缠绕有DNA的核小体的结构上的变化。

[0004] 核小体为染色质结构的基本单元以及由八个高度保守的核心组蛋白(包括各一对的组蛋白H2A、H2B、H3和H4)的蛋白质复合物组成。在此复合物周围缠绕有约146个碱基对的DNA。另一种组蛋白H1或H5充当接头并涉及染色质致密化。DNA以常常被称为类似于“绳珠”的结构缠绕在连续的核小体周围以及这形成开放或常染色质的基本结构。在致密或异染色质中,所述绳经螺旋和超螺旋成闭合而复杂的结构(Herranz和Esteller, 2007)。

[0005] 核小体的结构可通过组蛋白的转录后修饰(PTM)和通过包含变体组蛋白来改变。组蛋白的PTM通常发生在核心组蛋白的尾部,并且常见修饰包括赖氨酸残基的乙酰化、甲基化或遍在蛋白化以及精氨酸残基的甲基化和丝氨酸残基的磷酸化及许多其它修饰。已知组蛋白修饰涉及基因表达的表观遗传调节(Herranz和Esteller, 2007)。核小体的结构亦可通过包含备选的组蛋白同种型或变体来改变,所述同种型或变体为不同的基因产物或剪接产物并且具有不同的氨基酸序列。组蛋白变体可分为许多家族,其可再分成独立的类型。大量组蛋白变体的核苷酸序列为已知的并且可公开得自例如国家人类基因组研究所NHGRI组蛋白数据库(Mariño-Ramírez, L., Levine, K.M., Morales, M., Zhang, S., Moreland, R.T., Baxevanis, A.D.,和Landsman, D. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins (组蛋白数据库:含组蛋白和组蛋白折叠的蛋白质的综合资源). *Database* 第2011卷. (已提交)和<http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>)、GenBank (NIH遗传序列)数据库、EMBL核苷酸序列数据库和日本DNA数据库(DDBJ)。

[0006] 成人中的正常细胞更新涉及每天通过细胞分裂产生约 10^{11} 个细胞以及主要通过凋亡使类似数量的细胞死亡。在凋亡过程期间,染色质分解成自细胞释放的单核小体和寡核小体。据报道在正常情况下,在健康受试者中存在的循环核小体的水平低。在患有各种病况的受试者中发现水平升高,所述病况包括许多癌症、自身免疫性疾病、炎性病况、中风和心

肌梗塞 (Holdenreider & Stieber, 2009)。

[0007] 单核小体和寡核小体可通过酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和已报道的数种方法 (Salgame等,1997; Holdenrieder等,2001; van Nieuwenhuijze等,2003) 来检测。这些测定法通常使用抗-组蛋白抗体 (例如抗-H2B、抗-H3或抗-H1、H2A、H2B、H3和H4) 作为捕获抗体以及抗-DNA或抗-H2A-H2B-DNA复合物抗体作为检测抗体。使用这些测定法,本领域的工作者报道,血清中的核小体水平要高于 (高达一个数量级) 取自相同患者的血浆样品中的核小体水平。对于通过PCR进行的DNA的血清和血浆测定而言,这亦为真实的 (Holdenrieder等,2005)。对此的原因未知,但作者推测其可能是因凝血过程期间DNA的额外释放所致。然而,我们已发现的是,现有技术的核小体ELISA测定法的结果并非彼此一致。此外,尽管据报道血清或血浆中的大部分循环DNA作为单核小体和寡核小体存在 (Holdenrieder等,2001),但血清或血浆中核小体和DNA的测定水平并未完全一致。已报道循环无细胞核小体水平的ELISA结果和如通过实时PCR (聚合酶链式反应) 所测定的循环DNA水平之间的相关系数,在血清中为 $r=0.531$ 而在血浆中为 $r=0.350$ (Holdenrieder等,2005)。

[0008] 现行核小体ELISA法用于细胞培养,主要作为检测凋亡的方法 (Salgame等,1997; Holdenrieder等,2001; van Nieuwenhuijze等,2003),以及亦用于测定血清和血浆中的循环无细胞核小体 (Holdenrieder等,2001)。已在许多不同癌症的研究中通过ELISA法测定通过使细胞死亡释放到循环中的无细胞血清和血浆核小体水平,以评价其作为潜在生物标志物的用途 (Holdenrieder等,2001)。据报道在大部分但并非全部研究的癌症中,平均循环核小体水平高。在肺癌受试者中观察到最高的循环核小体水平。在前列腺癌中观察到最低水平,其在健康受试者的正常范围之内。然而,据报道患有恶性肿瘤的患者具有显著不同的血清核小体浓度并且发现患有晚期肿瘤疾病的某些患者具有低的循环核小体水平,其在对健康受试者测得的范围之内 (Holdenrieder等,2001)。因此以及各种非癌原因引起的升高的核小体水平,在临床上未将循环核小体水平用作癌症的生物标志物 (Holdenrieder和Stieber, 2009)。出人意料的是,我们已显示如通过现有技术的这些核小体ELISA法所测得其循环核小体水平低或不可检出的许多癌症受试者,事实上具有升高的循环无细胞核小体水平。我们已设计并证实用于核小体的新型ELISA法,其检测出经现有技术的ELISA法未检出的核小体。

[0009] 用于检测组蛋白PTM的ELISA法亦为本领域已知。将用于游离组蛋白 (未与在核小体复合物中的其它组蛋白和DNA结合) 中的PTM检测的ELISA法用以检测提取 (通常通过酸提取) 自细胞裂解物的组蛋白中的PTM。已报道用于检测循环无细胞核小体中的PTM的免疫测定法 (Bawden等,2005)。最近已报道用于ELISA检测直接包被至微量滴定孔的纯化核小体中的组蛋白PTM的方法 (Dai等,2011)。在此方法中,将通过消化来自培养细胞的染色质提取物获得的核小体直接包被至微量滴定孔并与抗-PTM抗体反应。本领域技术人员应清楚的是,此方法需要相对纯的核小体样品并且不适于在诸如血液、血浆或血清等复杂生物介质中直接测定组蛋白PTM。

[0010] 已报道用于在血浆中检测与特定DNA序列相关的无细胞核小体中的组蛋白PTM (H3K9Me,在赖氨酸残基K9处单甲基化的组蛋白H3) 的改良的染色质免疫沉淀 (ChIP) 法。据报道序列特异性组蛋白甲基化的水平与循环核小体的浓度无关 (Deligezer等,2008)。

[0011] 除通过核小体位置和核小体结构介导的表观遗传信号转导 (根据组成型组蛋白变

体和PTM结构二者)之外,细胞中基因表达的调控亦通过对DNA核苷酸的修饰来介导,其包括DNA的胞嘧啶甲基化状态。本领域已知的是,在某些时候,DNA可在胞嘧啶核苷酸的5'位处甲基化以形成5-甲基胞嘧啶。据报道呈5-甲基胞嘧啶形式的甲基化DNA出现在DNA序列中这样的位置,此处胞嘧啶核苷酸出现在鸟嘌呤核苷酸之后。这些位置简称为“CpG”。据报道在脊椎动物中有超过70%的CpG位置为甲基化的(Pennings等,2005)。含有高比例CpG位点的基因组区常常称为“CpG岛”,以及约60%的人基因启动子序列与这样的CpG岛相关(Rodriguez-Paredes和Esteller, 2011)。在活跃的基因中,这些CpG岛一般为低甲基化的。基因启动子序列的甲基化与稳定基因失活相关。DNA甲基化亦通常出现在重复元件中,包括Alu重复元件和长的散在核苷酸元件(Herranz和Estellar, 2007; Allen等,2004)。

[0012] 癌症中涉及DNA甲基化早已在1983年报道(Feinberg和Vogelstein, 1983)。在癌细胞中观察到的DNA甲基化模式不同于健康细胞中的DNA甲基化模式。相对于健康细胞,重复元件(尤其在着丝粒区周围)在癌细胞中报道为低甲基化的,而特定基因的启动子在癌症中报道为超甲基化的。据报道这两个作用的平衡导致癌细胞中的总体DNA低甲基化(Rodriguez-Paredes; Esteller, 2007)。

[0013] 某些特定基因的超甲基化可用作癌症的诊断性生物标志物。例如报道用于通过PCR扩增提取自血浆的DNA来检测Septin 9基因的超甲基化的方法,据报道检出72%的结肠癌,假阳性率10% (Grutzmann等,2008)。特定基因或基因座的DNA甲基化状态通常通过将除5-甲基胞嘧啶之外的胞嘧啶选择性亚硫酸氢盐脱氨基成尿嘧啶来检测,其导致可通过测序或其它方式来检测的一级DNA序列变化(Allen等,2004)。

[0014] 总体DNA低甲基化为癌细胞的标志(Esteller 2007和Hervouet等,2010)。可使用免疫组织化学(IHC)技术在细胞中研究总体DNA甲基化。或者自细胞中提取DNA用于分析。已报道用于检测提取自细胞的DNA中的总体甲基化的许多方法,包括限制酶消化和最近邻位序列分析、使用氯乙醛的荧光测定法、通过使用DNA甲基转移酶连同氚标记的S-腺苷蛋氨酸将所有CpG位点甲基化以计算未甲基化CpG的量的反向测定法以及将DNA消化成单核苷酸用于通过高效液相色谱、薄层色谱或液相色谱接着质谱法的分析。这些方法的缺点为,其为劳动密集型和/或需要大量优质的提取DNA (Allen等2004)。虽然涉及亚硫酸氢盐脱氨基的基于PCR的方法克服了对于大量DNA的需要,但其必须扩增特定的基因组区(通常为重复序列),作为5-甲基胞嘧啶的总基因组含量的指示(Allen等2004)。用于总体DNA甲基化测定的这些方法已用于研究提取自各种细胞和组织的DNA。一些工作者已研究自全血的白细胞提取的DNA,因为这更易于以微创方式得到(Moore等,2008; Ting Hsiung等,2007; Mansour等,2010)。液相色谱联合质谱法被视为用于总体DNA甲基化测定的黄金标准,但其昂贵,并且必须在分析之前将DNA消化成单核苷酸水平(Vasser等,2009)。

[0015] 用于估计总体DNA甲基化的新近方法包括对提取自组织的水解DNA进行超高压液相色谱联合质谱法(Zhang等,2011)以及甲基化特异性数字测序(MSDS)法(Ogoshi等2011)。已阐述用于总体DNA甲基化的经典竞争性免疫测定法(以及用于总体5-羟甲基胞嘧啶甲基化的类似测定法)。在此方法中,向包被有5-甲基化胞苷缀合物的微量滴定孔中加入提取自细胞或组织的DNA,加入抗-5-甲基胞苷抗体,并将抗体结合在包被的5-甲基胞苷缀合物和提取样品中的甲基化DNA之间的分配与已知标准进行比较以估计样品中存在的总体DNA甲基化水平(Cell Biolabs, 2011)。在另一个免疫测定样的方法中,将提取自组织或者提取

自血浆或血清样品的DNA包被至微量滴定孔并使用抗-5-甲基胞嘧啶抗体检测甲基化DNA (Vasser,等,2009; Epigentek, 2009)。这些方法的缺点为,其需要提取DNA,这涉及将所有核小体和染色质结构变性并从DNA中去除。其不适用于例如,在无DNA提取步骤的情况下直接测定诸如组织裂解物、血液、血浆或血清等生物流体中的总体DNA甲基化。

[0016] 亦已报道DNA中胞嘧啶碱基的5-羟甲基修饰。5-羟甲基化的作用还不完全清楚,但其似乎涉及基因调节(Stroud等,2011)。

[0017] 用于检测总体DNA甲基化的现行方法涉及DNA的提取或纯化并且不适用于快速、高通量、低成本、微创的诊断法。类似地,对其它修饰碱基或稀有碱基(例如尿嘧啶、肌苷、黄嘌呤、次黄嘌呤)的DNA分析仅可通过基本上纯DNA或提取DNA的分析来研究。这类分析不能在诸如组织裂解物、血液、血浆或血清等复杂生物介质中直接进行。

[0018] 还已知组蛋白变体(亦称为组蛋白同种型)为基因表达的表观遗传调节物(Herranz和Esteller, 2007)。已使用多种技术在体内和体外研究组蛋白变体,所述技术包括编码特定变体的基因的敲减研究(例如使用RNAi敲减)、染色质免疫沉淀、氨基酸的稳定同位素标记和定量质谱蛋白质组学、免疫组织化学和蛋白质印迹(Whittle等,2008; Boulard等,2010; Sporn等,2009; Kapoor等,2010; Zee等,2010; Hua等,2008)。

[0019] 已报道在手术中或通过活检移取自诊断为肺癌、乳腺癌和黑素瘤的受试者的组织样品中组蛋白变体表达的免疫组织化学研究。这些免疫组织化学研究报告,切除的癌组织样品中的组蛋白巨H2A (mH2A)和H2AZ变体的染色在这些癌症中可具有预后应用(Sporn等,2009, Hua等,2008, Kapoor等,2010)。免疫组织化学法用于临床用途的一个缺点为,组织样品收集为侵入性的,其涉及手术或活检。免疫组织化学法的另一个缺点为,其不适用于早期诊断或筛查诊断,因为所述疾病的合理预期通常必须早已存在于进行活检或组织切除之前。微创性血液ELISA测试适于更大范围的应用并且将克服这些缺点和对患者而言为更优选的,以及对医疗保健提供者而言为更快、更低成本和更高通量的。

[0020] 然而,未曾在血液或任何其它介质中测定含特定核苷酸、修饰核苷酸或组蛋白变体的无细胞核小体并且未曾提出或考虑这类测定。未曾报道对于血液的无细胞核小体中核苷酸、修饰核苷酸或组蛋白变体存在或不存在的研究,亦未曾报道其作为疾病的血液生物标志物是否有价值。目前没有用于检测或测定完整无细胞核小体中的核苷酸、修饰核苷酸或组蛋白变体的方法。我们在此报道用于所述测试的方法及其在取自健康和患病受试者的血浆和血清样品中的用途。出人意料的是,我们已显示可在血浆和血清样品中检出高水平的包含特定组蛋白变体的完整核小体,对所述样品通过现有技术的核小体ELISA法未检出核小体或检出低水平的核小体。

[0021] 发明概述

根据本发明的第一方面,提供包含组蛋白变体或组蛋白同种型的无细胞核小体,其用作诊断癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病和类风湿性关节炎的生物标志物。

[0022] 根据本发明的第二方面,提供用于检测样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 使所述样品与结合剂接触,所述结合剂与所述组蛋白变体或组蛋白同种型结合;
- (ii) 检测或定量所述结合剂与样品中所述组蛋白变体或组蛋白同种型的结合;和

(iii) 使用所述结合的存在或程度作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

[0023] 根据本发明的第三方面,提供用于检测样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的方法,所述方法包括步骤:

(i) 使所述样品与第一结合剂接触,所述第一结合剂与核小体结合;

(ii) 使所述核小体或样品与第二结合剂接触,所述第二结合剂与所述组蛋白变体或组蛋白同种型结合;

(iii) 检测或定量所述第二结合剂与样品中的组蛋白变体或组蛋白同种型的结合;和

(iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

[0024] 根据本发明的第四方面,提供用于检测样品中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的方法,所述方法包括步骤:

(i) 使所述样品与第一结合剂接触,所述第一结合剂与所述组蛋白变体或组蛋白同种型结合;

(ii) 使所述核小体或样品与第二结合剂接触,所述第二结合剂与所述核小体结合;

(iii) 检测或定量所述第二结合剂与样品中核小体的结合;和

(iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

[0025] 根据本发明的又一方面,提供用于在血液、血清或血浆样品中检测含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的方法,所述方法包括步骤:

(i) 自核小体复合物中移出、释放或提取所述组蛋白变体或同种型以产生游离的组蛋白变体或同种型部分;

(ii) 检测或定量样品中的所述游离组蛋白变体或同种型;和

(iii) 使用游离组蛋白变体或同种型的存在或量作为样品中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的量度。

[0026] 根据本发明的又一方面,提供用于检测细胞中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体的存在的方法,所述方法包括步骤:

(i) 自细胞中分离染色质;

(ii) 消化、超声处理或以其它方式分解所述染色质以形成单核小体和/或寡核小体;和

(iii) 依照本发明的方法检测或测定所述核小体中所述组蛋白变体或组蛋白同种型的存在。

[0027] 根据本发明的又一方面,提供用于检测或诊断动物或人受试者中的疾病状态的方法,所述方法包括步骤:

(i) 检测或测定受试者体液中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(ii) 使用测得的核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型水平鉴定所述受试者的疾病状态。

[0028] 根据本发明的又一方面,提供用于评估动物或人受试者对药物治疗的适应性的方法,所述方法包括步骤:

(i) 检测或测定受试者体液中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(ii) 使用测得的核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型水平作为选择用于受试者的合适治疗的参数。

[0029] 根据本发明的又一方面,提供用于监测动物或人受试者的治疗的方法,所述方法包括步骤:

(i) 检测或测定受试者体液中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;

(ii) 在一个或多个时机下重复检测或测定受试者体液中含组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(iii) 使用在测得的核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型水平上的任何变化作为在受试者病况上的任何变化的参数。

[0030] 根据本发明的又一方面,提供鉴定用于检测或诊断动物或人受试者中的疾病状态的组蛋白变体或组蛋白同种型生物标志物的方法,所述方法包括步骤:

(i) 检测或测定受试者体液中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;

(ii) 检测或测定健康受试者或对照受试者体液中含所述组蛋白变体或组蛋白同种型的核小体;和

(iii) 使用在患病和对照受试者中测得的水平之间的差异来鉴定组蛋白变体或组蛋白同种型是否可用作所述疾病状态的生物标志物。

[0031] 根据本发明的又一方面,提供经本发明的所述方法鉴定的生物标志物。

[0032] 根据本发明的又一方面,提供用于检测核小体相关的组蛋白变体或组蛋白同种型的试剂盒,所述试剂盒包含对所述组蛋白变体或组蛋白同种型或其组成部分、或者所述组蛋白变体或组蛋白同种型或其组成部分的结构/形状模拟物特异的配体或结合物,连同所述试剂盒的使用说明书。

[0033] 附图简述

图1. 用于检测通过公布方法(*Holdenrieder等, 2001)制备的稀释到小牛血清中的含组蛋白变体巨H2A1.1的人无细胞核小体的ELISA剂量反应曲线。

[0034] 图2. 用于检测在提取自MCF7细胞、稀释到小牛血清的的交联消化染色质中无细胞核小体中的组蛋白变体巨H2A2的ELISA剂量反应曲线。

[0035] 图3. 用于检测在提取自MCF7细胞、稀释到小牛血清的交联消化染色质中无细胞核小体中的组蛋白变体H2AZ的ELISA剂量反应曲线。

[0036] 图4. 使用现有技术的核小体ELISA法对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的核小体水平。

[0037] 图5. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体mH2A1.1水平。

[0038] 图6. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体mH2A2水平。

[0039] 图7. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体H2AZ水平。

[0040] 图8. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的P-H2AX (Ser139) 水平。

[0041] 图9. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清和EDTA血浆样品测得的

无细胞核小体相关的5-甲基胞嘧啶甲基化DNA水平。

[0042] 图10. 使用本发明的ELISA对取自20个健康志愿者的血清样品测得的无细胞核小体相关的5-羟甲基胞嘧啶甲基化DNA水平。

[0043] 图11. 使用本发明的ELISA法对取自3个结肠癌受试者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白类型和核苷酸的水平。

[0044] 图12. 使用本发明的ELISA法对取自13个肺癌受试者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白类型和核苷酸的水平。

[0045] 图13. 使用本发明的ELISA法对取自2个胰腺癌受试者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白类型和核苷酸的水平。

[0046] 图14. 使用本发明的ELISA法对取自1个口腔癌受试者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白类型和核苷酸的水平。

[0047] 图15. 对取自4种不同癌症疾病的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白类型和核苷酸的水平,将其标准化为使用本发明的ELISA法测得的核小体相关的5-甲基胞嘧啶甲基化DNA水平的比例。显示通过*Holdenrieder等2001的方法产生的来自健康志愿者的含核小体样品的标准化水平以用于比较。

[0048] 图16. 使用生物素化的抗-H2AZ检测抗体和两种不同的单克隆抗-组蛋白捕获抗体测定的取自癌症患者的人EDTA血浆样品的无细胞核小体相关的组蛋白H2AZ水平。

[0049] 图17. 使用本发明的ELISA法在取自健康志愿者的EDTA血浆、柠檬酸盐血浆和肝素血浆样品中测得的无细胞核小体相关的mH2A1.1、H2AZ、P-H2AX (Ser139) 和5-甲基胞嘧啶(5mc)水平。

[0050] 图18. 使用本发明的ELISA法对取自3个健康志愿者和10个结肠癌受试者的血清样品测得的无细胞核小体相关的5-甲基胞嘧啶水平。

[0051] 图19. 对取自13个健康志愿者和55个癌症患者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体H2AZ水平。显示定义为健康样品的平均值加上平均值中的一倍或两倍标准差的截止点。

[0052] 图20. 对取自10个健康志愿者和61个癌症患者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体H2AZ水平。显示定义为健康样品的平均值加上平均值中的两倍标准差的截止点。

[0053] 图21. 对取自4个健康志愿者和20个胰腺癌患者的血清样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体H2AZ水平。所示截止点定义为健康样品的平均值加上平均值中的两倍标准差。

[0054] 图22. 对取自具有渐增的肿瘤大小、阶段和疾病的结节形成的肺癌患者的EDTA血浆样品测得的无细胞核小体相关的组蛋白变体H2AZ水平。

[0055] N1 在同侧支气管周围和/或同侧门部淋巴结和肺内结节中转移,包括通过直接蔓延涉及

N2 在同侧纵膈和/或隆突下淋巴结中转移

N3 在对侧纵膈、对侧门部、同侧或对侧斜角肌或锁骨上淋巴结中转移

T1:肿瘤<3cm

T2:3cm<肿瘤<7cm

T3:肿瘤>7cm

T4:侵入其它器官、组织的任何大小的肿瘤

M0:疾病未扩散至局部淋巴结

M1:疾病扩散至远端转移。

[0056] 图23. 使用本发明的ELISA法对取自10种不同癌症疾病的EDTA血浆样品测得的平均无细胞核小体相关的核苷酸和组蛋白类型的水平,将其标准化为核小体相关的5-甲基胞嘧啶(5mc)甲基化DNA水平的比例并相对于在11个健康受试者中发现的平均比例表示。

[0057] 图24. 使用本发明的ELISA法对取自2个心肌病患者、10个系统性红斑狼疮(狼疮)患者、12个溃疡性结肠炎患者、10个慢性阻塞性肺病(COPD)患者、8个克罗恩病患者和10个类风湿性关节炎(RA)患者测得的平均无细胞核小体相关的核苷酸和组蛋白类型的水平,将其标准化为核小体相关的5-甲基胞嘧啶(5mc)甲基化DNA水平的比例并相对于在11个健康受试者中发现的平均比例表示。

[0058] 发明详述

根据本发明的第一方面,提供包含组蛋白变体或组蛋白同种型的无细胞核小体,其用作诊断癌症、心肌病、系统性红斑狼疮、结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病和类风湿性关节炎的生物标志物。

[0059] 在一个实施方案中,所述核小体为单核小体或寡核小体。

[0060] 根据可能提及的本发明的一个具体方面,提供组蛋白变体或组蛋白同种型用作诊断癌症的生物标志物的用途。

[0061] 在一个实施方案中,所述癌症为膀胱、乳腺、结肠、宫颈、食道、肾、大肠、肺、口腔、卵巢、胰腺、前列腺、直肠、皮肤或胃的癌症。在可能提及的一个具体实施方案中,所述癌症为结肠、肺、口腔或胰腺的癌症。

[0062] 我们已开发出用于检测和测定含组蛋白变体巨H2A1.1 (mH2A1.1)、巨H2A2 (mH2A2)和H2AZ的核小体的ELISA试验。我们使用抗-组蛋白抗体作为这些测定法的捕获抗体,组合以适当的特异性抗-组蛋白变体抗体作为检测抗体。我们已显示这些ELISA法以可变的抗-核小体捕获抗体进行。我们亦使用所述测定法显示,含特定组蛋白变体的核小体可在取自患病受试者的血样中测定并且对于用作无创或微创性生物标志物而言为有辨别力的。在取自患病受试者的血清和血浆样品的核小体中测得的组蛋白变体水平(相对于其它核小体表位的水平)不同于在来自健康受试者的样品中测得的水平。此外发现,在来自不同疾病的样品的核小体中测得的含不同组蛋白变体的核小体水平的模式因不同的疾病而不同,尤其是在与对含不同核苷酸和PTM的核小体测得的模式组合来检测核小体相关的组蛋白变体模式的情况下,使得疾病的差别诊断为可能的。本领域技术人员应清楚的是,将用于含不同或另外的组蛋白变体或组蛋白修饰或核苷酸的核小体的测试包含在内应有可能改进使用这类模式差别诊断的辨别力。

[0063] 为了使用现有技术的方法研究在健康受试者中发现的核小体水平,我们测定了取自20个健康受试者的血清和血浆样品中的核小体。现有技术的两种方法均在取自健康受试者的血清样品中得到高于血浆样品中的信号。所述结果在图4中显示。这与血清中的核小体水平高于血浆的已公布数据相一致(*Holdenrieder等,2001)。

[0064] 为了使用本发明的方法研究在健康受试者中发现的核小体水平,我们在20个健康

受试者的血清和健康牛血清中测定了含三种组蛋白变体的核小体。对于所有的20个健康受试者,全部三种ELISA测试的血清结果均低或不可检出。对于本发明的三种ELISA法,我们亦在取自20个健康受试者的EDTA血浆样品中进行了类似试验,并且出人意料地观察到较高的信号。通过本发明的方法在健康人EDTA血浆中测得高水平的含组蛋白变体mH2A1.1、mH2A2和H2AZ以及组蛋白P-H2AX (Ser139) 的无细胞核小体,而在健康人血清中测得较低水平,如图5-8所示。图9和10显示对于其它核小体结构获得相似的结果。此研究结果为意想不到的并且与公布的结果(*Holdenrieder等,2001) 和我们以现有技术的核小体ELISA法发现的结果两者不同。因此出人意料的是,对于存在于血清和EDTA血浆样品中的核小体的相对水平,本发明的方法得到与现有技术的方法相反的结果。

[0065] 我们研究了核小体结构在可收集的所有不同的常见类型的血浆中是否均为可检测的。我们发现,在取自健康受试者的EDTA血浆中,通过本发明的方法可检出高水平的无细胞核小体相关的H2AZ、mH2A1.1和P-H2AX (Ser139),其次是在取自健康受试者的柠檬酸盐血浆中,但是在取自健康受试者的肝素血浆样品中,在缓冲液或马血清背景信号下未能检出核小体相关的H2AZ、mH2A1.1和P-H2AX (Ser139)。发现某些肝素血浆样品 (2/5) 含有可检测水平的核小体相关的5-甲基胞嘧啶。所述结果在图17中显示。概括地说,使用本发明的方法在取自健康受试者的大部分或全部EDTA血浆和柠檬酸盐血浆样品中发现相对高浓度的无细胞核小体,但在取自健康受试者的肝素血浆或血清样品中其低或不存在。因此清楚的是,样品类型的正确选择对不同应用而言极其重要。

[0066] 我们已显示用于检测含特定组蛋白结构的无细胞核小体的样品选择涉及数个参数。这些参数包括在取自健康受试者的血清和肝素血浆样品中通常存在的无细胞核小体的低水平、在取自健康受试者的EDTA和柠檬酸盐血浆样品中通常存在的较高水平、应在自凝块中分离血清之后通过添加EDTA使含无细胞核小体的血清样品稳定的建议(*Holdenreider等,2001) 以及血清取样方案。亦可使用其它稳定剂(例如蛋白酶抑制剂)。在可能的情况下我们使用这样的血清样品,将其在静脉穿刺(其后加入10mM EDTA) 的1小时内离心并将所述样品冷冻。

[0067] 对于临床样品的血样类型的选择应基于对具体试验而言最佳的临床辨别力来进行。根据我们通过本发明的方法在健康受试者的血清中发现始终低的核小体水平的结果,我们在取自患有各种癌症疾病的受试者的血清样品中测定了含组蛋白变体mH2A1.1和H2AZ的核小体。观察到对肺癌高达75%和对胰腺癌高达80%的临床灵敏性(图21)。我们亦对来自癌症患者的血清样品测试了含5-甲基胞嘧啶的核小体以及对于结肠癌样品,如图18所示观察到高达100%的临床灵敏性。

[0068] 我们亦在取自患有各种疾病的受试者的EDTA血浆样品中测定了含各种组蛋白变体的无细胞核小体和其它核小体结构的相对水平。无细胞核小体的水平在取自健康受试者和患病受试者二者的EDTA血浆样品中均高并因此EDTA血浆样品似乎不可能为用于患病和健康受试者的灵敏辨别物的最佳样品选择。然而,我们已显示的是,就含不同组蛋白变体的核小体(以及其它核小体结构) 的相对水平而言,循环无细胞核小体的水平和组成在患病和健康个体中不同并且在不同疾病之间亦不同。因此我们首先同时报道(i) 高水平的循环核小体存在于取自健康或患病受试者二者的全部或大部分EDTA血浆样品中,但并非全部血样类型均如此;和亦报道(ii) 出人意料的是,仍然可通过基于存在于患病和健康受试者血浆

中的核小体结构的一种或多种相对类型的水平和结构特征分析这些EDTA血浆核小体,来进行疾病的检测和疾病类型的辨别。

[0069] 我们在分别由55和62个癌症受试者组成的两个实验中测定了取自健康受试者和患有各种癌症类型的117个受试者的EDTA血浆中的无细胞核小体。使用针对核小体相关的组蛋白变体H2AZ的本发明的方法,使用对于健康受试者的平均结果+平均值的2倍标准差的截止水平,总计90% (105/117)的癌症样品正确鉴定为癌症阳性。

[0070] 在这2个实验的第一个中,我们测定了取自13个健康受试者和患有胃癌、大肠癌、直肠癌、肺癌(小细胞肺癌和各种非小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌和各种口腔癌(口腔、腭、咽和喉)的55个受试者的EDTA血浆中的无细胞核小体。来自健康受试者和癌症患者的全部样品均为无细胞核小体阳性的。然而,在取自癌症受试者的样品测得的水平要高于在来自健康受试者的样品中发现的水平以及所述结果显示健康受试者和癌症受试者为可辨别的。例如对于H2AZ核小体测定,以OD方式计算为平均值±平均值的2倍标准差的正常范围为0-0.95。使用此0.95的截止值,所有13个健康受试者对于升高的核小体H2AZ水平均为阴性的。相比之下,对55个癌症样品中的46个发现对于升高的核小体H2AZ水平的阳性结果(84%的总体临床灵敏性),包括100% (8/8)的胃癌样品、100% (5/5)的大肠癌样品、67% (2/3)的直肠癌样品、83% (5/6)的小细胞肺癌样品、79%的非小细胞肺癌样品、50% (3/6)的乳腺癌样品、100% (1/1)的卵巢癌样品、83% (5/6)的前列腺癌样品、100% (1/1)的肾癌样品和100% (5/5)的口腔癌样品。所述结果在图19中显示。

[0071] 在本发明的一个实施方案中,提供对照样品并结合所述对照样品的结果确定所述测定法区分阳性或阴性结果的截止水平。这可以是等于或高于或低于对照样品结果的水平的任何比例。低于此水平的患者结果视为阴性而高于此水平的患者结果视为阳性。亦可能存在非常接近截止水平的“灰区”范围的患者结果,对其而言结论视为不确定的和/或应重复所述测试。

[0072] 类似地,对于核小体相关的mH2A1.1测定,所述正常范围为0-0.91。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而64% (35/55)的癌症样品为阳性的。对于核小体相关的P-H2AX(Ser139)测定,所述正常范围为0-1.08。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而60% (33/55)的癌症样品为阳性的。亦测定了核小体相关的5-甲基胞嘧啶以及所述正常范围为0-1.41。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而55% (30/55)的癌症样品为阳性的。因此某些核小体测定表现出比其它核小体测定更佳临床灵敏性。

[0073] 此外,有可能使用核小体结构的模式来改进本发明的临床效用。这可例如通过将所述核小体相关的H2AZ测定的截止点降至平均值+ 1倍标准差来完成,其得到高达0.69的范围。在此情况下假阴性的数量降为3,得到改善的95% (52/55)的临床灵敏性,代价是使取自健康受试者的样品在假阳性结果上从0%增至23% (3/13)。所述结果在图19中显示。

[0074] 对于H2AZ相关的核小体或任何核小体发现为阳性的样品,可审查核小体结构特征。所述核小体特征可用于区分健康和患病受试者,如图23和24所述,其中患病受试者中各种核小体结构的相对比例,相对于在健康患者和患有其它非癌疾病的患者中发现的相对比例表示。这显示,测试组中多种核小体结构的研究可利于更好的临床辨别。

[0075] 类似地,可通过组合来自多于一个测试的比率形式的数据来增加本发明的诊断特异性和/或灵敏性。例如通过使用核小体相关的H2AZ:mH2A1.1比率。

[0076] 因此,本发明的方法能够在取自癌症患者的血浆和血清样品二者中检测癌症。

[0077] 我们测定了取自3个结肠癌患者、13个肺癌患者、2个胰腺癌患者和1个口腔癌患者的EDTA血浆样品中含三种不同组蛋白变体的循环无细胞核小体的水平,并将这些水平与来自20个健康受试者的血样中存在的水平进行比较,以及与如文献(*Holdenreider等,2001)所述制备自健康受试者的人工制备的核小体制品进行比较。我们亦将观察到的水平以标准化形式表示为含不同表位的核小体水平的比率并显示,所述比率或比率模式对一般癌症的诊断和特殊癌症类型的鉴别诊断二者而言均为有用的。我们亦研究了核小体相关的组蛋白H2AZ水平是否随疾病进展而改变。我们观察到的是,含组蛋白变体的无细胞核小体的平均水平随疾病的严重性而增加并且随疾病逐渐扩散至淋巴结以及随渐增的肿瘤大小和阶段而升高。这为测得的核小体为肿瘤相关的提供了证据。

[0078] 我们亦使用现有技术的两种核小体ELISA法测定了存在于这19个癌症样品中的核小体。如通过现有技术的核小体ELISA 1和2所测定,发现研究的19个癌症受试者的大部分具有低的EDTA血浆核小体水平。此结果说明了现有技术的测定法未用于常规临床目的的一个原因。

[0079] 我们使用本发明的ELISA法在相同的19个样品中测定含组蛋白变体mH2A1.1、mH2A2和H2AZ的核小体。在19个样品的16个中检出含组蛋白变体尤其是mH2A2和H2AZ的核小体。因此在一个实施方案中,本发明提供一种新型的核小体ELISA法,其能够检测经现有技术的核小体测定法未检出的核小体。

[0080] 我们亦在相同的取自癌症受试者的19个样品以及通过文献(*Holdenrieder等,2001)所述方法产生自健康受试者的核小体样品中测定了含2种不同的核苷酸和组蛋白PTM的核小体水平。我们使用这些测定结果连同本文所述的核小体相关的组蛋白变体测定结果,作为存在于取自患有4种不同类型癌症的受试者的生物流体和具有产生自健康受试者的核小体的生物流体中的一组不同的无细胞核小体。出人意料的是,在研究的4种类型的癌症(肺癌、结肠癌、胰腺癌和口腔癌)中发现的核小体模式均可区别于在产生自健康受试者的核小体样品中发现的模式。此外,基于在受试者血液中可检测的无细胞核小体的模式,不同的癌症类型亦彼此区别。因此在本发明的一个实施方案中,提供用于通过对样品测试一组不同的核小体表位来检测或诊断疾病的存在、类型、复发或严重性或者评价最佳药物或其它治疗选项的方法,其由含不同组蛋白变体或者一种或多种DNA组蛋白变体的组合以及一种或多种组蛋白DNA碱基和/或一种或多种组蛋白修饰的核小体的两个或更多个测量和/或核小体自身的测量或者任何这些的任何组合或比率组成,作为受试者的健康或疾病状态的指示物。

[0081] 类似地,我们使用本发明的ELISA法检测各种癌症和非癌疾病中在循环无细胞核小体的组蛋白和核苷酸结构上的可变性,并将此与在11个健康受试者中发现的核小体结构进行比较。发现核小体存在于研究的所有癌症和非癌疾病中并且发现其具有不同于健康受试者的特征。

[0082] 我们研究了取自2个心肌病患者、10个系统性红斑狼疮(狼疮)患者、12个溃疡性结肠炎患者、10个慢性阻塞性肺病(COPD)患者、8个克罗恩病患者和10个类风湿性关节炎(RA)患者的EDTA血浆样品,并将各种核小体结构的水平标准化为核小体相关的5-甲基胞嘧啶水平的比例并相对于健康受试者中发现的水平表示。我们发现所述疾病与核小体结构特征相

关,所述核小体结构特征不同于健康或癌症受试者中的结构特征。因此核小体结构特征可在多种非癌疾病中用作检测、预后预测、监测和治疗效果预测的诊断性工具。所述结果在图24中显示。

[0083] 我们亦使用本发明的ELISA法,对取自患有10种不同癌症疾病的55个患者的EDTA血浆样品研究了就测得的组蛋白类型和核苷酸而言在无细胞核小体结构上的可变性,将其标准化为核小体相关的5-甲基胞嘧啶(5mc)甲基化DNA水平的比例并相对于在11个健康受试者中发现的平均比例表示。我们发现了存在于全部受试者中的核小体以及在癌症疾病、非癌疾病和健康受试者之间不同的核小体结构特征。因此,核小体结构特征可在癌症和其它疾病中用作检测、预后预测、监测和治疗效果预测的诊断性工具。所述结果在图23和24中显示。

[0084] 已对组蛋白H2A、H2B和H3报道多种同种型或变体。换言之,据报道组蛋白H4以单一形式存在(Tachiwana等, 2011)。本领域技术人员应清楚的是,使用靶定与组蛋白H4结合的抗体或结合物的本发明的ELISA法,与样品中几乎全部的核小体结合。因此在一个实施方案中,本发明提供用于检测核小体本身的新方法,其中以确保检出全部或大部分核苷酸的方式测定含常见组蛋白变体的核小体。本领域技术人员另外应清楚的是,针对此应用产生的合适抗体或配体可靶定未经PTM修饰的组蛋白H4的区。这将进一步增加所选表位作为对全部或大部分核小体而言共有的表位的通用性。类似地,本领域技术人员应清楚的是,可使类似的合适抗体靶定结合所选的其它组蛋白部分的区,使得所述区对于所述组蛋白部分的全部或大部分组蛋白变体或同种型而言为共有的并且未经PTM(例如但不限于组蛋白H2A、H2B或H3的共有区)。因此所述的本发明提供在样品中检测全部或大部分核小体的方式,而与组成的组蛋白同种型和PTM上的变化无关。

[0085] 我们推断,本发明的方法为用于检测和测定含特定组蛋白同种型或变体的核小体的成功方法,此方法亦可用作检测核小体本身的方法,以及与现有技术的方法相比其为用于检测核小体本身的更优方法。因此使用的本发明的方法与现有技术用于测定核小体的方法相比具有优势。本领域技术人员应清楚的是,本发明的方法可用于直接在任何样品中检测和测定核小体,其中所述核小体存在于例如通过消化提取自细胞的染色质获得的样品中或存在于诸如血液、血清或血浆样品等生物流体中。亦应清楚的是,可对任何组蛋白变体或修饰的组蛋白变体开发本文所述的方法,可产生对其的抗体或其它结合物。

[0086] 已对许多癌症和非癌疾病测试本发明并发现其在测试的所有疾病的检测中均为有效的。这包括据报道经现有技术的核小体测试不可检出的前列腺癌病例的检测(Holdenrieder, 2001)。清楚的是,本发明对于全部或大部分癌症的检测而言为有效的。本领域技术人员应清楚的是,可通过包含另外的核小体结构测试和通过检测存在的不同核小体结构的比率来进一步改进本发明的临床性能。

[0087] 根据本发明的一个方面,提供用于通过免疫测定法检测和测定样品中含特定组蛋白变体或同种型的无细胞核小体的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 使所述样品与结合组蛋白变体的抗体或其它结合物接触;
- (ii) 检测和/或定量所述抗体或其它结合物与样品中组蛋白变体种类的结合;和
- (iii) 使用所述结合的存在或程度作为样品中核小体相关组蛋白变体的存在的量度。

[0088] 根据本发明的又一方面,提供用于检测和测定样品中含特定组蛋白变体或同种型

的无细胞核小体的双抗体免疫计量或夹心免疫测定法。这方面的一个实施方案为包括以下步骤的免疫测定法：

- (i) 使可能包含核小体的样品与结合核小体的第一抗体或其它结合物接触；
- (ii) 使所述核小体或样品与结合组蛋白变体的第二抗体或其它结合物接触；
- (iii) 检测和/或定量所述第二抗体或其它结合物与样品中组蛋白变体种类的结合；和
- (iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中核小体相关组蛋白变体的存在的量度。

[0089] 根据另一个实施方案，提供用于通过免疫测定法检测和测定样品中含特定组蛋白变体或同种型的无细胞核小体的方法，所述方法包括步骤：

- (i) 使可能包含核小体的样品与结合组蛋白变体的第一抗体或其它结合物接触；
- (ii) 使所述核小体或样品与结合核小体的第二抗体或其它结合物接触；
- (iii) 检测和/或定量所述第二抗体或其它结合物与样品中核小体的结合；和
- (iv) 使用所述结合的存在或程度作为样品中核小体相关的组蛋白变体的存在的量度。

[0090] 在本发明中可使用各种抗体或其它结合物作为与核小体结合的结合物。这些包括指向与存在于完整核小体中且不存在于游离组蛋白中的表位（例如在核小体的两个组蛋白之间的连接处存在的表位）结合的结合物以及亦包括指向包括常见核小体蛋白、组蛋白或核酸表位在内的任何核小体组分的结合物。我们使用两种不同的捕获抗体用本发明的方法测定样品并显示所用的具体捕获抗体实质上不会影响本发明的方法的结果。所述结果在图16中显示。

[0091] 本领域技术人员应清楚的是，本发明所述的方法包括多种实施方案，包括经典的竞争性免疫测定法以及生物传感器型测定法和例如由美国ForteBio Incorporated销售的无标记测定法类型，其实际上可能是免疫计量的。

[0092] 根据本发明的一个实施方案，提供用于通过无标记免疫计量免疫测定法检测和测定样品中的组蛋白同种型或变体或者核小体相关的组蛋白同种型或变体的方法，所述方法包括步骤：

- (i) 使所述样品与结合组蛋白同种型或变体的抗体或结合物接触；
- (ii) 检测和/或定量所述抗体或其它结合物与样品中组蛋白同种型或变体的结合；和
- (iii) 使用所述结合的存在或程度作为样品中组蛋白同种型或变体或者核小体相关的组蛋白同种型或变体的存在的量度。

[0093] 根据本发明的又一个实施方案，提供用于通过竞争性免疫测定法检测和测定样品中的无细胞组蛋白同种型或变体或者核小体相关的组蛋白同种型或变体的方法，所述方法包括步骤：

- (i) 使所述样品与结合组蛋白同种型或变体的抗体或结合物接触；
- (ii) 检测和/或定量所述抗体或其它结合物与样品中组蛋白同种型或变体的结合；和
- (iii) 使用所述结合的存在或程度作为样品中组蛋白同种型或变体的存在的量度。

[0094] 根据本发明的又一方面，提供用于检测样品中包含组蛋白同种型的核小体的比例的方法，所述方法包括步骤：

- (i) 检测或测定样品中核小体的水平；
- (ii) 依照本发明的方法检测或测定核小体相关的组蛋白同种型的水平；和
- (iii) 使用所述两个测定结果确定包含所述组蛋白同种型的核小体的比例。

[0095] 根据本发明该方面的一个实施方案,使用本发明的方法测定样品中的总核小体水平和核小体相关的目的组蛋白变体水平二者。在另一个实施方案中,使用现有技术的核小体ELISA法确定总核小体水平。在又一个实施方案中,将总DNA的测定用作代表总核小体水平。

[0096] 我们已显示,取自受试者的血液中含组蛋白变体的核小体的检测和测定可用作鉴定患有癌症的受试者和区分其与健康受试者的诊断方法。此外我们已显示的是,含一组不同组蛋白变体、核苷酸和组蛋白PTM的核小体的模式可用于区分不同的癌症。本领域技术人员应清楚的是,这为癌症血液测试提供了基础,其将在受试者中检测癌症并可用于区分癌症阳性受试者中的癌症类型。根据本发明的另一方面,提供通过测定或检测体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的存在和/或水平或浓度,并使用所述检出水平作为受试者的疾病状态的生物标志物来检测或诊断疾病存在的方法,其包括但不限于疾病的临床诊断、疾病类型或亚型的鉴别诊断、或疾病预后、或疾病复发、或者受试者对治疗方案的易感性的诊断。本领域技术人员应理解的是,用于诊断测试的体液包括但不限于血液、血清、血浆、尿、脑脊液和其它流体。在优选的实施方案中,选为样品的体液为血液、血清或血浆。体液中核小体相关的组蛋白变体的测定反应水平、浓度或量可用绝对术语或相对术语表达,例如但不限于作为存在的总核小体或总DNA水平的比例或者作为对含另一种组蛋白变体或核苷酸或PTM的核小体水平的比率。

[0097] 根据本发明的又一方面,提供用于检测或测定细胞中含特定组蛋白变体的核小体的存在和/或水平的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 自细胞中分离染色质;
- (ii) 使所述染色质分解以形成单核小体和/或寡核小体;和
- (iii) 借助于如本文所述的免疫测定法检测或测定所述单核小体和/或寡核小体中组蛋白变体的存在。

[0098] 用于自染色质产生单核小体和/或寡核小体的方法为本领域所熟知并且包括酶消化和超声处理(Dai等,2011)。我们已使用标准程序自MCF7细胞中产生无细胞核小体并使用本发明的方法显示这些MCF7核小体的确包括含组蛋白变体mH2A1.1、H2AZ以及P-H2AX(Ser139)的核小体。

[0099] 在一个实施方案中,选择用于通过所述方法检测的组蛋白变体为存在于全部或大部分完整核小体中的常见同种型,提供用于检测或测定核小体本身的方法。在另一个实施方案中,选择用于通过所述方法检测的组蛋白同种型上的表位位于组蛋白同种型中这样的区,其为所述组蛋白的全部或大部分同种型所共有并存在于所述组蛋白的全部或大部分同种型中,以及因此存在于全部或大部分完整核小体中并且未进一步经PTM,提供用于检测或测定核小体本身的方法。

[0100] 本领域技术人员应理解的是,与包括IHC、蛋白质印迹或FACS在内的目前使用的方法相比,检测细胞或组织中的核小体相关组蛋白变体的所述方法更加简便、快速、便宜、更好地定量和/或更可重现。具体的核小体相关的组蛋白变体的水平、浓度或量可用绝对术语或相对术语表示,例如作为存在的总核小体或总DNA的比例或者作为对含另一种组蛋白变体或PTM或核苷酸的核小体水平的比率。

[0101] 本领域技术人员应清楚的是,关于本发明的任何方面的术语抗体、结合物或配体,

不限于但意图其包括能够与特定分子或实体结合的任何结合物以及任何合适的结合物均可用于本发明的方法。亦应清楚的是,术语核小体意图包括单核小体和寡核小体以及可在流体介质中分析的任何这类染色质片段。

[0102] 根据本发明的另一方面,提供用于检测或测定核小体的试剂盒,所述试剂盒包含对所述组蛋白变体或其组成部分、或者所述核小体或其组成部分的结构/形状模拟物特异的配体或结合物,连同依照本文所定义的任何方法的试剂盒使用说明书。

[0103] 根据本发明的又一方面,提供用于检测或测定含特定组蛋白变体的核小体的试剂盒,所述试剂盒包含对所述组蛋白变体或其组成部分、或者所述核小体或其组成部分的结构/形状模拟物特异的配体或结合物,连同依照本文所定义的任何方法的试剂盒使用说明书。

[0104] 根据本发明的另一方面,提供鉴定用于检测或诊断动物或人中的疾病状态的组蛋白变体生物标志物的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 检测或测定患病受试者体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的水平;
- (ii) 检测或测定对照受试者体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的水平;
- (iii) 使用在患病和对照受试者中检出的水平之间的差异鉴定具体组蛋白变体是否可用作所述疾病的生物标志物。

[0105] 本领域技术人员应清楚的是,可在多个基础上选择对照受试者,其可包括例如已知未患疾病的受试者或者可以是患有不同疾病的受试者(例如用于鉴别诊断的研究)。

[0106] 根据本发明的又一方面,提供鉴定用于评价患病动物或人受试者的预后的组蛋白变体生物标志物的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 检测或测定患病受试者体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的水平;和
- (ii) 将在患病受试者体液中测得的含组蛋白变体的无细胞核小体的水平与受试者的疾病结果相关联。

[0107] 根据本发明的又一方面,提供用于鉴定组蛋白变体生物标志物的方法,所述生物标志物用于为需要治疗的患病动物或人受试者选择治疗方案,所述方法包括步骤:

- (i) 检测或测定患病受试者体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的水平;和
- (ii) 将在患病受试者体液中测得的含组蛋白变体的无细胞核小体的水平与在所述受试者中观察到的治疗方案的功效相关联。

[0108] 根据本发明的又一方面,提供鉴定用于监测患病动物或人受试者的治疗的组蛋白变体生物标志物的方法,所述方法包括步骤:

- (i) 检测或测定患病受试者体液中含组蛋白变体的无细胞核小体的水平;
- (ii) 在所述受试者的疾病进展期间在一个或多个时机下重复所述检测或测定;和
- (iii) 将在患病受试者体液中测得的含组蛋白变体的无细胞核小体的水平与所述受试者中的疾病进展相关联。

[0109] 根据本发明的又一方面,提供通过如本文所定义的方法鉴定的生物标志物。

[0110] 本领域技术人员应清楚的是,还可通过以下程序在包括血液、血浆、血清和尿在内的生物流体中检测含组蛋白变体的无细胞核小体,所述程序涉及自核小体复合物中提取所述组蛋白变体蛋白接着用于检测或定量所提取的游离组蛋白变体蛋白的方法。合适的提取程序包括对组蛋白常用的酸提取程序,其利用组蛋白的碱性性质。例如可通过针对游离组

蛋白部分的免疫测定法来进行游离组蛋白变体的检测。因此在本发明的一个实施方案中,从包括血液、血浆、血清和尿在内的生物流体中提取组蛋白变体并对所述提取物测试组蛋白变体的存在。

[0111] 本领域已知的是,可通过免疫测定法检测作为部分包含在含其它部分的复合物之内的蛋白质的存在。本领域技术人员应清楚的是,可通过涉及在流体中直接免疫测定组蛋白变体本身的程序,在包括血液、血浆、血清和尿在内的生物流体中检测含组蛋白变体的无细胞核小体。在此程序中,利用指向存在于组蛋白变体上的表位的抗体的单抗体免疫测定法,或者利用指向存在于组蛋白变体上的两个表位的两个抗体的2-位点免疫测定法,用以检测核小体内组蛋白变体的存在。因此在本发明的另一个实施方案中,通过使用针对组蛋白变体的免疫测定法,在包括血液、血浆、血清和尿在内的生物流体中直接检测包含在核小体内的组蛋白变体。

[0112] 因此在本发明的一个实施方案中,从包括血液、血浆、血清和尿在内的生物流体中提取组蛋白变体并对所述提取物测试组蛋白变体的存在。

[0113] 本发明的又一方面提供能够与所述生物标志物特异性结合的配体或结合物,例如天然存在或化学合成的化合物。依照本发明的配体或结合物可包括能够与生物标志物特异性结合的肽、抗体或其片段、或诸如人工抗体(plastic antibody)等合成配体、或者适体或寡核苷酸。所述抗体可以是能够与生物标志物特异性结合的单克隆抗体或其片段。依照本发明的配体可使用诸如发光标志物、荧光标志物、酶标志物或放射性标志物等可检测标志物标记;备选地或另外地,依照本发明的配体可使用例如生物素、抗生物素蛋白、链霉抗生物素等亲和标签或His (例如六-His) 标签标记。或者可使用例如ForteBio Inc的无标记技术来确定配体结合。

[0114] 依照本发明的生物传感器可包含所述生物标志物或者能够与针对所述生物标志物的抗体特异性结合的其结构/形状模拟物。亦提供包含如本文所述的配体或模拟物的阵列。

[0115] 本发明亦提供如本文所述的一种或多种配体的用途,其可以是天然存在或化学合成的,并且适宜为肽、抗体或其片段、适体或寡核苷酸,或者提供本发明的生物传感器、或本发明的阵列或本发明的试剂盒在检测和/或定量所述生物标志物中的用途。在这些用途中,可对如本文所定义的生物样品进行检测和/或定量。

[0116] 提供诊断或监测试剂盒以进行本发明的方法。这类试剂盒应适当地包含用于检测和/或定量所述生物标志物的依照本发明的配体,和/或如本文所述的生物传感器和/或芯片,任选连同试剂盒的使用说明书。

[0117] 本发明的又一方面为用于检测疾病状态存在的试剂盒,所述试剂盒包含能够检测和/或定量一种或多种如本文所定义的生物标志物的生物传感器。

[0118] 用于检测疾病存在的生物标志物为用于发现延缓或停止所述病症进展的新靶标和药物分子的重要靶标。鉴于生物标志物的水平指示病症和药物反应,所述生物标志物对于在体外和/或体内测定中鉴定新治疗化合物而言为有用的。可在用于筛选调节生物标志物活性的化合物的方法中使用本发明的生物标志物。

[0119] 因此,在本发明的又一方面,提供所述结合物或配体(根据本发明其可以是肽、抗体或其片段或者适体或寡核苷酸);或者依照本发明的生物传感器;或依照本发明的阵列或

者依照本发明的试剂盒,在鉴定能够促进和/或抑制所述生物标志物生成的物质中的用途。

[0120] 亦提供在受试者中鉴定能够促进或抑制所述生物标志物生成的物质的方法,所述方法包括向受试动物给予测试物质并检测和/或定量存在于来自所述受试者的试样中的生物标志物水平。

[0121] 术语“生物标志物”意指过程、事件或病况的特征性生物指示物或生物来源的指示物。生物标志物可用于例如临床筛查和预后评价等诊断方法以及用于监测治疗的结果,鉴定最可能响应特定的治疗性治疗的患者,用于药物筛选和开发。生物标志物及其用途对鉴定新的药物治疗和发现药物治疗的新靶标而言为有价值的。

[0122] 本文使用的术语“检测”和“诊断”包括疾病状态的鉴定、确认和/或表征。依照本发明的检测、监测和诊断的方法对确认疾病的存在、通过评价发作和进展来监测疾病的发展或者评价疾病的改善或消退而言为有用的。检测、监测和诊断的方法在用于评价临床筛查、预后、疗法选择、治疗益处评价(即用于药物筛选和药物开发)的方法中亦为有用的。

[0123] 通过建立正确的诊断、允许快速鉴定最适当的治疗(因而减少对有害药物副作用的不必要暴露)并降低复发率,有效的诊断和监测方法提供非常有力的“患者解决方案”,其具有改善预后的潜能。

[0124] 在一个实施方案中,所述生物标志物自肿瘤的细胞中释放。因此,根据本发明的又一方面,提供用于检测肿瘤生长的方法,所述方法包括步骤(i)在生物样品中测定与肿瘤的细胞相关或自其释放的生物标志物和(ii)证实所述标志物的水平与所述肿瘤的大小、阶段、侵占性或扩散相关。

[0125] 已知的是,增加的细胞更新、细胞死亡和凋亡导致增加的无细胞核小体循环水平(Holdenrieder等,2001)。循环无细胞核小体水平为非特异性指示物并且存在于各种病况中,包括炎性疾病、大量的良性和恶性病况、自身免疫性疾病以及随后的创伤或局部缺血(Holdenrieder等2001)。本领域技术人员应清楚的是,本发明应具有在各种疾病领域中的应用,其中在受试者中发现循环核小体。这些包括但不限于创伤(例如重度伤或手术)、极限运动(例如跑马拉松)、中风和心脏病发作以及脓毒症或其它严重感染。我们已使用本发明的免疫测定法在各种这样的疾病(包括心肌病、系统性红斑狼疮、溃疡性结肠炎、慢性阻塞性肺病、克罗恩病和类风湿性关节炎)中测定核小体水平并研究其组蛋白和核苷酸结构可变性,并将其与健康受试者的结果进行比较。我们可在所有这些疾病中检测核小体并确定其相对结构(以组蛋白和核苷酸组成的方式)。鉴于与现行核小体ELISA法相比,本发明的方法能够检测更大范围的核小体,本发明的方法具有在大范围的癌症和非癌疾病领域中的应用。

[0126] 本发明的免疫测定法包括使用酶检测法的免疫计量测定法(例如ELISA)、荧光标记的免疫计量测定法、时间分辨荧光标记的免疫计量测定法、化学发光免疫计量测定法、免疫比浊测定法、颗粒标记的免疫计量测定法和免疫放射测定法及竞争性免疫测定法,所述竞争性免疫测定法包括使用各种标记类型的标记抗原和标记抗体竞争性免疫测定法,所述标记类型包括放射性标记、酶标记、荧光标记、时间分辨荧光标记和颗粒标记。所有的所述免疫测定法均为本领域所熟知,参见例如Salgame等,1997和van Nieuwenhuijze等,2003。

[0127] 在一个实施方案中,所述生物样品包括体液。例如,可用本发明的方法测试的生物样品包括脑脊液(CSF)、全血、血清、血浆、月经血、子宫内膜液、尿、唾液或其它体液(粪便、

泪液、滑液、痰)、呼吸气体,例如作为冷凝的呼吸气体或自其的提取物或纯化物、或其稀释物。生物样品亦包括来自活受试者或死后取得的样品。可以例如适当稀释或浓缩来制备样品并以常规方式储存。

[0128] 在一个实施方案中,在多个时机重复本发明的方法。此实施方案提供这样的优点,其允许在一段时间内监测检测结果。这样的安排提供监测或评价疾病状态的治疗功效的益处。本发明的这类监测方法可用于监测发作、进展、稳定、改善、复发和/或缓解。

[0129] 因此,本发明亦提供在疑似患有疾病的受试者中监测对疾病状态的治疗功效的方法,所述方法包括检测和/或定量存在于来自所述受试者的生物样品中的生物标志物。在监测方法中,可在两个或更多个时机下取得试样。所述方法可进一步包括将存在于所述试样中的一种或多种生物标志物水平与一个或多个对照和/或与在更早(例如在治疗开始之前)取自同一测试受试者和/或在治疗的更早阶段取自同一测试受试者的一个或多个先前试样进行比较。所述方法可包括在不同时机获得的试样中检测在所述一种或多种生物标志物的性质或量上的变化。

[0130] 因此,根据本发明的又一方面,提供用于监测对人或动物受试者中的疾病状态的治疗功效的方法,所述方法包括

(i) 定量如本文所定义的生物标志物的量;和

(ii) 将试样中所述生物标志物的量与存在于一个或多个对照和/或在更早时间取自同一测试受试者的一个或多个先前试样中的量进行比较。

[0131] 试样中所述生物标志物的水平相对于在更早取自同一测试受试者的先前试样中的水平的变化,可指示所述疗法对所述病症或疑似病症的有益效果,例如稳定或改善。此外,一旦完成治疗,便可定期重复本发明的方法以监测疾病的复发。

[0132] 用于监测治疗功效的方法可用于监测现有疗法和新疗法在人受试者和在非人动物(例如动物模型)中的治疗效果。这些监测方法可并入用于新药物和药物组合的筛选中。

[0133] 在又一个实施方案中,对于因快速起效疗法所致的更快速变化的监测,可以数小时或数天的更短间隔进行。

[0134] 根据本发明的又一方面,提供鉴定用于检测疾病状态存在的生物标志物的方法。本文所用的术语“鉴定”意指确认存在于生物样品中的生物标志物的存在。对存在于样品中的生物标志物的量的定量,可包括确定存在于所述样品中的生物标志物的浓度。鉴定和/或定量可在样品上直接进行,或者在自其的提取物或其稀释物上间接进行。

[0135] 在本发明的备选方面,所述生物标志物的存在通过检测和/或定量能够与所述生物标志物特异性结合的抗体或其片段来评价,所述抗体或其片段通过受试者身体对所述生物标志物的反应生成并因此存在于来自具有疾病状态的受试者的生物样品中。

[0136] 可通过适于在来自患者的生物样品或者生物样品的纯化物或提取物或其稀释物中鉴定特定蛋白的存在和/或量的任何方法来进行鉴定和/或定量。在本发明的方法中,可通过测定一个或多个样品中所述生物标志物的浓度来进行定量。可用本发明的方法测试的生物样品包括如上文所定义的生物样品。可以例如适当稀释或浓缩来制备样品并以常规方式储存。

[0137] 生物标志物的鉴定和/或定量可通过检测所述生物标志物或其片段,例如C端截短的片段或N端截短的片段来进行。片段在长度上适宜为大于4个氨基酸,例如长度为5、6、7、

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸。特别注意的是，与组蛋白尾部相同序列或相关序列的肽为组蛋白的特别有用的片段。

[0138] 生物标志物可例如通过SELDI或MALDI-TOF直接检测。或者，可经由与能够特异性结合生物标志物的一种或多种配体，例如抗体或其生物标志物结合片段、或其它肽、或例如适体或寡核苷酸等配体的相互作用来直接或间接检测所述生物标志物。所述配体或结合物可具有可检测标记，例如发光、荧光或放射性标记和/或亲和标签。

[0139] 例如，检测和/或定量可通过选自以下的一种或多种方法进行：SELDI (-TOF)、MALDI (-TOF)、基于1-D凝胶的分析、基于2-D凝胶的分析、基于质谱(MS)、反相(RP) LC、大小渗透(凝胶过滤)、离子交换、亲和、HPLC、UPLC和其它LC或LC MS的技术。适当的LC MS技术包括ICAT® (Applied Biosystems, CA, USA)或iTRAQ® (Applied Biosystems, CA, USA)。亦可使用液相色谱法(例如高压液相色谱法(HPLC)或低压液相色谱法(LPLC))、薄层色谱法、NMR(核磁共振)光谱法。

[0140] 依照本发明的诊断或监测的方法可包括通过SELDI TOF或MALDI TOF分析样品以检测所述生物标志物的存在或水平。这些方法亦适于临床筛查、预后、监测治疗结果、鉴定最可能响应特定的治疗性治疗的患者，用于药物筛选和开发，以及鉴定药物治疗的新靶标。

[0141] 鉴定和/或定量分析物生物标志物可使用免疫学方法进行，其涉及能够与所述生物标志物特异性结合的抗体或其片段。合适的免疫学方法包括夹心免疫测定法，例如夹心ELISA，其中使用识别分析物生物标志物上的不同表位的两个抗体进行所述分析物生物标志物的检测；放射免疫测定法(RIA)；直接、间接或竞争性酶联免疫吸附测定法(ELISA)；酶免疫测定法(EIA)；荧光免疫测定法(FIA)；蛋白质印迹；免疫沉淀；和任何基于颗粒的免疫测定法(例如使用金、银或乳胶颗粒、磁性颗粒或Q-点)。免疫学方法可以例如微量滴定板或试纸条形式进行。

[0142] 在一个实施方案中，可将一种或多种生物标志物替换成生物途径中在所述生物标志物的上游或下游发现的分子或所述分子的可测定片段。

[0143] 鉴定对疾病特异的关键生物标志物对诊断程序和治疗方案的整合而言极为重要。使用预测性生物标志物，可开发适当的诊断工具，例如生物传感器；因此，在本发明的方法和用途中，可使用生物传感器、微量分析系统、微量工程化系统、微量分离系统、免疫层析系统或其它合适的分析装置进行鉴定和定量。所述生物传感器可并入用于检测一种或多种生物标志物的免疫学方法、电、热、磁、光(例如全息图)或声学技术。使用所述生物传感器，有可能检出以预期的浓度存在于生物样品中的一种或多种靶生物标志物。

[0144] 本文所用的术语“生物传感器”意指能够检测所述生物标志物存在的任何事物。生物传感器的实例在本文中描述。

[0145] 依照本发明的生物传感器可包含配体结合物或配体，如本文所述，其能够与所述生物标志物特异性结合。这类生物传感器在检测和/或定量本发明的生物标志物中为有用的。

[0146] 本发明的一种或多种生物标志物可使用生物传感器检测，所述生物传感器结合有基于“智能(smart)”全息图或高频声学系统的技术，所述系统特别易于进行“条形码”或阵列配置。

[0147] 在智能全息图传感器(Smart Holograms Ltd, Cambridge, UK)中，全息图像储存

在经敏化处理以与生物标志物特异性反应的薄聚合物膜中。暴露之后,生物标志物与聚合物反应,导致经全息图显示的图像上的变化。读出的测试结果可以是在光学亮度、图像、颜色和/或图像位置上的变化。对于定性和半定量应用,传感器全息图可通过肉眼读取,从而去除对于检测设备的需要。在需要定量测定时,可使用简单的颜色传感器读取信号。样品的混浊度或颜色不会干扰传感器的运作。传感器的形式允许用于同时检测数种物质的多路传输。可设计可逆和不可逆的传感器以满足不同的需求,并且特定的目标生物标志物的连续监测是可行的。

[0148] 适当地,用于检测本发明的一种或多种生物标志物的生物传感器将生物分子识别与适当的工具组合,以将样品中生物标志物的存在的检测或定量转换成信号。生物传感器可适于“可变位点”诊断测试,例如在病房、门诊部、手术室、家中、野外和工作场所。

[0149] 检测本发明的一种或多种生物标志物的生物传感器包括声学、等离子体共振、全息、Bio-Layer干涉测定法(BLI)和微量工程化的传感器。可在用于检测本发明的一种或多种生物标志物的生物传感器中使用印记的识别元件、薄膜晶体管技术、磁声谐振器装置和其它新型声-电系统。

[0150] 涉及鉴定和/或定量本发明的一种或多种生物标志物的方法可在台式仪器上进行,或者可并入一次性诊断或监测平台,其可用于非实验室环境,例如用于医师办公室或患者病床边。用于进行本发明的方法的合适生物传感器包括具有光学或声学读数器的“信用”卡。可将生物传感器配置成允许将收集的数据电子传输给医师以进行解读并因此可形成电子医疗的基础。

[0151] 本文描述了用于诊断和监测疾病状态的存在的诊断试剂盒。在一个实施方案中,所述试剂盒另外包含能够鉴定和/或定量生物标志物的生物传感器。依照本发明的试剂盒可适当地包含选自以下的一个或多个组分:配体结合物、或者对生物标志物或所述生物标志物的结构/形状模拟物特异的配体、一种或多种对照、一种或多种试剂和一种或多种耗材;任选连同依照本文所定义的任何方法的试剂盒使用说明书。

[0152] 鉴定疾病状态的生物标志物允许将诊断程序和治疗方案整合。本发明的生物标志物的检测可用于在其参与临床试验之前筛选受试者。生物标志物提供指示治疗反应、不能反应、不利副作用特征、药物依从性的程度和到达足够血清药物水平的工具。生物标志物可用于提供不良药物反应的警告。生物标志物在开发个性化疗法中 useful,因为反应的评价可用于微调剂量,使处方药的数量降至最低,减少在获得有效治疗上的延迟并避免不良药物反应。因此通过监测本发明的生物标志物,可将患者护理定制为恰好满足通过患者的病症和药物基因组学特征而定的需要,从而可将所述生物标志物用于滴定最佳剂量、预测阳性治疗反应和鉴定处于严重副作用的高风险下的患者。

[0153] 基于生物标志物的测试提供“新”患者的一线判定,并向精确而快速的诊断提供客观测定,这是使用现有测定不能实现的。

[0154] 此外,诊断性生物标志物测试对于鉴定患有轻度或无症状疾病或者可能处于形成有症状疾病的高风险下的家庭成员或患者而言为有用的。这允许开始适当治疗或预防性措施,例如管理风险因素。认为这些方法改善结果并可预防病症的明显发作。

[0155] 生物标志物监测法、生物传感器和试剂盒作为患者监测工具亦为至关重要的,其使医师能够确定复发是否因病症的恶化所致。如果药物治疗经评价为不足的,则随后可恢

复或增加治疗;适当时可给予疗法上的改变。鉴于所述生物标志物对病症状态为敏感的,其提供对药物治疗的影响的指示。

[0156] 现在将参考以下非限制性实施例来阐述本发明。

[0157] 实施例1

使用针对核小体相关组蛋白变体巨H2A1.1的ELISA,用结合完整核小体的固相抗-组蛋白捕获抗体和生物素化亲和纯化的多克隆抗-组蛋白变体巨H2A1.1检测抗体,测试依照Holdenrieder所述方法(*Holdenrieder等, 2001)从健康受试者制备的含无细胞核小体的人全血样品。用胎牛血清将所述人样品连续稀释并在未稀释以及1:2、1:4和1:8稀释的ELISA中一式两份测试。亦在ELISA中测定纯胎牛血清作为不含无细胞核小体的对照样品。测定方法如下:向微量滴定孔中加入含抗-组蛋白抗体的0.1M磷酸盐缓冲液pH 7.4的溶液(100 μ L/孔)并在4℃孵育过夜以用捕获抗体包被所述孔。倾去过量的抗-组蛋白抗体。向孔中加入牛血清白蛋白的溶液(20g/L) (150 μ L/孔)并于室温孵育60分钟以封闭孔上过量的蛋白质结合位点。倾去过量的牛血清白蛋白溶液并用洗涤缓冲液(200 μ L/孔,含1% Tween 20的0.05M TRIS/HCl缓冲液pH 7.5)将孔洗涤2次。向孔中加入样品(10 μ L/孔)和测定缓冲液(50 μ L/孔,含0.9% NaCl、0.05%去氧胆酸钠和1% Nonidet P40取代物的0.05M TRIS/HCl pH 7.5)并于室温下以温和摇动孵育90分钟。倾去所述样品和测定缓冲液混合物并用洗涤缓冲液(200 μ L/孔)将孔洗涤3次。加入生物素化亲和纯化的多克隆抗-组蛋白变体巨H2A1.1检测抗体的溶液(50 μ L/孔)并于室温下以温和摇动孵育90分钟。倾去过量的检测抗体并再次用洗涤缓冲液(200 μ L/孔)将孔洗涤3次。加入含有链霉抗生物素-辣根过氧化物酶缀合物的溶液(50 μ L/孔)并于室温下以温和摇动孵育30分钟。倾去过量的缀合物并再次用洗涤缓冲液(200 μ L/孔)将孔洗涤3次。加入有色底物溶液(100 μ L/孔,2,2'-Azinobis[3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]-二铵盐)并于室温下以温和摇动孵育30分钟。加入含1%十二烷基硫酸钠的终止液(100 μ L/孔)并使用标准微量滴定板读数器在405nm波长处测定孔的光密度(OD)。观察到颜色随核小体相关的组蛋白变体巨H2A1.1浓度增加而增加的可重现剂量反应曲线,在不含核小体相关组蛋白变体巨H2A1.1(胎牛血清)的情况下观察到低的背景信号。阳性ELISA信号表明,经ELISA检出的组蛋白变体巨H2A1.1掺入核小体内,因为所用捕获抗体与完整核小体内的组蛋白结合并且未与组蛋白H2结合。所述结果在图1中显示。

[0158] 实施例2

使用针对核小体相关的组蛋白变体巨H2A2的ELISA法,用结合完整核小体的固相抗-组蛋白捕获抗体和生物素化亲和纯化的多克隆抗-组蛋白变体巨H2A2检测抗体,测定通过消化提取自MCF7细胞的染色质产生的市购可得的核小体制品,其中核小体中的DNA和蛋白质经交联以稳定(确保存在于所述制品中的所有组蛋白均掺入完整核小体中)。用胎牛血清将所述核小体样品连续稀释并用ELISA一式两份测试。亦在ELISA中测定纯胎牛血清作为不含无细胞核小体的对照样品。测定方法如下:向微量滴定孔中加入含抗-组蛋白抗体的0.1M磷酸盐缓冲液pH 7.4的溶液(100 μ L/孔)并在4℃孵育过夜以用捕获抗体包被所述孔。倾去过量的抗-组蛋白抗体。向孔中加入牛血清白蛋白的溶液(20g/L) (200 μ L/孔)并于室温孵育30分钟以封闭孔上过量的蛋白质结合位点。倾去过量的牛血清白蛋白溶液并用洗涤缓冲液(200 μ L/孔,含1% Tween 20的0.05M TRIS/HCl缓冲液pH 7.5)将孔洗涤3次。向孔中加入样品(10 μ L/孔)和测定缓冲液(50 μ L/孔,含0.9% NaCl、0.05%去氧胆酸钠和1% Nonidet P40

取代物的0.05M TRIS/HCl pH 7.5)并于4℃孵育过夜。倾去所述样品和测定缓冲液混合物并用洗涤缓冲液(200 μL/孔)将孔洗涤3次。加入生物素化亲和纯化的多克隆抗-组蛋白变体巨H2A1.1检测抗体的溶液(50 μL/孔)并于室温下以温和摇动孵育90分钟。倾去过量的检测抗体并再次用洗涤缓冲液(200 μL/孔)将孔洗涤3次。加入含有链霉抗生物素-辣根过氧化物酶缀合物的溶液(50 μL/孔)并于室温下以温和摇动孵育30分钟。倾去过量的缀合物并再次用洗涤缓冲液(200 μL/孔)将孔洗涤3次。加入有色底物溶液(100 μL/孔,2,2'-Azinobis [3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸]-二铵盐)并于室温下以温和摇动孵育20分钟。使用标准微量滴定板读数器在405nm波长处测定孔的光密度(OD)。观察到颜色随核小体相关的组蛋白变体巨H2A2浓度增加而增加的剂量反应曲线,在不含组蛋白变体巨H2A2(胎牛血清)的情况下观察到低的背景信号。阳性ELISA信号表明,经ELISA检出的组蛋白变体巨H2A2掺入核小体内,因为(i)样品中不存在游离组蛋白和(ii)所用捕获抗体与完整核小体内的组蛋白结合并且未与组蛋白H2结合。所述结果在图2中显示。

[0159] 实施例3

使用针对核小体相关的组蛋白变体H2AZ的ELISA法,用结合完整核小体但不结合组蛋白H2的固相抗-组蛋白捕获抗体和生物素化亲和纯化的多克隆抗-组蛋白变体H2AZ检测抗体,测试通过消化提取自MCF7细胞的染色质产生的市购可得的核小体制品,其中DNA和蛋白质经交联以稳定(确保存在的所有组蛋白均掺入完整核小体中)。所述测定程序的详情类似于在上述实施例2中所述的详情。观察到颜色随核小体相关的组蛋白变体H2AZ浓度增加而增加的可重现剂量反应曲线,在不含核小体相关的组蛋白变体H2AZ(胎牛血清)的情况下观察到低的背景信号。阳性ELISA信号表明,检出的组蛋白变体巨H2A2掺入核小体内,因为(i)样品中不存在游离组蛋白和(ii)所用捕获抗体与完整核小体内的组蛋白结合并且未与组蛋白H2结合。所述结果在图3中显示。

[0160] 实施例4

我们使用现有技术的两种核小体ELISA法测定取自20个健康受试者的血清和血浆血样的循环无细胞核小体含量。第一种现行ELISA法(ELISA 1)为Roche Cell Death ELISA而另一种(ELISA 2)为使用抗-组蛋白捕获抗体和抗-组蛋白-DNA复合物检测抗体的ELISA。经两种现行核小体ELISA法在正常血浆中检出的核小体水平平均低于正常血清中的水平。核小体的血清水平的正常范围(以光密度单位表示)(20个健康受试者血清结果的平均值±平均值的2倍标准差),对于ELISA 1计算为0-4.3个OD单位,而对于ELISA 2计算为0-1.4个OD单位。对于血浆的各范围为0-0.95和0-0.96。所述结果在图4中显示。

[0161] 我们亦在相同的样品中测定了含组蛋白PTM和2种核苷酸以及3种核小体相关的组蛋白变体mH2A1.1、mH2A2和H2AZ的核小体的水平。结果显示,取自健康受试者的血清样品具有一致低水平的含组蛋白变体或PTM或核苷酸的核小体。含组蛋白变体、PTM或核苷酸的核小体的血清水平的正常范围(表示为光密度), (a) 对于mH2A1.1为0-0.36, (b) 对于mH2A2为0.05-0.78, (c) 对于H2AZ为0.11-0.58, (d) 对于P-H2AX (Ser139)为0.06-0.61, (e) 对于5-甲基胞嘧啶为0.06-0.36和(f) 对于5-羟甲基胞嘧啶为0.03-0.36。对于全部20个健康受试者,测得的EDTA血浆结果均较高。所述结果在图5、6、7、8、9和10中显示。

[0162] 实施例5

我们在取自13个健康受试者和患有胃癌、大肠癌、直肠癌、肺癌(小细胞肺癌和各种非

小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肾癌和各种口腔癌(口腔、腭、咽和喉)的55个受试者的EDTA血浆中测定了无细胞核小体。来自健康受试者和癌症患者的全部样品均为无细胞核小体阳性的。然而,在取自癌症受试者的样品中测得的水平高于在来自健康受试者的样品中发现的水平以及结果显示健康受试者和癌症受试者为可辨别的。例如对于H2AZ核小体测定,以OD方式计算为平均值±平均值的2倍标准差的正常范围为0-0.95。使用此0.95的截止值,所有13个健康受试者对于升高的核小体H2AZ水平均为阴性的。相比之下,对55个癌症样品中的46个发现对于升高的核小体H2AZ水平的阳性结果(84%的总体临床灵敏性),包括100% (8/8)的胃癌样品、100% (5/5)的大肠癌样品、67% (2/3)的直肠癌样品、83% (5/6)的小细胞肺癌样品、79%的非小细胞肺癌样品、50% (3/6)的乳腺癌样品、100% (1/1)的卵巢癌样品、100% (1/1)的胰腺癌样品、80% (4/5)的前列腺癌样品、100% (1/1)的肾癌样品和100% (5/5)的口腔癌样品。所述结果在图19中显示。

[0163] 类似地,对于核小体相关的mH2A1.1测定,所述正常范围为0-0.91。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而64% (35/55)的癌症样品为阳性的。对于核小体相关的P-H2AX (Ser139) 测定,所述正常范围为0-1.08。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而60% (33/55)的癌症样品为阳性的。亦测定了核小体相关的5-甲基胞嘧啶以及测定的正常范围为0-1.41。使用此截止值,所有13个健康样品均为阴性的而55% (30/55)的癌症样品为阳性的。

[0164] 我们亦使用本发明的方法在相同的样品中测定多种其它的核小体相关的结构。汇集这些免疫测定的结果以得到取自癌症患者的样品中核小体结构的特征,将所述特征相对于含5-甲基胞嘧啶核小体的检出水平进行标准化。我们将所得特征与取自健康受试者的样品的核小体结构进行比较。发现无细胞核小体的核小体结构特征不同于健康受试者的核小体结构特征。所述结果在图23中显示。我们类似地汇集了取自各种非癌疾病的样品的核小体结构特征,并将其与取自癌症患者和取自健康受试者的样品中的核小体特征进行比较。所述结果在图24中显示。

[0165] 我们随后进行了另一个类似的实验,其包含来自10个健康受试者和患有各种类型癌症的另外62个患者的样品。所述结果类似于第一个实验。例如使用核小体相关的组蛋白变体H2AZ的结果以及健康受试者结果的平均值±平均值的2倍标准差的截止值,对于全部10个健康受试者均获得阴性结果而对于95% (59/62)的癌症患者获得阳性结果,其包括9/9前列腺癌患者、5/5皮肤癌患者、6/8食道癌患者、12/13膀胱癌患者、2/2宫颈癌患者和1/1结肠癌患者、4/4乳腺癌患者、7/7卵巢癌患者、7/7喉癌患者、3/3肺癌患者和3/3肾癌患者。此结果表明,核小体相关的组蛋白变体为用于癌症的临床上灵敏的生物标志物。所述结果在图20中显示。

[0166] 实施例6

我们使用现有技术的两种核小体ELISA法测定取自患有结肠癌的3个受试者、患有肺癌的13个受试者、患有胰腺癌的2个受试者、患有口腔癌的1个受试者的EDTA血浆样品以及依照Holdenrieder (*Holdenrieder等,2001)的方法自健康受试者产生的核小体样品的循环无细胞核小体含量。第一种现行ELISA法(ELISA 1)为Roche Cell Death ELISA而另一种(ELISA 2)为使用抗-组蛋白捕获抗体和抗-组蛋白-DNA复合物检测抗体的ELISA。

[0167] 我们亦测定了含3种变体组蛋白、组蛋白PTM和2种核苷酸的核小体的水平。结果显

示,尽管对于大多数受试者,特别是胰腺癌和口腔癌患者,以现有技术的ELISA法检出较低的核小体结果,但是这些样品的大多数具有较高可检测水平的含一种或多种核小体相关的变体组蛋白的核小体。取自患有结肠癌的3个受试者、患有肺癌的13个受试者、患有胰腺癌的2个受试者和患有口腔癌的1个受试者的样品的结果分别在图11、12、13和14中显示。在19个癌症样品的16个(除3个肺癌样品之外)中检出显著的核小体相关的组蛋白变体水平。此外,在19个癌症样品的12个中检出核小体相关的5-羟甲基胞嘧啶以及在全部19个癌症样品中检出核小体相关的5-甲基胞嘧啶。

[0168] 此外,对于所有受试者而言,含不同的组蛋白变体水平的核小体水平的模式并非一致,而对测试的不同癌症显示不同的模式。为了利于在患有相同或不同癌症的受试者的结果之间进行比较,将核小体测试(对于含巨H2A1.1、巨H2A2、H2AZ、P-H2AX (Ser139)、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶的核小体)的结果标准化为对含5-甲基胞嘧啶的核小体观察到的OD信号的比例。对于各癌症的标准化的结果(误差线显示其中测试了来自多于一个受试者的样品的结果中的标准差)以及对于自健康受试者产生的核小体样品的相同结果(对此样品未测定mH2A2和5-羟甲基胞嘧啶)在图15中显示。图15显示,含不同标准化组蛋白变体、核苷酸或PTM的核小体在研究的全部四种癌症中的分布模式相当显著地不同于来自健康受试者的样品中的核小体分布。因此,本发明可用作以简单的基于血液的筛查测试检测癌症的方法。本领域技术人员应清楚的是,本发明包括测试含有其它另外的组蛋白变体、核苷酸和/或组蛋白修饰的核小体,以进一步或更好地区分肿瘤或其它疾病来源的循环无细胞核小体。

[0169] 此外,对不同的癌症类型观察到的核小体类型的模式不同。例如,与任何其它三种癌症类型相比,取自患有口腔癌的受试者的样品具有更低标准化水平的含mH2A2或P-H2AX (Ser139)的核小体二者。类似地,基于含变体巨H2A1.1的核小体的不同标准化水平,来自患有胰腺癌的受试者的样品可区别于来自患有结肠癌的受试者的样品。因此,本发明可用作普遍诊断癌症以及区分具体癌症类型的方法。本领域技术人员应清楚的是,本发明包括测试含其它另外的组蛋白变体和/或组蛋白修饰和/或核苷酸的核小体,以进一步或更好地区分不同具体肿瘤来源或其它疾病来源的循环无细胞核小体。

[0170] 实施例7

我们使用如上所述的本发明的方法,测定了取自4个健康受试者的血清样品和取自患有胰腺癌的受试者的20个血清样品中核小体相关的组蛋白变体水平。使用0.27的截止水平(在健康患者中发现的水平的平均值+ 2倍标准差),所述核小体相关的H2AZ水平在取自胰腺癌患者的80% (16/20)的样品中为升高的,而在健康受试者中未升高。所述结果在图21中显示。

[0171] 实施例8

如在实施例3中所述,我们使用生物素化的抗-H2AZ检测抗体测定了取自癌症患者的某些人样品的核小体相关的组蛋白H2AZ水平。使用两种不同的单克隆纯系抗-组蛋白捕获抗体将所述方法进行两次,以确定对于不同的捕获抗体所述H2AZ结果是否可重现。图16中的结果显示,两种测定的核小体相关的组蛋白H2AZ水平与截距近似为0的最佳拟合线线性相关。单位为单纯的光密度读数。

[0172] 实施例9

如在实施例3中所述,我们测定了取自肺癌患者的人EDTA血浆样品的核小体相关的组蛋白H2AZ水平。将检出水平与所述患者的疾病进展相关联。在图22中显示的结果表明,核小体相关的组蛋白H2AZ水平随疾病的严重性(就大小、阶段、结节扩散和远端转移扩散而言)而增加,以及核小体相关的组蛋白H2AZ水平可单独或作为诊断组的部分用作疾病结节、大小、阶段或转移进展的指示物。

[0173] 参考文献

Allen等, A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements (用于使用重复DNA元件的亚硫酸氢盐PCR估计总体DNA甲基化的简便方法). *Nucleic Acids Research*: 32 (3) e38DOI: 10.1093/nar/gnh032

Bawden等, Detection of histone modification in cell-free nucleosomes (无细胞核小体中组蛋白修饰的检测). WO 2005/019826, 2005

Boulard等, Histone variant macroH2A1 deletion in mice causes female-specific steatosis (小鼠中的组蛋白变体巨H2A1缺失导致雌性-特异性皮脂腺病). *Epigenetics & Chromatin*: 3 (8), 1-13, 2010 Cell Biolabs, Inc. Product Manual for "Global DNA Methylation ELISA Kit (5'-methyl-2'-deoxycytidine Quantitation)" ("总体DNA甲基化ELISA试剂盒5'-甲基-2'-脱氧胞苷定量"的产品手册), 2011

Dai等, Detection of Post-translational Modifications on Native Intact Nucleosomes by ELISA (通过ELISA检测对天然的完整核小体的翻译后修饰). <http://www.jove.com/details.phpid=2593> doi: 10.3791/2593. *J Vis Exp*. 50 (2011).

Deligezer等, Sequence-Specific Histone Methylation Is Detectable on Circulating Nucleosomes in Plasma (对血浆中的循环核小体可检测序列特异性组蛋白甲基化). *Clinical Chemistry* 54 (7), 1125-1131, 2008

Epigentek Group Inc, Methylamp™ Global DNA Methylation Quantification Kit (Methylamp™ 总体DNA甲基化定量试剂盒), User Guide (用户指南), 第2版.0802, 2009

Esteller, Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps (癌症表观基因组:DNA甲基化谱和组蛋白修饰图谱) *Nature Reviews Genetics*: 8, 286-298, 2007

Feinberg和Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts (低甲基化区分某些人类癌症的基因与其正常对应物). *Nature*: 301, 89-92, 1983

Grutzmann等, Sensitive Detection of Colorectal Cancer in Peripheral Blood by Septin 9 DNA Methylation Assay (通过Septin 9 DNA甲基化测定在外周血中灵敏检测结肠直肠癌). *PLoS ONE* 3 (11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008

Hervouet等, Disruption of Dnmt1/PCNA/UHRF1 Interactions Promotes Tumorigenesis from Human and Mice Glial Cells (Dnmt1/PCNA/UHRF1相互作用的破坏促进自人和小鼠胶质细胞中的肿瘤发生) *PLoS ONE* 5 (6): e11333. doi:10.1371/

journal.pone.0011333, 2010

Hua等, Genomic analysis of estrogen cascade reveals histone variant H2A.Z associated with breast cancer progression (雌激素串联的基因组分析显示组蛋白变体H2A.Z与乳腺癌进展相关). *Molecular Systems Biology* 4; Article number 188; doi:10.1038/msb.2008.25, 2008

Herranz和Esteller, DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets (癌症患者中的DNA甲基化和组蛋白修饰:潜在的预后和治疗靶标). *Methods Mol Biol*.361:25-62, 2007

Holdenrieder等, Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases (患有良性和恶性疾病的患者的血清中的核小体). *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)*: 95, 114-120, 2001

*Holdenrieder等, Nucleosomes in Serum as a Marker for Cell Death (血清中的核小体作为细胞死亡的标志物). *Clin Chem Lab Med*; 39 (7), 596-605, 2001

Holdenrieder等, Cell-Free DNA in Serum and Plasma: Comparison of ELISA and Quantitative PCR (血清和血浆中的无细胞DNA:ELISA和定量PCR的对比). *Clinical Chemistry*: 51 (8), 1544-1546, 2005

Holdenreider和Stieber, Clinical use of circulating nucleosomes (循环核小体的临床用途). *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*; 46 (1): 1-24, 2009

Kapoor等, The histone variant macroH2A suppresses melanoma progression through regulation of CDK8 (组蛋白变体巨H2A通过调节CDK8抑制黑素瘤进展). *Nature*: 468, 1105-1111, 2010

Mansour等, The Prognostic Significance of Whole Blood Global and Specific DNA Methylation Levels in Gastric Adenocarcinoma (全血总体和特定DNA甲基化水平在胃癌中的预后重要性). *PLoS ONE* 5 (12): e15585. doi:10.1371/journal.pone.0015585, 2010

Moore等, Genomic DNA hypomethylation as a biomarker for bladder cancer susceptibility in the Spanish Bladder Cancer Study: a case—control study (在西班牙膀胱癌研究中基因组DNA低甲基化作为膀胱癌易感性的生物标志物:病历-对照研究). *The Lancet Oncology*: 9 (4), 359 - 366, 2008

Ogoshi等, Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells (人癌细胞中DNA甲基化的全基因组特征). *Genomics*: In Press, 2011

Pennings等, DNA methylation, nucleosome formation and positioning (DNA甲基化、核小体形成和定位). *Briefings in functional genomics and proteomics*: 3 (4), 351-361, 2005

Rodriguez-Paredes和Esteller, Cancer epigenetics reaches mainstream oncology (癌症表观遗传学触及主流肿瘤学). *Nature Medicine*: 17 (3), 330-339, 2011

Salgame等, An ELISA for detection of apoptosis (用于检测凋亡的ELISA).

Nucleic Acids Research, 25 (3), 680-681, 1997

Sporn等, Histone macroH2A isoforms predict the risk of lung cancer recurrence (组蛋白巨H2A同种型预测肺癌复发的风险). Oncogene: 28 (38), 3423-8, 2009

Stroud等, 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells (5-羟甲基胞嘧啶与人胚胎干细胞中的增强子和基因主体相关). Genome Biology: 12:R54, 2011

Tachiwana等, Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants (包含较多组蛋白H3变体的人核小体的结构). Acta Cryst: D67, 578-583, 2011

Ting Hsiung等, Global DNA Methylation Level in Whole Blood as a Biomarker in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (全血中的总体DNA甲基化水平作为头颈鳞状细胞癌中的生物标志物). Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: 16 (1), 108-114, 2007

van Nieuwenhuijze等, Time between onset of apoptosis and release of nucleosomes from apoptotic cells: putative implications for systemic lupus erythematosus (凋亡发生和自凋亡细胞释放核小体之间的时间:对于系统性红斑狼疮的推测关联). Ann Rheum Dis; 62: 10-14, 2003

Vasser等, Measurement of Global DNA Methylation (总体DNA甲基化的测定). Genetic Engineering and Biotechnology News: 29 (7), 2009

Whittle等, The Genomic Distribution and Function of Histone Variant HTZ-1 during *C. elegans* Embryogenesis (在秀丽隐杆线虫 (*C. elegans*) 胚胎发生期间组蛋白变体HTZ-1的基因组分布和功能). PLoS Genet 4 (9): 1-17, 2008

Zee等, Global turnover of histone post-translational modifications and variants in human cells (人细胞中组蛋白翻译后修饰和变体的总体更新) Epigenetics & Chromatin. 3 (22): 1-11, 2010

Zhang等, Analysis of global DNA methylation by hydrophilic interaction ultra high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry (通过亲水相互作用超高压液相色谱串联质谱法分析总体DNA甲基化). Analytical Biochemistry: 413 (2), 164-170, 2011。

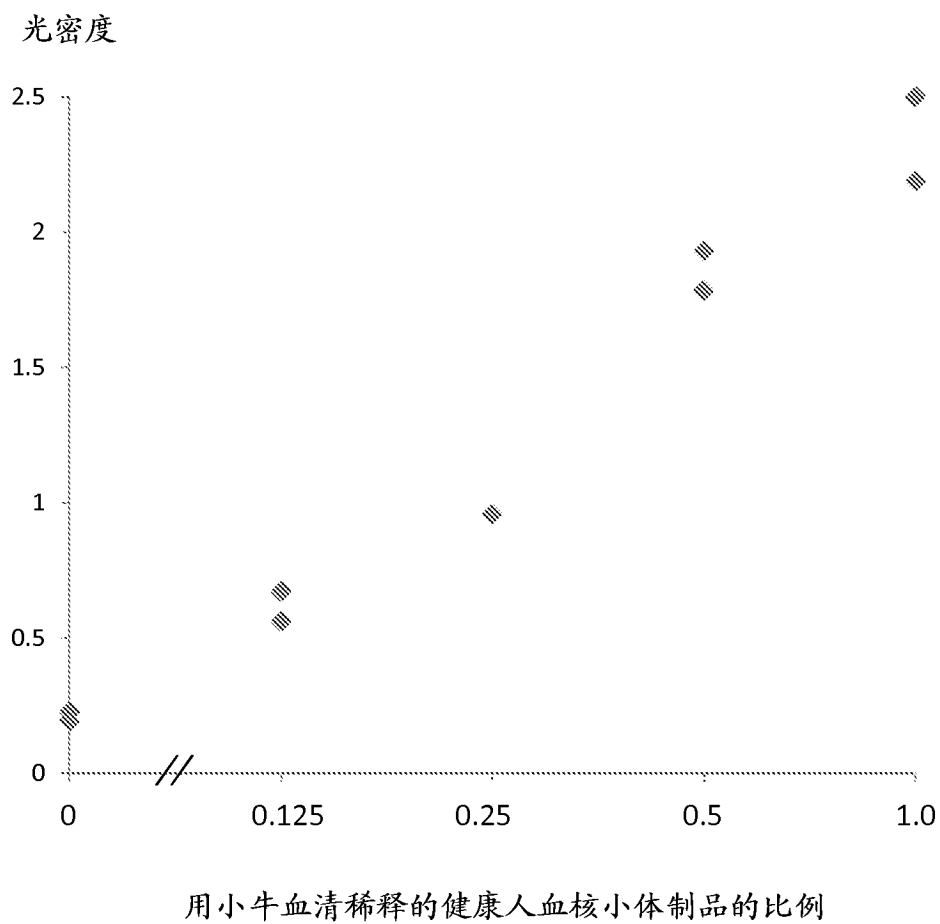


图 1

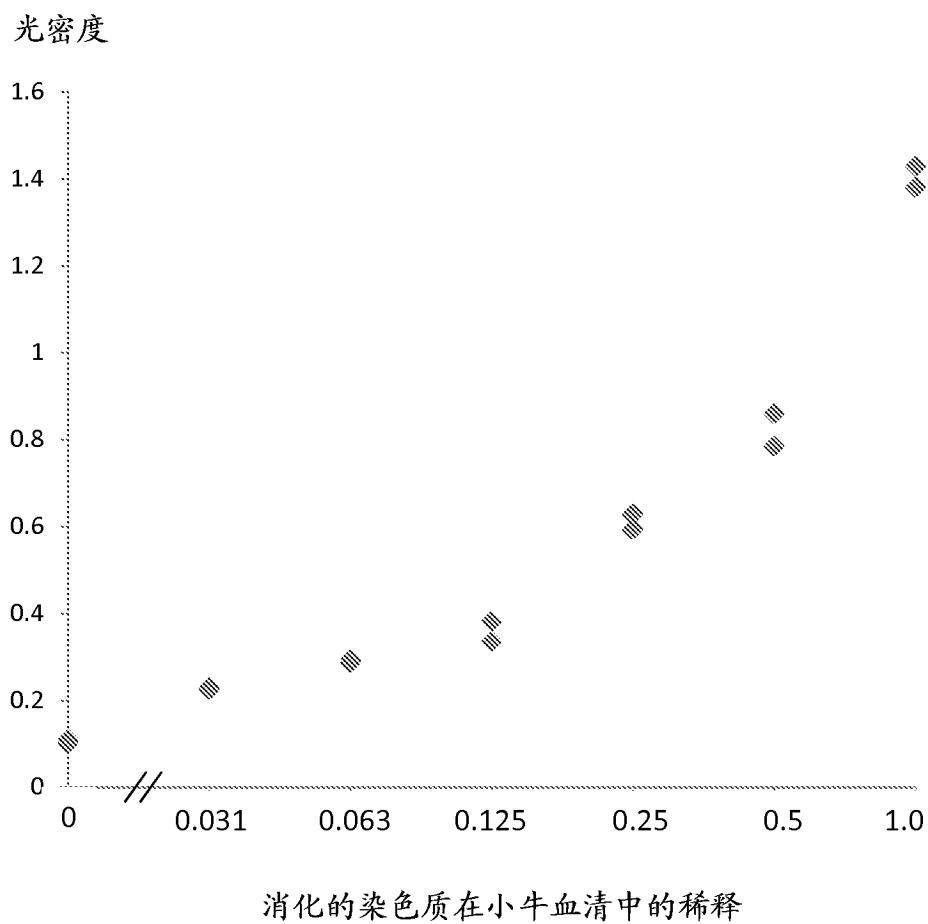


图 2

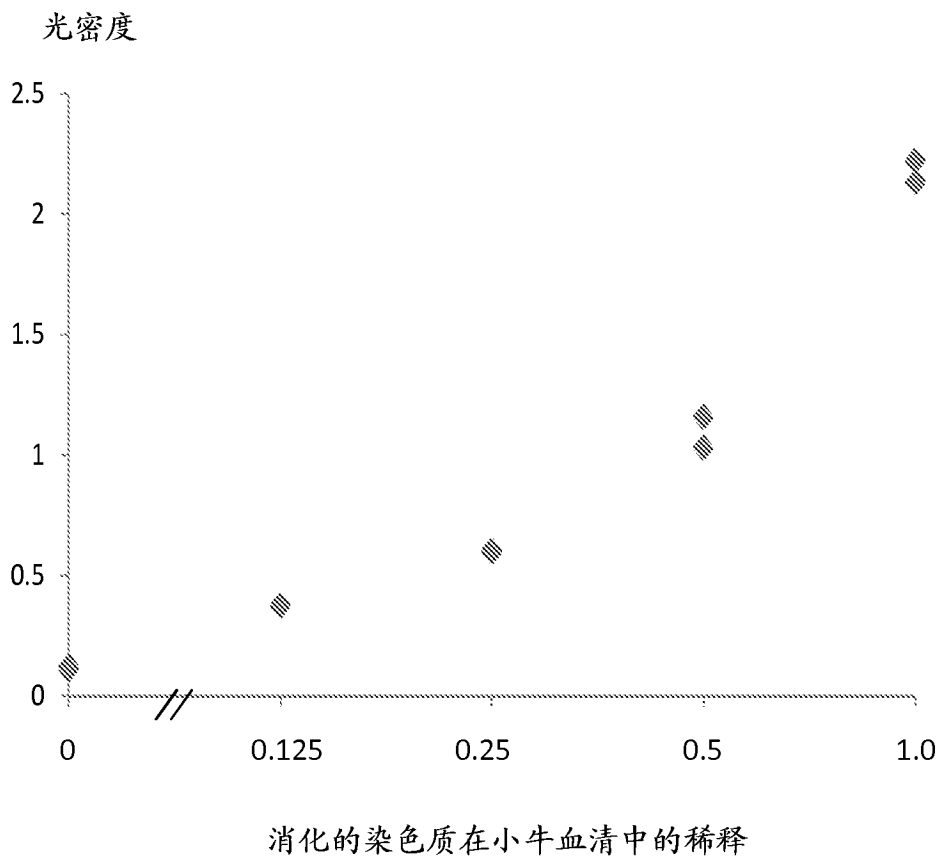


图 3

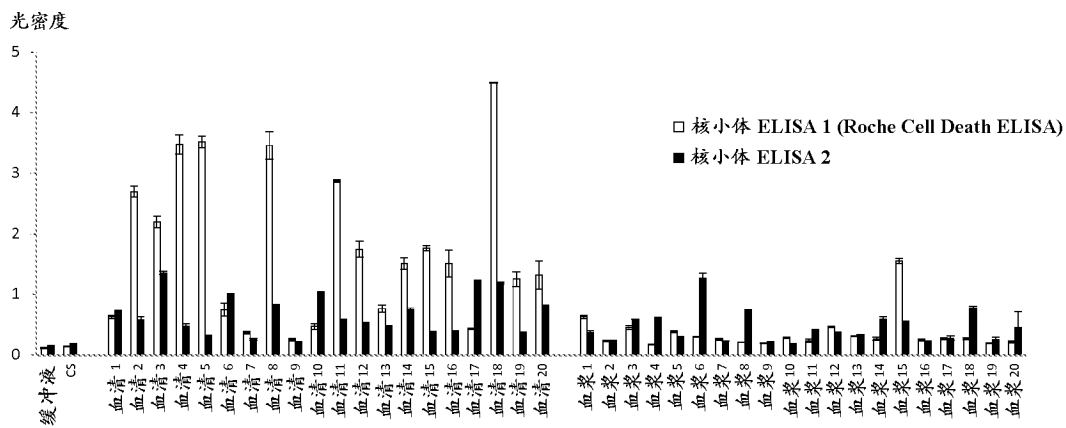


图 4

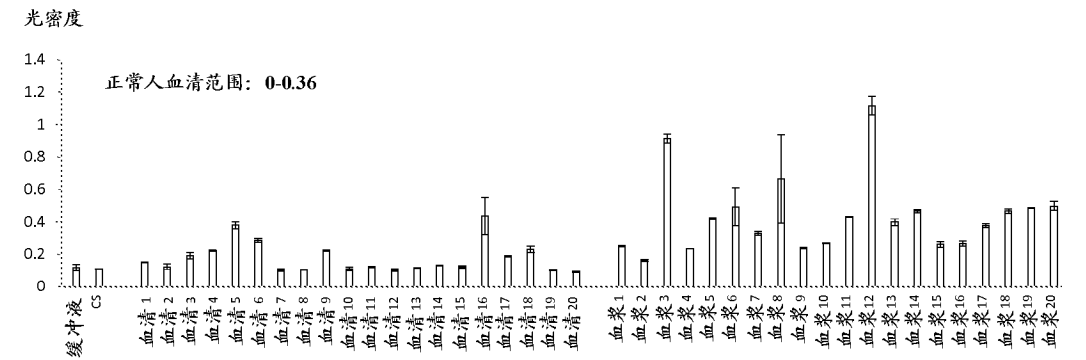


图 5

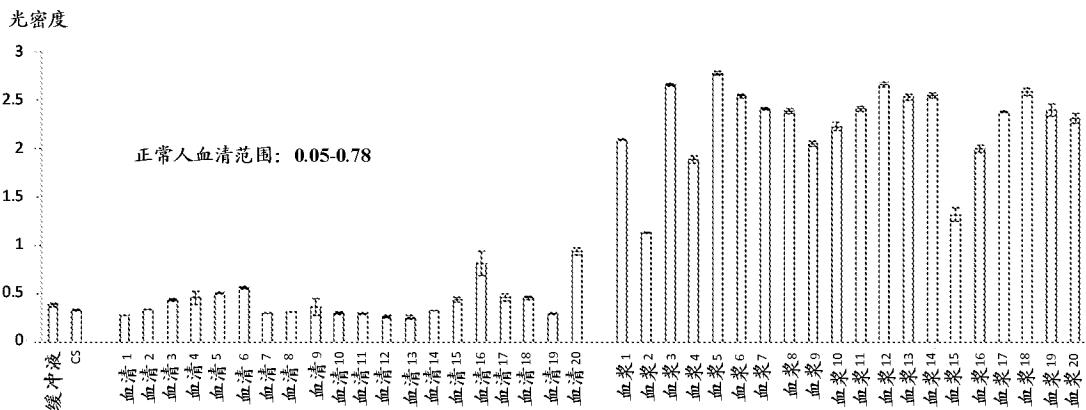


图 6

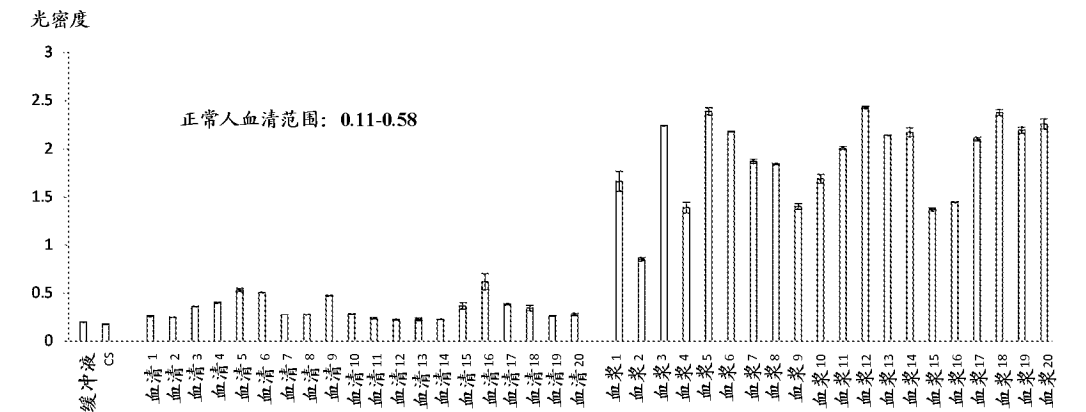


图 7

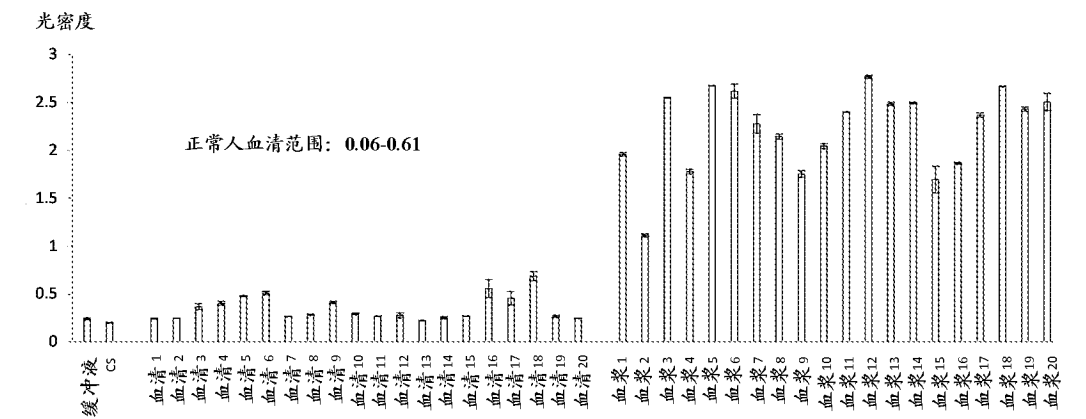


图 8

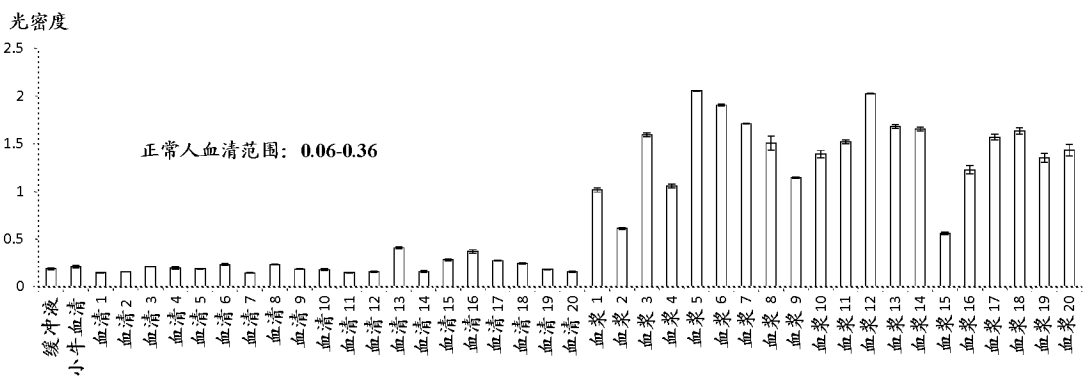


图 9

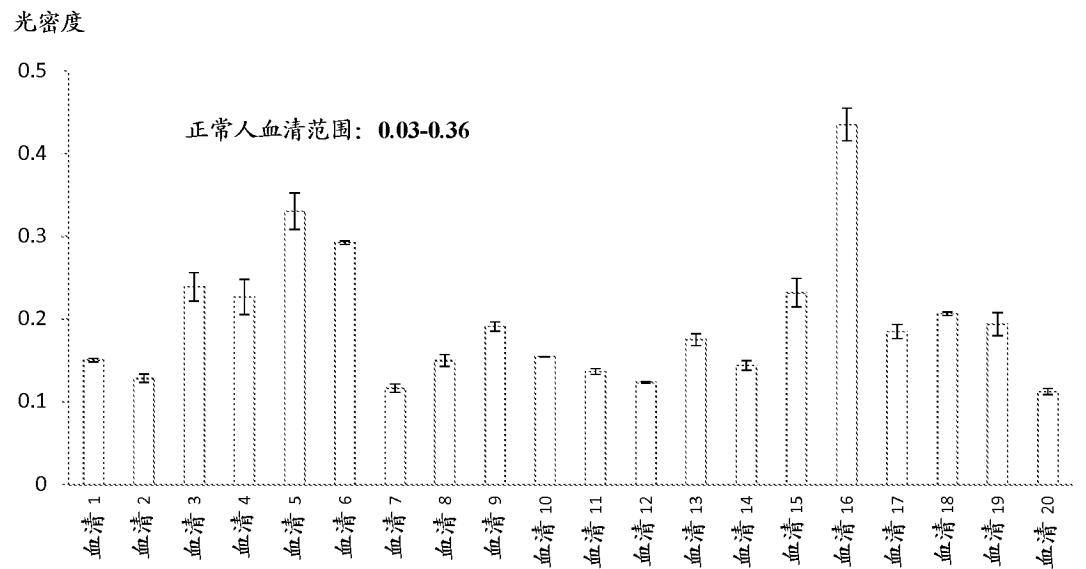


图 10

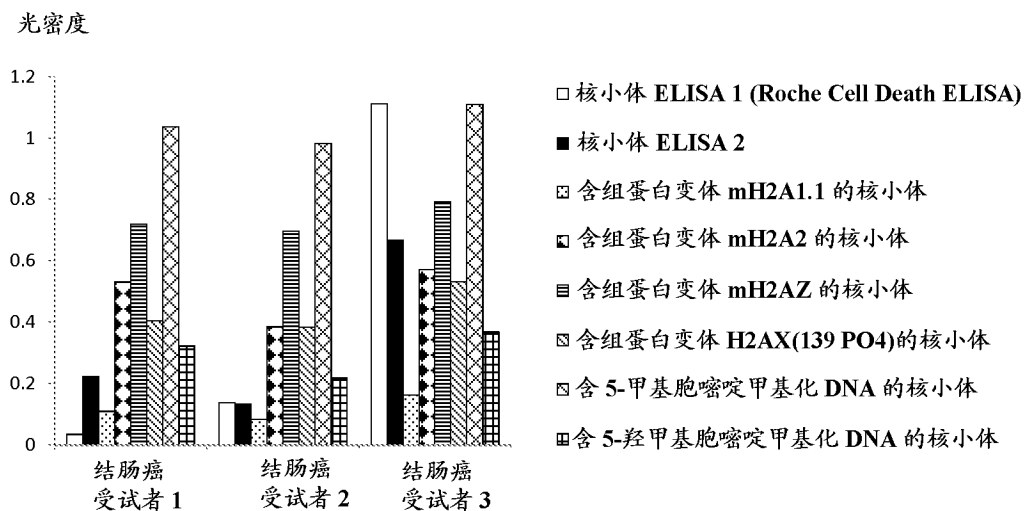


图 11

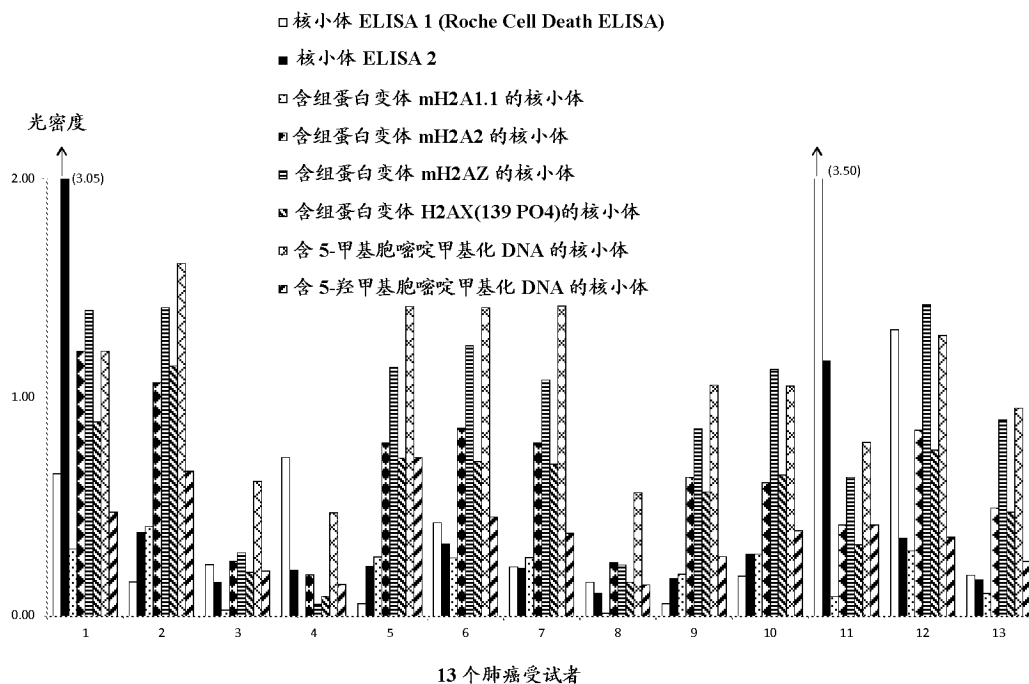


图 12

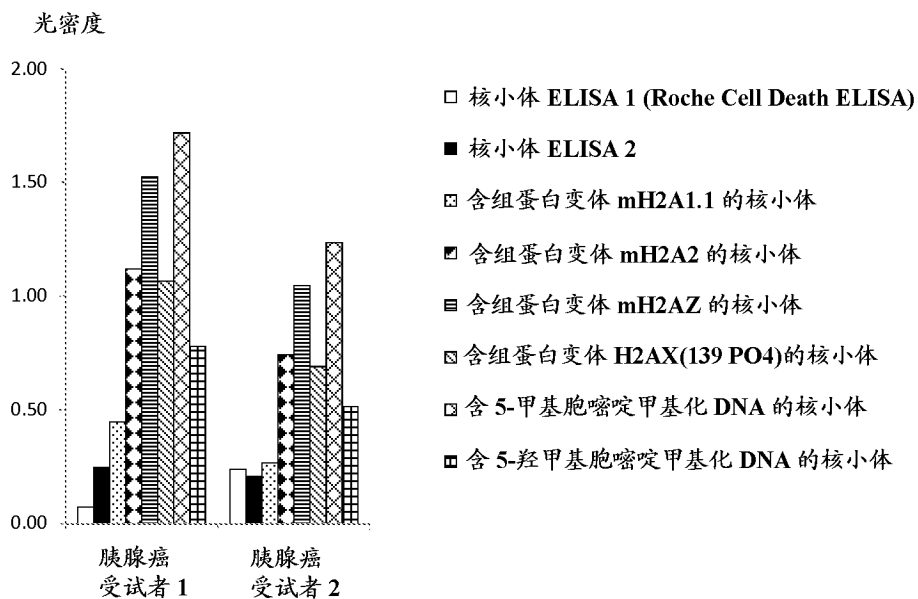


图 13

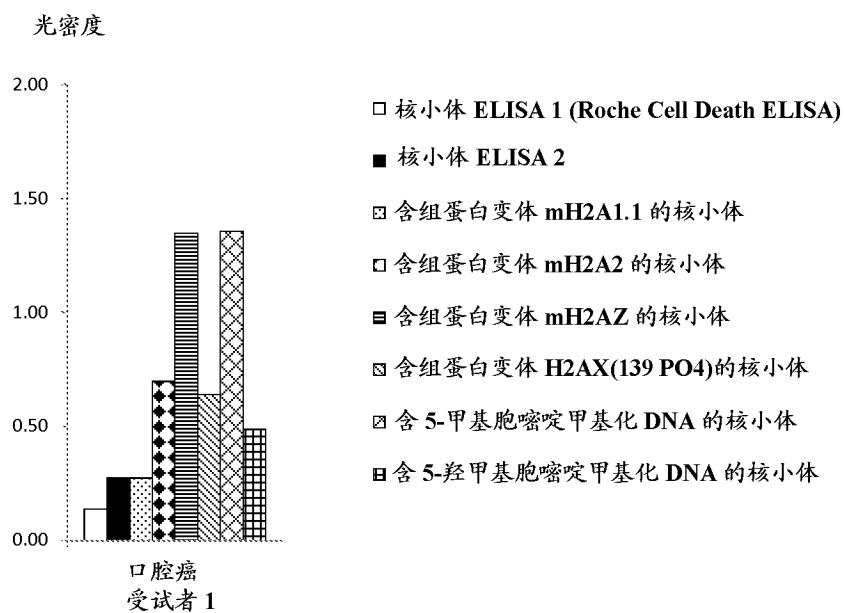


图 14

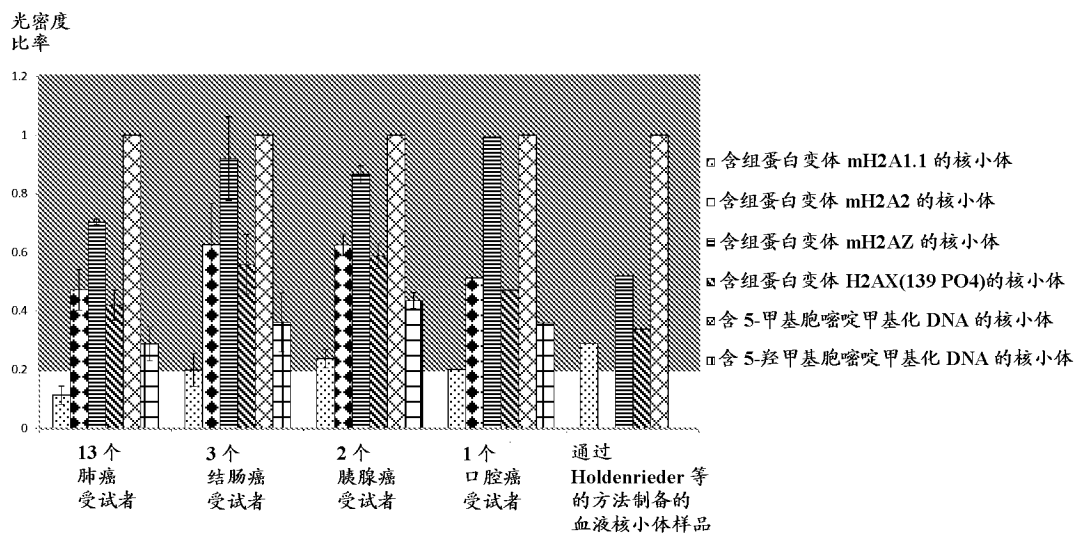


图 15

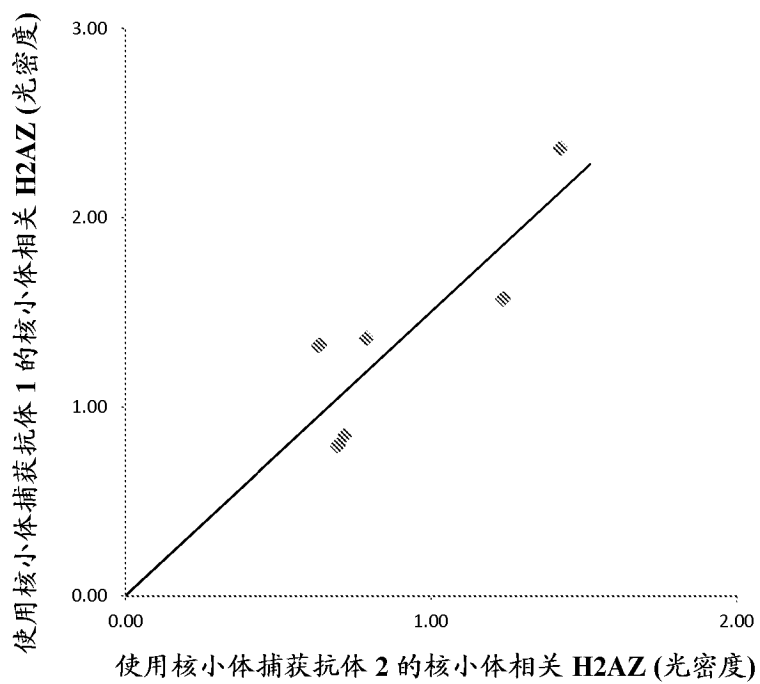


图 16

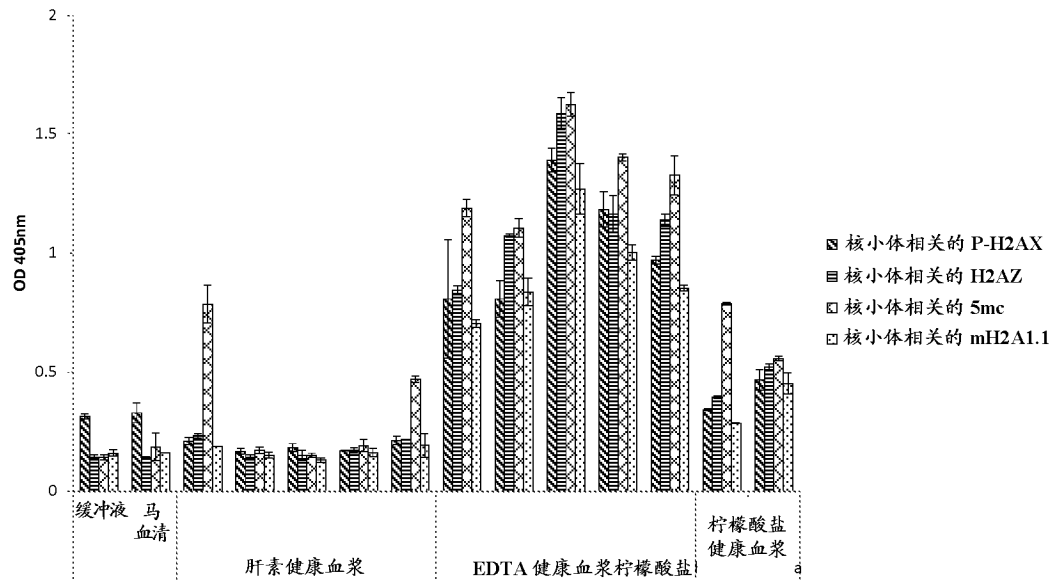


图 17

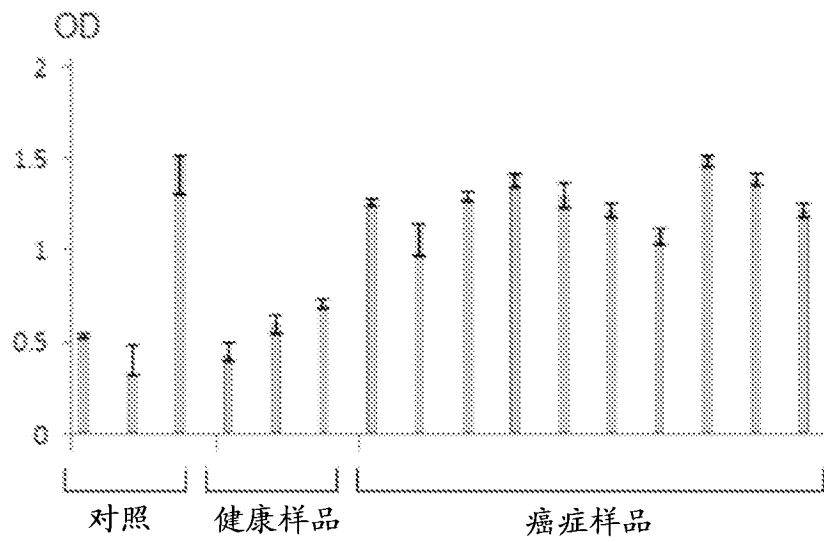


图 18

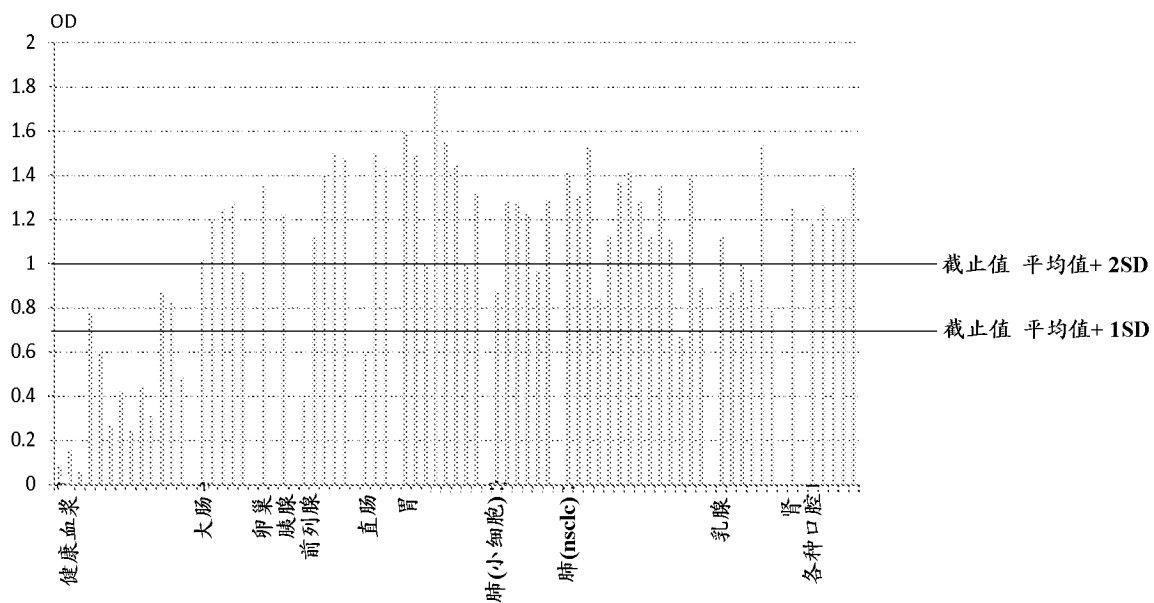


图 19

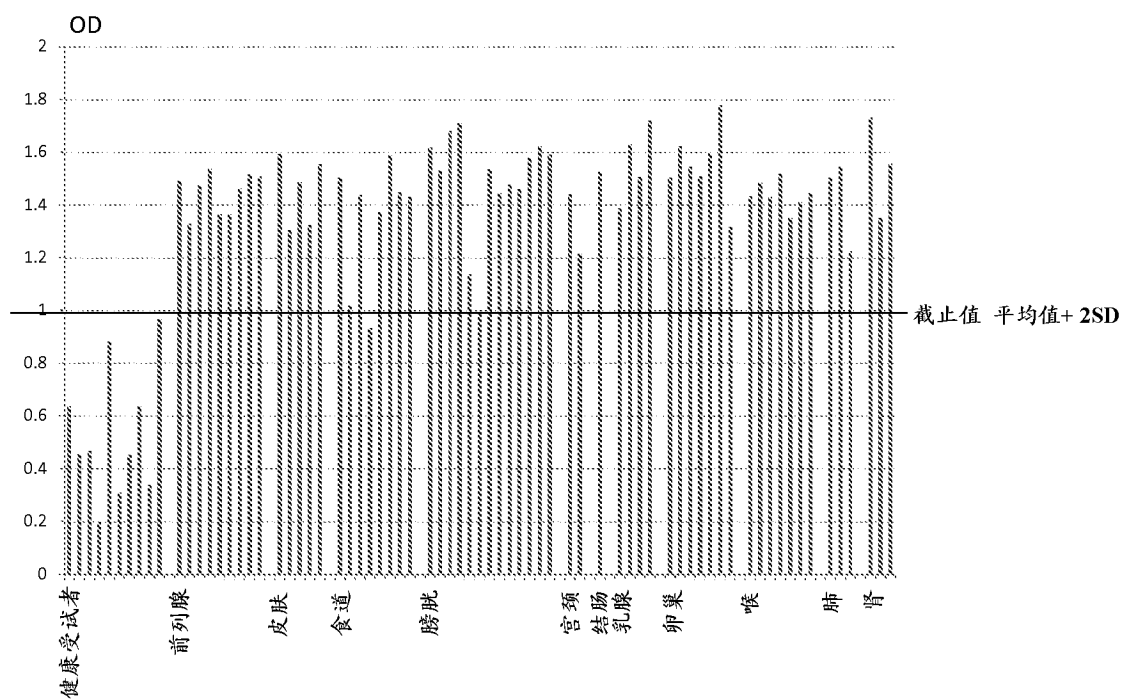


图 20

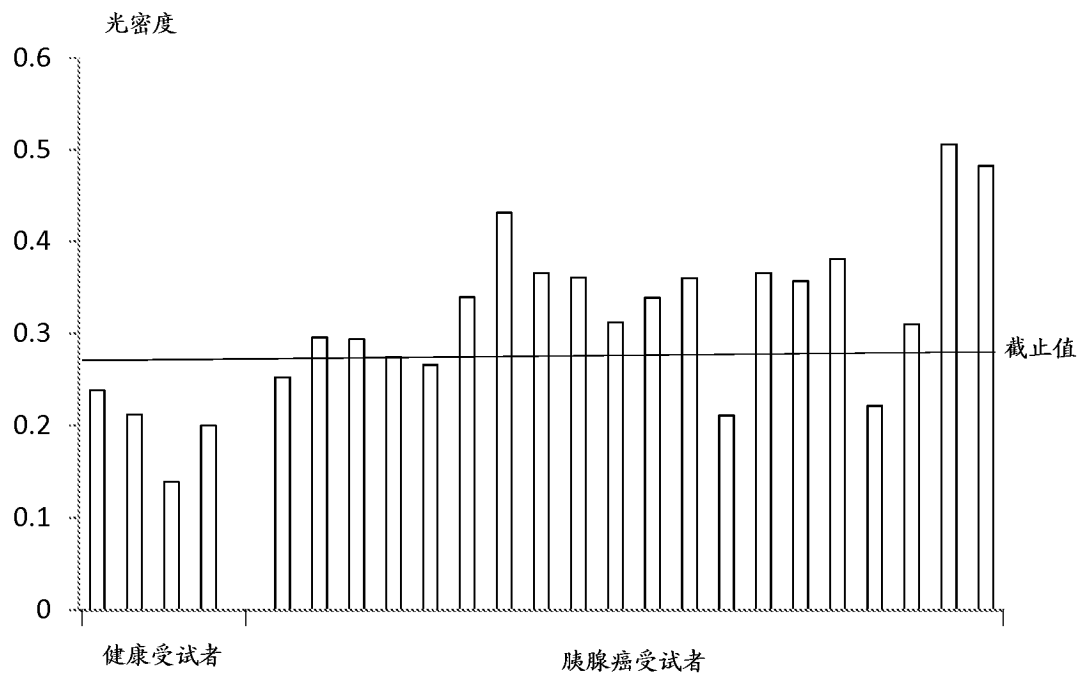


图 21

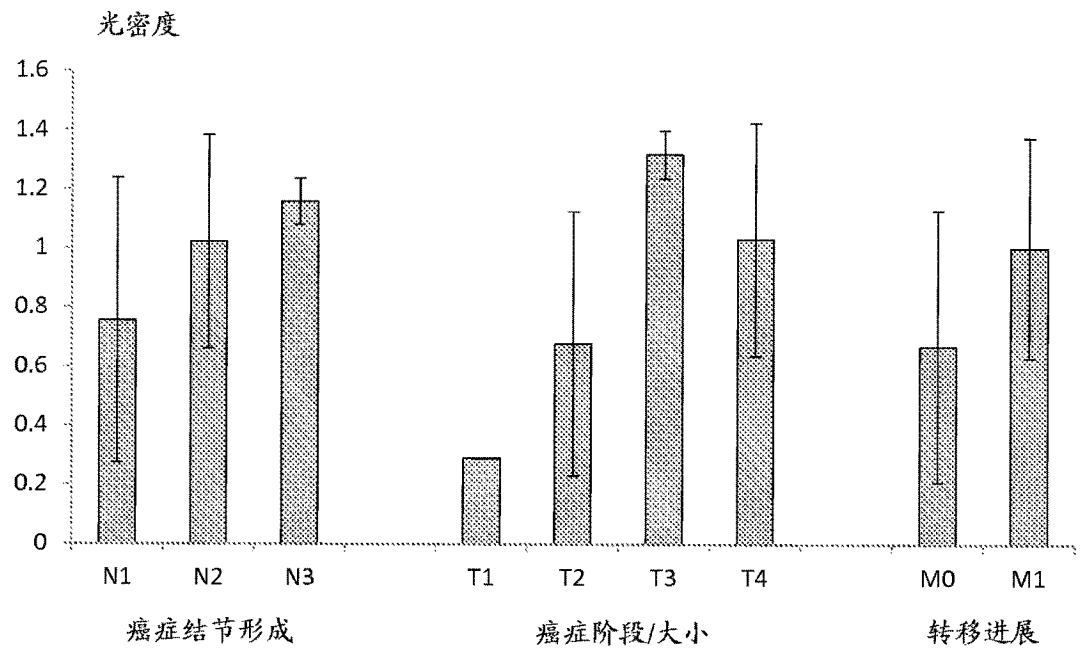


图 22

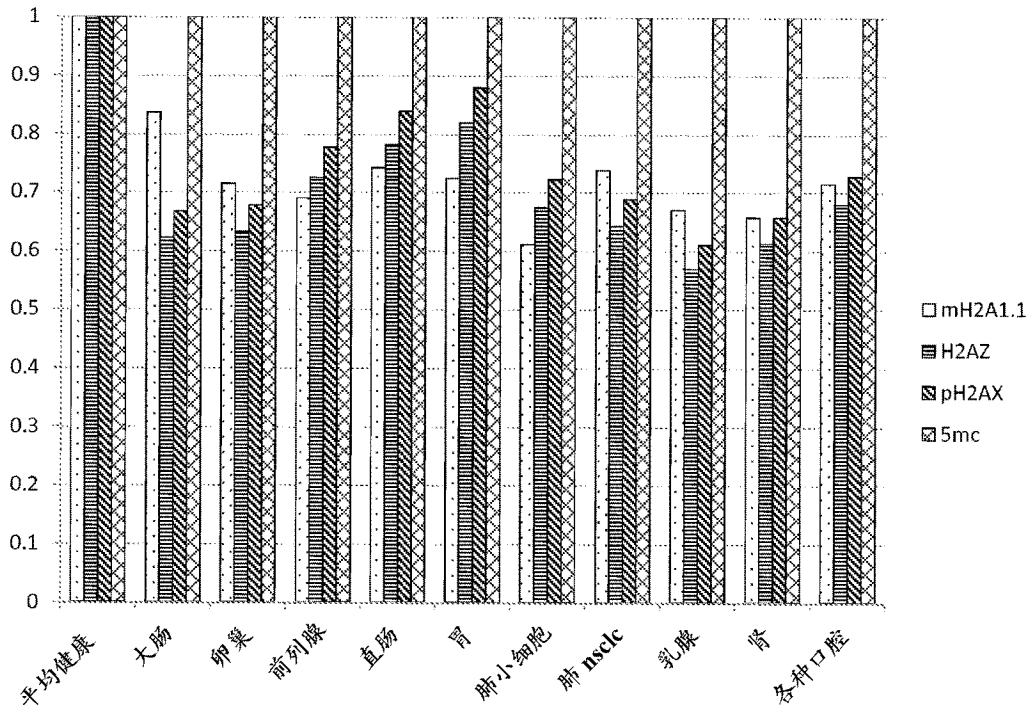


图 23

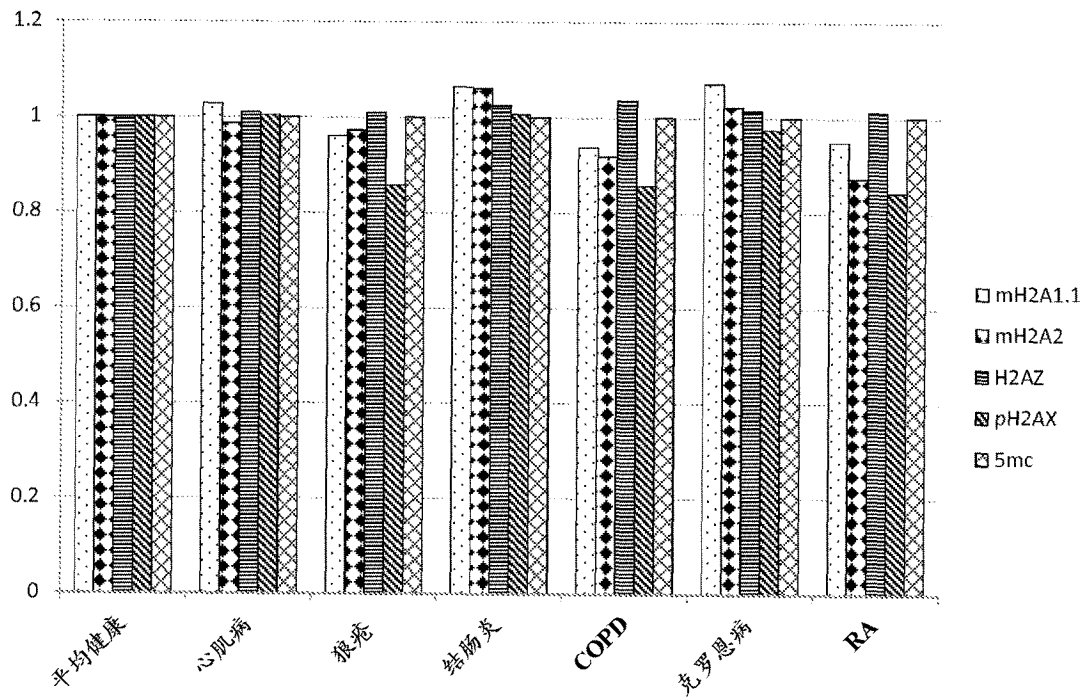


图 24