(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7376493号
(P7376493)

(45)発行日　令和5年11月8日(2023.11.8)

(24)登録日　令和5年10月30日(2023.10.30)

(51)国際特許分類			FI		
G01N	*33/68*	*(2006.01)*	G01N	33/68	
G01N	*33/53*	*(2006.01)*	G01N	33/53	D
C12Q	*1/34*	*(2006.01)*	C12Q	1/34	
C07K	*16/18*	*(2006.01)*	C07K	16/18	

請求項の数　30　（全41頁）

(21)出願番号　特願2020-545489(P2020-545489)
(86)(22)出願日　平成31年3月1日(2019.3.1)
(65)公表番号　特表2021-515888(P2021-515888A)
(43)公表日　令和3年6月24日(2021.6.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2019/020283
(87)国際公開番号　WO2019/169263
(87)国際公開日　令和1年9月6日(2019.9.6)
審査請求日　令和4年2月28日(2022.2.28)
(31)優先権主張番号　62/637,066
(32)優先日　平成30年3月1日(2018.3.1)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者　520252664
エピサイファー，インコーポレイテッド
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州　２７７１３，リサーチ トライアングル パーク，スイート ９，８０１ キャピトーラ ドライブ
(74)代理人　100114775
弁理士　高岡 亮一
(74)代理人　100121511
弁理士　小田 直
(74)代理人　100202751
弁理士　岩堀 明代
(74)代理人　100208580
弁理士　三好 玲奈
(74)代理人　100191086

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　化学的に定義された組み換え型ヌクレオソームを使用するヌクレオソーム修飾の定量化

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

対象由来の生物サンプルにおけるヌクレオソーム修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、

ａ．生物サンプルを単離するステップと、

ｂ．前記生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを調製するステップと、

ｄ．前記組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、

ｅ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、アフィニティー試薬を添加するステップと、

ｆ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、

ｇ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を前記参照標準物質と比較することにより、前記標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、

を含む、方法。
【請求項２】
対象由来の生物サンプルにおける単一のヌクレオソーム上の２つ以上の修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、
ａ．生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．前記生物サンプルから、標的エピトープにおける２つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．前記２つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを調製するステップと、
ｄ．前記組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、２つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を前記参照標準物質と比較することにより、前記標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
を含む、方法。
【請求項３】
疾患または障害を有する対象由来の生物サンプルにおける１つ以上のヌクレオソーム修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、
ａ．前記対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．前記生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．前記１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを調製するステップと、
ｄ．前記組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を前記参照標準物質と比較することにより、前記標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
を含む、方法。
【請求項４】
１つ以上のヌクレオソーム修飾の絶対的定量化に基づき、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有する対象の予後を決定するための方法であって、
ａ．前記対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．前記生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．前記１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを調製するステップと、
ｄ．前記組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．前記ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を前記参照標準物質と比較することにより、前記標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
ｈ．前記１つ以上の標的エピトープの絶対的存在量に基づき対象の予後を決定するステップと、
を含む、方法。
【請求項５】
前記生物サンプルは、クロマチンをモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームに消化する酵素で処理される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記酵素が、ミクロコッカスヌクレアーゼである、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記生物サンプルが細胞を含み、クロマチンが前記細胞から単離される、請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
前記細胞が、１つ以上のヒストン翻訳後修飾および／またはＤＮＡ修飾の変化に関連する疾患または障害に由来する細胞である、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記細胞が、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害に由来する細胞ではない、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記生物サンプルが、生検である、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記生物サンプルが、生体液である。請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記生物サンプルが、末梢血単核細胞を含む、請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１３】
前記生物サンプルが、循環性ヌクレオソームを含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記循環性ヌクレオソームが、血液由来である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記循環性ヌクレオソームが、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害に由来する細胞由来である、請求項１４に記載の方法。
【請求項１６】
前記生物サンプルが、血漿、尿、唾液、糞便、リンパ液、または脳脊髄液である、請求項１３に記載の方法。
【請求項１７】
前記対象がヒトである、請求項１～１６に記載の方法。

【請求項１８】
前記アフィニティー試薬が、前記エピトープに対する抗体またはそのフラグメントである、請求項１～１７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１９】
同じヌクレオソーム上の少なくとも１つ以上のヌクレオソーム修飾が定量化される、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
異なるヌクレオソーム上の少なくとも１つ以上のヌクレオソーム修飾が定量化される、請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２１】
少なくとも１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化が、抗体ベースの検出アッセイにより決定される、請求項１～２０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２２】
前記抗体ベースの検出アッセイが、ＥＬＩＳＡ、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ、ＡｌｐｈａＳＣＲＥＥＮ、Ｌｕｍｉｎｅｘ、およびイムノブロッティングからなる群から選択される、請求項２１に記載の方法。
【請求項２３】
前記抗体ベースの検出アッセイが、基質の捕捉および検出のために２つの異なる抗体を使用する、請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２４】
基質の捕捉および検出のために使用される前記抗体が、ヒストンＰＴＭおよびヒストンＰＴＭ以外のヌクレオソーム構造に特異的に結合する、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
基質の捕捉および検出のために使用される前記抗体が、２つの異なるヒストンＰＴＭに特異的に結合する、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記抗体ベースの検出アッセイが、基質の捕捉および検出の両方に同じ抗体を使用する、請求項２１または２２に記載の方法。
【請求項２７】
前記ヌクレオソームが、セリンおよびアラニンのＮ－アセチル化；セリン、スレオニン、およびチロシンのリン酸化；リジンのＮ－クロトニル化、Ｎ－アシル化；リジンのＮ６－メチル化、Ｎ６，Ｎ６－ジメチル化、Ｎ６，Ｎ６，Ｎ６－トリメチル化；アルギニンのω－Ｎ－メチル化、対称性－ジメチル化、非対称性－ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化；リジンのＳＵＭＯ化；セリンおよびスレオニンのＯ－メチル化；アルギニン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸のＡＤＰ－リボシル化；発癌性Ｋ－Ｍ変異（たとえばＨ３Ｋ４Ｍ、Ｈ３Ｋ９Ｍ、Ｈ３Ｋ２７Ｍ、Ｈ３Ｇ３４Ｒ、Ｈ３Ｇ３４Ｖ、Ｈ３Ｇ３４Ｗ、またはＨ３Ｋ３６Ｍ）；５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、５－ホルミルシトシン、５－カルボキシルシトシン、３－メチルシトシン、５，６－ジヒドロウラシル、７－メチルグアノシン、キサントシン、およびイノシンからなる群から選択される少なくとも１つの翻訳後アミノ酸修飾またはＤＮＡ修飾を含む、請求項１～２６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２８】
前記エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害が、腎細胞癌、グリオーマ、膠肉腫、未分化星状細胞腫、髄芽腫、肺がん、小細胞肺癌、子宮頸癌、結腸がん、直腸がん、脊索腫、咽頭がん、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、結腸直腸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、乳がん、膵臓がん、前立腺がん、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、精巣腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング腫瘍、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭腺肉腫、嚢状腺腫性肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、メラノーマ、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、ニューロブラストーマ、網膜芽細胞腫、グリオブラストーマ、乏突起膠腫、聴神経腫瘍

、血管芽腫、髄膜腫、松果体腫、上衣腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性がん腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、グリオーマ、脂肪肉腫、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム（Ａｎａｐｌａｓｍａ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、クラミドフィラ、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペス、ＨＩＶ、ビルハルツ住血吸虫により引き起こされる感染症；肥満、糖尿病、心疾患；自閉症、脆弱Ｘ症候群、ＡＴＲ－Ｘ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、ベックウィズ・ウィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、コフィン・ローリー症候群、免疫不全－セントロメア不安定性－顔貌異常症候群、αサラセミア、白血病、ハンチントン病、統合失調症、双極性疾患、老化、認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デランゲ症候群、歌舞伎症候群、シェーグレン症候群、白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病および潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化、ならびに心肥大からなる群から選択される、請求項４に記載の方法。

【請求項２９】

修飾された組み換え型ヌクレオソームが、組み合わせた修飾が単一または隣接するヌクレオソーム上で検出されることを確認するための対照として使用される、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項３０】

コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾に関する検出試薬の特異性を決定する方法であって、前記コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを使用することを含み、

アフィニティー試薬の特異性の決定が、

ａ．１つ以上のヒストン修飾および／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む１つ以上の組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームサンプルを調製するステップと、

ｂ．前記組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、一連の参照標準物質を作製するために単一濃度または様々な濃度で提供するステップと、

ｃ．前記組み換え型ヌクレオソーム参照物質に１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、

ｄ．前記組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行い、その情報を用いてアフィニティー試薬の特異性を決定するステップと、

を含む、

方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

優先権の主張

本出願は、全内容が本明細書中参照により組み込まれている、２０１８年３月１日に出願の米国特許仮出願番号第６２／６３７，０６６号の利益を主張する。

【０００２】

本発明の分野

本発明は、生物サンプルから、（ヒストンタンパク質または巻き付いているＤＮＡ上で）共有結合により修飾された、バリアント、または変異体ヌクレオソーム（集合的に「修飾ヌクレオソーム」または「ヌクレオソーム修飾」）の定量化のための参照標準物質としての、ヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を保有する組み換え型／半合成ヌクレオソームの使用に関する。さらに本発明は、疾患のバイオマーカーとして単一または組み合わせたヌクレオソーム修飾を正確に定量化するためのアッセイを使用する方法に関する。

【背景技術】
【０００３】
ヌクレオソームは、ヒストン８量体（コアヒストン（Ｈ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、およびＨ４）各２コピーを含む）の周りに一体的に巻き付いている１４７塩基対のＤＮＡからなる、クロマチンの反復単位である（Ｍａｒｇｕｅｒｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｇｅｎｅｔ．１１（４）：２８５ （２０１０））。クロマチンの構造および機能が変化すると、遺伝子発現、ＤＮＡ修復、染色体伝達、および細胞分化を含む様々な細胞の活性が調節される（Ｂｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．２１（Ｒ１）：Ｒ９０ （２０１２）；Ｌａｈｔｚ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．３（１）：５１ （２０１１）；Ｌｕｎｙａｋ ｅｔ ａｌ．，Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．１７（Ｒ１）：Ｒ２８ （２００８）；Ｒｅｉｋ，Ｎａｔｕｒｅ ４４７（７１４３）：４２５ （２００７））。これらプロセスは、可逆的なヒストンの翻訳後修飾（ＰＴＭ；たとえばリジンのメチル化またはアセチル化）により部分的に媒介され、直接作用するかまたはエフェクター結合タンパク質により「読み取られる」ことにより、特定の下流のシグナリング経路を変換する。今日までに、１００を超える特有のヒストンＰＴＭが同定されており、このうちの多くが、神経変性（Ｌａｎｄｇｒａｖｅ－Ｇｏｍｅｚ ｅｔ ａｌ．，Ｆｒｏｎｔ．Ｃｅｌｌ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．９：５８ （２０１５））およびメタボリックシンドローム（ＤｅｌＣｕｒｔｏ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｌｉｎ．Ｎｕｔｒ．Ｍｅｔａｂ．Ｃａｒｅ １６（４）：３８５ （２０１３）；Ｗａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｔｉｏｘｉｄ．Ｒｅｄｏｘ Ｓｉｇｎａｌ １７（２）：２８２ （２０１２））からがん（Ｃｈｏｐｒａ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅｔ．２０８（５）：１９２ （２０１５）；Ｇｒｅｅｎｂｌａｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｌｅｕｋｅｍｉａ ２８（７）：１３９６ （２０１４）；Ｇａｊｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅｓｉｓ ４：ｅ１３７ （２０１５）；Ｗｉｔｔ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｐｈａｒｍ．Ｄｅｓ．１５（４）：４３６ （２００９）；Ｈａｎｍｏｄ ｅｔ ａｌ．，Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｂｌｏｏｄ Ｃａｎｃｅｒ ６２（１）：５２ （２０１５）；Ｋｏｂａｙａｓｈｉ ｅｔ ａｌ．，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ３２（２１）：２６４０ （２０１３））までの範囲にわたるヒトの疾患に関連している。重要なことに、ＰＴＭ相互作用タンパク質（ＰＴＭ－ｉｎｔｅｒａｃｔｉｎｇ ｐｒｏｔｅｉｎ）（別名「リーダー（ｒｅａｄｅｒ）」）は、著しくドラッガブルであり、多種多様なヒト疾患／障害に関する優れた治療標的となっている（Ａｒｒｏｗｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｄｒｕｇ Ｄｉｓｃｏｖ．１１（５）：３８４ （２０１２））。さらに、ヒストンのＰＴＭは、早期の疾患の検出および予後判定、ならびに個別化処置戦略の通知に有用であり得る新たに出現したクラスのがんバイオマーカーである（Ｋｈａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｗｏｒｌｄ Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．６（４）：３３３ （２０１５）；Ｃｈｅｒｖｏｎａ ｅｔ ａｌ．，Ａｍ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２（５）：５８９ （２０１２））。
【０００４】
ヒストンのＰＴＭとクロマチン調節タンパク質との間の協調機能は、複雑なシステムレベルのシグナリングネットワークを表し、その有効な照合（ｉｎｔｅｒｒｏｇａｔｉｏｎ）は、ヌクレオソームベースのツールを必要とする。多価であること（すなわち所定のタンパク質の中の複数のリーダードメイン）は、クロマチン調節因子の一般的な特色であり（Ｒｕｔｈｅｎｂｕｒｇ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ．Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．８（１２）：９８３ （２００７））、ヒストン相互作用が状況特異的に調節される重要な手段としての役割を果たすと考えられている。実際に、リーダーの結合（および細胞調節のその後の変化）は、様々なＰＴＭまたはそれらの組み合わせの存在下で大きく変化し、これはヒストンコードとして知られる仮説である（Ｓｔｒａｈｌ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ ４０３（６７６５）：４５ （２０００）；Ｊｅｎｕｗｅｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２９３（５５３２）：１０７４ （２００１））。たとえば、ブロモドメインＰＨＤフィンガー転写因子（ＢＰＴＦ）リーダータンパク質は、Ｈ３Ｋ４

ｍｅ３（Ｋｄ＝約１μＭ）およびＨ４Ｋ１２ａｃ（Ｋｄ＝約６０μＭ）に対して個別の結合アフィニティーが低いドメインを含む（Ｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔｕｒｅ　４４２（７０９８）：９１　（２００６））が、これは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３／Ｈ４Ｋ１２ａの組み合わせ修飾モノヌクレオソームの存在下では有意に増大する（Ｈ３Ｋ４ｍｅ３単独と比較して３倍超）。ＢＰＴＦは、抗がん療法の標的であり（Ｄａｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｎａｔｌ．　Ｃａｎｃｅｒ　Ｉｎｓｔ．　１０７（５）　（２０１５））；筋萎縮性側索硬化症患者においても高いレベルで見出されている（Ｍｕ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｅｘｐ．　Ｎｅｕｒｏｌ．　１４６（１）：１７　（１９９７））。興味深いことに、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３／Ｈ４のアセチル化は、活性なプロモーターで共存しており（Ｚｈａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　ＥＭＢＯ　Ｒｅｐ．　１６（１１）：１４６７　（２０１５））、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３は、エフェクターの動員を介してヒストンのアセチル化を促進することが示されている（Ｔａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｃｅｌｌ　１５４（２）：２９７　（２０１３））。疾患状態を調べるための必要な前駆体としての、ヒストンＰＴＭの細胞の生理学に及ぼす複合的影響を解明する、作用機序を調べる研究は始まったばかりである。一例として、（食事によりもたらされる）腸内マイクロバイオームの変化は、宿主組織中のヒストンＰＴＭの特定の組み合わせに有意に影響し得る（Ｋｒａｕｔｋｒａｍｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　６４（５）：９８２　（２０１６））。同様に、近年の知見により、組み合わせたヌクレオソームＰＴＭは、（単一のＰＴＭと比較して）良好な肺がんの予後バイオマーカーを提供し得る（Ｓｈｅｍａ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｓｃｉｅｎｃｅ　３５２（６２８６）：７１７　（２０１６））。

【０００５】

組み合わせたヒストンＰＴＭが有効に提示されるためには、生理的なＰＴＭ－タンパク質の相互作用のスキャフォールドとしての役目を果たす、インタクトなヌクレオソームの３次元の構造に依存する。ヒストンの組み合わせのコードの性質を理解することは、エピジェネティックな調節と疾患との間の関連を次世代の治療およびバイオマーカーに変換する場合に重要である。これは、クロマチンの調節および疾患において不可欠な役割を果たす、ヒストンのメチル化およびアセチル化に特に当てはまる（Ｇｒｅｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｇｅｎｅｔ．　１３（５）：３４３　（２０１２）；　Ｆｉｌｉｐｐａｋｏｐｏｕｌｏｓ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｎａｔ．　Ｒｅｖ．　Ｄｒｕｇ　Ｄｉｓｃｏｖ．　１３（５）：３３７　（２０１４）；　Ｓｏｓｈｎｅｖ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｍｏｌ．　Ｃｅｌｌ　６２（５）：６８１　（２０１６））。

【０００６】

生物サンプルからヒストンのＰＴＭを定量化するためにいくつかの方法が開発されており（Ｓｉｄｏｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｖｉｓ．　Ｅｘｐ．　２０１６（１１１）；　Ｏｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｅｘｐｅｒｔ　Ｒｅｖ．　Ｐｒｏｔｅｏｍｉｃｓ　１２（５）：４９９　（２０１５）；　Ｍａｃｈｌｅｉｄｔ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｊ．　Ｂｉｏｍｏｌ．　Ｓｃｒｅｅｎ．　１６（１０）：１２３６　（２０１１））、この大部分は、ヌクレオソームの濃縮（たとえばクロマチン免疫沈降：ＣｈＩＰ）または検出（たとえばＥＬＩＳＡまたはＡｌｐｈａ）のための修飾特異的抗体の使用に依存している。ＥＬＩＳＡは、生物サンプルからヒストンまたはＤＮＡ修飾を定量化するために一般的に使用され、様々な抗体捕捉手法を使用してヒストンまたはヌクレオソーム上の修飾を直接定量化するために開発された特異的アッセイである。ヌクレオソームベースの検出は、以下の２つの理由のため、ヒストンベースの検出よりも優れている：

１）ヌクレオソームベースの方法は、面倒でばらつきをもたらす酸－抽出ステップを必要としない；および

２）ヌクレオソームベースのアッセイは、ヒストンのサブユニットまたはＤＮＡ単独の使用ではモニタリングすることが不可能である、ｉｎ　ｔｒａｎｓでの組み合わせた修飾（たとえばヒストン－ヒストン、ＤＮＡ－ＤＮＡ、またはヒストン－ＤＮＡの組み合わせ）の定量化を可能にする。

【０００７】

これら大きな利点にもかかわらず、現在のヌクレオソームベースのアッセイには、定量化のための適切な対照がない。実際に、現在の技術を使用したアッセイは定性的であり、ＰＴＭレベルは相対的測定として報告されるかまたは外因性の異種クロマチン（ｘｅｎｏｃｈｒｏｍａｔｉｎ）（たとえばトリ、酵母、または昆虫）を使用して正規化される。精製外因性クロマチン調製物の使用は、これら試薬が、（ＰＴＭに特異的なレベルで）はっきりと定義されておらずバッチのばらつきを示すため、広範囲の問題を引き起こし得ることから、（実験間でまたはさらには研究室間での）アッセイを正規化するためにこれらを使用することは限定的である。これに加え、現在、組み合わせたマークが、プール全体で同時に起こるのではなく同じヌクレオソーム上で真に提示されるかどうかを決定することは難題である。

【０００８】

上記を考慮すると、生物サンプルからヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾を検出するヌクレオソームベースのアッセイのための改善された対照が当技術分野で必要とされている。

【発明の概要】

【０００９】

本発明は、較正のための定量化の標準物質としてヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾を包有する組み換え型／半合成／デザイナーヌクレオソーム（本明細書中以下では「組み換えヌクレオソーム」と呼ばれる）の使用に関する。現在使用される精製クロマチン抽出物とは異なり、本アッセイは、単一または組み合わせたヌクレオソーム修飾の正確な定量化のための完全に定義された組み換え型／半合成のヌクレオソームを利用する。当技術分野で一般に使用される標準物質と同様に、修飾ヌクレオソームは、アッセイの定量化のための標準曲線を作成するために同じ実験でアッセイされる（サンプルに同一の処置を行う）。単一または組み合わせたヌクレオソームＰＴＭの定量化は、現在使用される相対的測定よりも良好な、疾患に関するバイオマーカーを提供し得る。

【００１０】

重要なことに、本発明者らは、ヌクレオソームのみが、血漿サンプルにおいて有用な参照標準物質を提供すると決定した。ヒストンまたはヌクレオソームを血漿に添加する場合、後者のみが、予測値で回収され、よって定量化に関して実行可能である。この方法では、本発明のヌクレオソームは、血漿または他の体液に直接由来する循環中ヌクレオソームを定量化するアッセイに有用な標準物質を提供する。

【００１１】

よって、本発明の一態様は、生物サンプルにおけるヌクレオソーム修飾の存在量（ヒストンまたはＤＮＡ）を定量化するための方法であって、

ａ．生物サンプルを単離するステップと、

ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、

ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、

ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、アフィニティー試薬を添加するステップと、

ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、

ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと

を含む、
方法に関する。
【００１２】
本発明の別の態様は、生物サンプルにおける単一のヌクレオソーム上の２つ以上の修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、
ａ．生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける２つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．２つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、２つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含む、
方法に関する。
【００１３】
本発明のさらなる態様は、疾患または障害を有する対象由来の生物サンプルにおける１つ以上のヌクレオソーム修飾の存在量（ヒストンまたはＤＮＡ）を定量化するための方法であって、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含む、方法に関する。
【００１４】
本発明のさらなる態様は、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化に基づきエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有する対象の予後を決定するための方法であって、

ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソームの参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾の量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
ｈ．１つ以上の標的エピトープの存在量に基づき対象の予後を決定するステップと
を含む、方法に関する。

【００１５】

本発明の別の態様は、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化に基づきエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害のバイオマーカーを同定するための方法であって、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソームの参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
ｈ．１つ以上の標的エピトープの存在量を、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害と相関させることにより、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害のバイオマーカーを同定するステップと
を含む、方法に関する。

【００１６】

本発明のさらなる態様は、対象の生物サンプルから１つ以上のヌクレオソーム修飾のエピジェネティックな状態を修飾する作用物質をスクリーニングする方法であって、
方法が、作用物質の存在下および非存在下での１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量を決定するステップを含み、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量を決定するステップが、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／また

はＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含み、
作用物質の存在下および非存在下でのエピジェネティックな状態の変化により、エピジェネティックな状態を修飾する作用物質が同定される、
方法に関する。

【００１７】

本発明のこれらおよび他の態様は、以下の本発明の説明でより詳細に記載されている。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１】図１Ａ～１Ｃは、修飾された組み換え型デザイナーヌクレオソーム（ｄＮｕｃ）の合成および定性的バリデーションを示す。（Ａ）ｄＮｕｃのアセンブリ前のＨ３Ｒ２／Ｒ８／Ｒ１７のトリシトルリン化ヒストンの質量分析。予想される質量＝１５２２７ダルトン；実際の質量：１５２２６ダルトン。（Ｂ）還元剤下のＳＤＳ－ＰＡＧＥの後にクーマシーおよびイムノブロット（Ａｂｃａｍ：ａｂ５１０３）を使用した８量体およびＰＴＭのバリデーション。（Ｃ）ネイティブＰＡＧＥ（遊離ＤＮＡなし）を使用したＨ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ　ｄＮｕｃアセンブリのバリデーション。

【図２】図２Ａ～２Ｂは、ヌクレオソームが予測値で回収され、ヒト血漿において信頼できる較正を提供することを示す。サンドイッチＥＬＩＳＡは、基質としてＨ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔヒストンおよびｄＮｕｃを使用してヌクレオソームのシトルリン化を測定するように作製した。基質を、抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ抗体を使用して捕捉し；検出は、Ｈ３の非修飾Ｃ末端に特異的なＨＲＰコンジュゲート抗体を使用して行った。（Ａ）５％ヒト血漿に添加したシトルリン化Ｈ３またはｄＮｕｃを使用した標準曲線。（Ｂ）１００％血漿に添加したシトルリン化Ｈ３またはｄＮｕｃの回収。サンプルを、ＥＬＩＳＡ前に２０倍に希釈し、（Ａ）の標準物質に対して正規化した。理論値＝正規化した予測値。

【図３】図３Ａ～３Ｃは、修飾ｄＮｕｃの組み合わせを使用したヌクレオソームＰＴＭに対するＥＬＩＳＡの最適化を示す。特異的ＰＴＭ（Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ）に対する１つの捕捉抗体は、（Ａ）抗Ｈ３－Ｃ末端抗体、（Ｂ）抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ抗体、および（Ｃ）捕捉のために使用される同じ抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を含む、様々な検出抗体と対を形成した。これら捕捉－検出の対を、ＥＬＩＳＡにおける修飾ｄＮｕｃの組み合わせ（Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ）および非修飾ｄＮｕｃに対して試験し、低いバックグラウンドおよび高い特異性を有する試薬を同定した。

【図４】図４Ａ～４Ｂは、組み換え型修飾ｄＮｕｃがヒトの血漿から確実に回収および定量化されることを示す。最適化されたサンドイッチＥＬＩＳＡは、基質を捕捉するために抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を使用し、次に、ビオチン化した抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ抗体とインキュベーションを行い、ストレプトアビジン－ＨＲＰを用いて検出を行った。（Ａ）Ｈ３Ｒ２

ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ ｄＮｕｃを、標準的なＥＬＩＳＡバッファーに添加して標準曲線を作成した。（Ｂ）Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ ｄＮｕｃを、健常なヒトの血漿の様々な希釈物に添加し、回収パーセントを、（Ａ）に示す標準曲線から内挿した。

【図５】図５Ａ～５Ｄは、ｄＮｕｃが、ヒト血漿における内在性の循環する修飾ヌクレオソームの濃度を推定することを示す。（Ａ、Ｃ）Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ ｄＮｕｃを使用して、線形回帰法（Ａ）および非線形回帰法（Ｃ）の両方を使用しヌクレオソームのシトルリン化を定量化するための標準曲線を作成した。（Ｂ、Ｄ）血中において高レベルのヌクレオソームのシトルリン化に関連する病態である、重篤および中等度の関節リウマチ（ＲＡ）と診断された患者由来の血漿、および健常な対照由来の血漿を希釈し、ＥＬＩＳＡにより解析した。（Ｂ）ヒト血漿サンプルの線形希釈（Ｌｉｎｅａｒ ｄｉｌｕｔｉｏｎ）は、線形の標準曲線（Ａ）と平行であり、内在性ヌクレオソームに適した参照としてのｄＮｕｃを確立する。（Ｄ）非線形標準曲線を使用した正規化は、広範囲の血漿希釈液に対して正確かつ一貫した回収を提供し、対照と中等度から重度のＲＡとの間において異なるレベルのヌクレオソームのシトルリン化を示している。図５Ａ～５Ｄの全ての画像に関して、ＥＬＩＳＡは、基質を捕捉するために抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を使用して、次に、ビオチン化抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ抗体とインキュベートし、ストレプトアビジン－ＨＲＰによる検出により、行った。

【発明を実施するための形態】

【００１９】

本発明を、以下でより詳細に説明する。この説明は、本発明が実施され得る全ての異なる方法または本発明に追加され得る全ての性質の詳細な目録ではないと意図される。たとえば、一実施形態に関して例示される特色を、他の実施形態に組み込んでもよく、特定の実施形態に関して例示される特色を、当該実施形態から削除してもよい。さらに、本明細書中示唆される様々な実施形態に対する多くの変形形態および追加は、本発明から逸脱することのない本開示の観点から当業者に明らかである。よって、以下の明細書は、本発明の一部の特定の実施形態を例示すると意図されており、その全ての順列、組み合わせ、およびバリエーション網羅的に明記するものではないと意図される。

【００２０】

文脈が他を示さない限り、本明細書中記載される発明の様々な特色は、任意の組み合わせで使用することができることが特に意図されている。さらに、本発明はまた、本発明の一部の実施形態において、本明細書中記載のいずれかの特色または特色の組み合わせを排除または除外することができることを企図している。例として、複合体が構成要素Ａ、Ｂ、およびＣを含むことを本明細書が述べている場合、Ａ、Ｂ、またはＣ、またはそれらの組み合わせのいずれかを、単独でまたは任意の組み合わせで、除外および放棄することができることが具体的に意図されている。

【００２１】

特に定義されていない限り、本明細書中使用される全ての科学技術用語は、本発明が属する分野の当業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本発明の説明で使用される専門用語は、単に特定の実施形態を説明する目的のためにあり、本発明を限定することを意図してはいない。

【００２２】

ヌクレオチド配列は、特に示していない限り、本明細書では一本鎖のみとして左から右への５’から３’方向で提示される。ヌクレオチドおよびアミノ酸は、連邦規則法典第３７巻§１．８２２および確立された使用法に従って、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎにより推奨される方法、または（アミノ酸に関しては）１文字表記もしくは３文字表記で、本明細書中表される。

【００２３】

特に示していなければ、組み換え型および合成のポリペプチド、抗体またはその抗原結合フラグメントの生成、核酸配列の操作、形質変換細胞の生成、ヌクレオソームの構築、

ならびに一過性かつ安定してトランスフェクトした細胞に関して、当業者に公知の標準的な方法が使用され得る。このような技術は、当業者に公知である。たとえば、ＳＡＭＢＲＯＯＫ ｅｔ ａｌ．，ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＣＬＯＮＩＮＧ：Ａ ＬＡＢＯＲＡＴＯＲＹ ＭＡＮＵＡＬ ２ｎｄ Ｅｄ．（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，ＮＹ，１９８９）；Ｆ．Ｍ．ＡＵＳＵＢＥＬ ｅｔ ａｌ．ＣＵＲＲＥＮＴ ＰＲＯＴＯＣＯＬＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ（Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ，Ｉｎｃ．ａｎｄ Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ）を参照されたい。

【００２４】

本明細書中言及される全ての刊行物、特許出願、特許、ヌクレオチド配列、アミノ酸配列、および他の参照文献は、その全体が参照により本明細書中に組み込まれている。

【００２５】

本発明の説明および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、文脈が他の意味を明らかに示していない限り、同様に複数形をも含むように意図されている。

【００２６】

本明細書中使用される場合、「および／または」は、関連する列挙される項目のうちの１つ以上の可能性のある全ての組み合わせ、ならびに代替例（「または」）で解釈される場合は組み合わせの欠如を表し、これらを包有する。

【００２７】

さらに本発明はまた、本発明の一部の実施形態において、本明細書中記載されるいずれかの特色または特色の組み合わせが排除または除外され得ることを企図している。

【００２８】

さらに、用語「約」は、本明細書中使用される場合、測定可能な値、たとえば本発明の化合物または作用物質の量、用量、時間、温度などを表す場合、指定された量の±１０％、±５％、±１％、±０．５％、またはさらには±０．１％の変動を包有することを意味する。

【００２９】

用語「～から本質的になる」は、核酸またはタンパク質と関連して本明細書中使用される場合、核酸またはタンパク質が、この核酸またはタンパク質の目的の機能を有意に（たとえば約１％超、５％超、または１０％超）変更する、記載されるエレメント以外のエレメントを全く含まないことを意味する。

【００３０】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、アミノ酸残基のポリマーを表すために本明細書中互換可能に使用される。すなわち、ポリペプチドを対象とする説明は、ペプチドの説明およびタンパク質の説明に対し同等に当てはまり、これは逆も同様である。これら用語は、天然に存在するアミノ酸のポリマー、および１つ以上のアミノ酸残基が非天然のアミノ酸であるアミノ酸ポリマーに当てはまる。本明細書中使用される場合、これら用語は、任意の長さのアミノ酸鎖を包有し、アミノ酸残基が共有結合性のペプチド結合および／またはシュードペプチド結合により結合している完全長のタンパク質を含む。

【００３１】

「核酸」または「ヌクレオチド配列」は、ヌクレオチド塩基の配列であり、ＲＮＡ、ＤＮＡ、またはＤＮＡ－ＲＮＡハイブリッド配列（天然に存在するヌクレオチドおよび天然に存在しないヌクレオチドの両方を含む）であり得るが、好ましくは、一本鎖または二本鎖のいずれかのＤＮＡ配列である。

【００３２】

本明細書中使用される場合、「単離された」核酸またはヌクレオチド配列（たとえば「単離されたＤＮＡ」または「単離された」ＲＮＡ）は、天然に存在する生物またはウイルスの他の構成要素、たとえば細胞もしくはウイルスの構造上の構成要素、または核酸また

はヌクレオチド配列に関連して一般に見出される他のポリペプチドもしくは核酸の少なくとも一部から分離されているかまたはこれを実質的に含まない核酸またはヌクレオチド配列を意味する。

【００３３】

同様に、「単離された」ポリペプチドは、天然に存在する生物またはウイルスの他の構成要素、たとえば細胞もしくはウイルスの構造上の構成要素、またはポリペプチドに会合した状態で一般に見出される他のポリペプチドもしくは核酸の少なくとも一部から分離されているかまたはこれを実質的に含まないポリペプチドを意味する。

【００３４】

特性を「実質的に保持する」は、この特性（たとえば活性または他の測定可能な特徴）の少なくとも約７５％、８５％、９０％、９５％、９７％、９８％、９９％、または１００％が保持されていることを意味する。

【００３５】

用語「エピトープ」は、アフィニティー試薬の結合を誘発できる生体分子上のいずれかの部位を表す。アフィニティー試薬は、生体分子もしくは生体分子フラグメントの直鎖状の配列、生体分子もしくは生体分子フラグメントの形状、生体分子もしくは生体分子フラグメントの化学－物理的特性、またはこれらの組み合わせを認識し得る。

【００３６】

「アミノ酸」は、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｎｏｍｅｎｃｌａｔｕｒｅ Ｃｏｍｍｉｓｓｉｏｎにより推奨される一般に知られている３文字表記または１文字表記のいずれかにより本明細書中で表され得る。タンパク質またはペプチドにおけるアミノ酸残基は、以下のように略される：フェニルアラニンはＰｈｅまたはＦであり；ロイシンはＬｅｕまたはＬであり；イソロイシンはＩｌｅまたはＩであり；メチオニンはＭｅｔまたはＭであり；バリンはＶａｌまたはＶであり；セリンはＳｅｒまたはＳであり；プロリンはＰｒｏまたはＰであり；スレオニンはＴｈｒまたはＴであり；アラニンはＡｌａまたはＡであり；チロシンはＴｙｒまたはＹであり；ヒスチジンはＨｉｓまたはＨであり；グルタミンはＧｌｎまたはＱであり；アスパラギンはＡｓｎまたはＮであり；リジンはＬｙｓまたはＫであり；アスパラギン酸はＡｓｐまたはＤであり；グルタミン酸はＧｌｕまたはＥであり；システインはＣｙｓまたはＣであり；トリプトファンはＴｒｐまたはＷであり；アルギニンはＡｒｇまたはＲであり；およびグリシンはＧｌｙまたはＧである。

【００３７】

用語「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様の方法で機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模倣体を表す。天然にコードされるアミノ酸は、２０の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）ならびにピロールリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸アナログは、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的な化学構造、すなわち水素、カルボキシル基、アミノ基、およびＲ基に結合している炭素を有する化合物、たとえばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、およびメチオニンメチルスルホニウムを表す。このようなアナログは、修飾されたＲ基（ノルロイシンなど）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。

【００３８】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされる配列における単一のアミノ酸またはアミノ酸のごく一部を変更、付加、または欠失する、核酸、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列に対する個別の置換、欠失、または付加が、変化によってアミノ酸の化学的に類似のアミノ酸への置換が起こる場合、「保存的に修飾されたバリアント」であることを認識している。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に公知である。このような保存的に修飾されたバリアントは、本明細書中記載される作用物質

の多形バリアント、種間のホモログ／オルソログ、およびアレルに加えて、これらを排除するものではない。

【００３９】

「抗原」は、本明細書中使用される場合、抗体によって認識されるか、またはそれに対する認識抗体（もしくはアプタマーもしくはパンニングしたファージなどの類似するアフィニティー試薬）を作製することができるいずれかの構造であり得る。特定の実施形態では、抗原は、単一のアミノ酸残基、または２つ以上の残基のアミノ酸フラグメントを含み得る。特定の実施形態では、抗原は、アミノ酸の修飾、たとえばアセチル化、メチル化（たとえば、モノ－、ジ－、トリ－、対称性－、非対称性）、リン酸化、ユビキチン化（たとえばモノ－、ジ－、トリ－、ポリ－）、ＳＵＭＯ化、ＡＤＰ－リボシル化、シトルリン化、ビオチン化、およびシス－トランス異性化などを含み得る。特定の実施形態では、抗原は、５－メチルシトシンなどのヌクレオチド修飾を含み得る。他の実施形態では、抗原は、点変異などの特定の変異を含み得る。さらなる他の実施形態では、抗原は、野生型のアミノ酸配列またはヌクレオチド配列を含み得る。

【００４０】

用語「翻訳後修飾」は、天然または非天然のアミノ酸に対して、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏでポリペプチド鎖に組み込まれた後に起こるかまたは起こり得る、当該アミノ酸のいずれかの修飾を表す。このような修飾として、限定するものではないが、アシル化（たとえばアセチル－、ブチリル－、クロトニル－）、メチル化（たとえばモノ－、ジ－、トリ－）、リン酸化、ユビキチン化（たとえばモノ－、ジ－、トリ－、ポリ－）、ＳＵＭＯ化、ＡＤＰ－リボシル化、シトルリン化、ビオチン化、およびシス－トランス異性化が挙げられる。このような修飾は、合成により、たとえばポリペプチド合成の間に化学的に導入されてもよく、またはポリペプチド合成もしくはポリペプチド精製の後に酵素的に導入されてもよい。

【００４１】

用語「転写後修飾」は、天然または非天然のヌクレオチドに対して、ｉｎ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｔｒｏでポリヌクレオチド鎖に組み込まれた後に起こるかまたは起こり得る、当該ヌクレオチドのいずれかの修飾を表す。このような修飾として、限定するものではないが、５－メチルシトシン（ｃｙｏｓｉｎｅ）、５－ヒドロキシメチルシトシン、５，６－ジヒドロウラシル、７－メチルグアノシン、キサントシン、およびイノシンが挙げられる。

【００４２】

本発明は、アッセイの定量化のための標準物質としてのヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾を包有する組み換え型／半合成ヌクレオソームの使用に関する。現在使用されている精製クロマチン抽出物とは異なり、本アッセイは、単一または組み合わせたヌクレオソーム修飾を正確に定量化するために完全に定義された組み換え型／半合成ヌクレオソームを利用する。好適には、本発明の方法は、ヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾の絶対的な定量化、すなわち、相対的な存在量ではなくて修飾分子数の検出、または相対的な存在量に加えて修飾分子数の検出を提供することができる。当技術分野で一般に使用される標準物質と同様に、修飾されたヌクレオソームは、アッセイの定量化のための標準曲線を作成するために、同じ実験でアッセイされる（サンプルに同一の処置を行う）。単一または組み合わせたヌクレオソームのＰＴＭの定量化は、現在使用されている相対的測定よりも良好な、疾患に関するバイオマーカーを提供し得る。一部の実施形態では、組み換え型ヌクレオソームは、修飾の組み合わせが単一のまたは隣接するヌクレオソーム上で検出されることを確認するための対照として使用され得る。

【００４３】

本明細書中使用される場合、組み換え型ヌクレオソーム（デザイナーヌクレオソーム（ｄＮｕｃ）とも呼ばれる）は、ヒストン（コアヒストンＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、およびＨ４、および任意選択でリンカーヒストンＨ１を含む）、ＤＮＡ、ならびに任意選択で他の要因を結合させてヌクレオソームを形成することにより調製されているものである。言い

換えると、組み換え型ヌクレオソームは、細胞またはクロマチンから単離されたものではなく、合成されたヌクレオソームである。ヌクレオソーム中の各ヒストンは、独立して、完全に合成によるか、半合成（たとえば組み換え技術により産生され、合成ペプチドにライゲートされる）によるか、または組み換え技術により産生され得る。ヌクレオソーム中の各ヒストンは、ヒストンバリアント（たとえばＨ３．３、Ｈ２Ａ．Ｂｂｄ、Ｈ２Ａ．Ｚ．１、Ｈ２Ａ．Ｚ．２、Ｈ２Ａ．Ｘ、ｍＨ２Ａ１．１、ｍＨ２Ａ１．２、ｍＨ２Ａ２、またはＴＨ２Ｂ）であり得る。用語組み換え型ヌクレオソームは、半合成ヌクレオソームおよび合成ヌクレオソームを包有する。

【００４４】

本発明の組み換え型ヌクレオソームは、いずれかの公知のクロマチンベースのイムノアッセイ（または類似のアフィニティー試薬に基づくイムノアッセイ）におけるスパイク・イン標準物質として使用され得る。

【００４５】

よって、本発明の一態様は、生物サンプルにおけるヌクレオソーム修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、

ａ．生物サンプルを単離するステップと、

ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、

ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、

ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、アフィニティー試薬を添加するステップと、

ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、

ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと

を含む、

方法に関する。

【００４６】

本発明の別の態様は、生物サンプルにおける単一のヌクレオソーム上の２つ以上の修飾（ヒストンまたはＤＮＡ）の存在量を定量化するための方法であって、

ａ．生物サンプルを単離するステップと、

ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．２つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、

ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、

ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、２つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、

ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、

ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含む、
方法に関する。
【００４７】
本発明のさらなる態様は、疾患または障害を有する対象由来の生物サンプルにおける１つ以上のヌクレオソーム修飾の存在量（ヒストンまたはＤＮＡ）を定量化するための方法であって、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡの修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含む、方法に関する。
【００４８】
本発明の各方法において、生物サンプルは、ヌクレオソームを単離できるいずれかのサンプルであり得る。生物サンプルは、たとえば、血液、血清、血漿、尿、唾液、精液、前立腺液、乳頭液、涙液、汗、糞便、口腔粘膜ぬぐい液、脳脊髄液、細胞ライセートサンプル、羊水液、消化器系体液、生検組織、リンパ液、または脳脊髄液であり得る。一部の実施形態では、生物サンプルは細胞を含み、クロマチンがこの細胞から単離される。一部の実施形態では、細胞は、１つ以上のヒストン翻訳後修飾および／またはＤＮＡ修飾の変化に関連する障害の疾患由来の細胞、たとえば疾患状態にある細胞である。一部の実施形態では、細胞は、ヒストンの変異に関連する疾患または障害を罹患している組織または臓器、たとえば疾患状態にある組織または臓器由来の細胞である。細胞は、限定するものではないが、生検、吸引、および外科手術を含む当該分野で公知のいずれかの手段により、疾患状態の臓器または組織から入手され得る。
【００４９】
他の実施形態では、細胞は、ヒストンの翻訳後修飾もしくはＤＮＡ修飾の変化に関連するかまたはヒストンの変異に関連する疾患または障害を罹患した組織または臓器由来の細胞ではない。細胞は、たとえば、疾患状態の細胞の代わりとしての役目を果たす細胞である。細胞は、疾患状態の細胞より容易に入手可能な細胞、たとえば、生検などの複雑なまたは痛みを伴う手段を必要とすることなく得ることができる細胞であり得る。適切な細胞の例として、限定するものではないが、末梢血単核細胞が挙げられる。
【００５０】
一部の実施形態では、生物サンプルは、生検である。他の実施形態では、生物サンプルは、生体液である。一部の実施形態では、生物サンプルは、末梢血単核細胞を含む。他の実施形態では、生物サンプルは、循環性ヌクレオソーム、たとえば死につつある細胞から

放出される循環性ヌクレオソームを含む。循環性ヌクレオソームは、たとえば、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害に由来する血液または細胞由来であり得る。特定の実施形態では、生物サンプルは、血漿、尿、唾液、糞便、リンパ液、または脳脊髄液である。一部の実施形態では、生物サンプルは、クロマチンをモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームに消化するために酵素で処理され得る。この酵素は、限定するものではないが、ヌクレアーゼ、たとえばミクロコッカスヌクレアーゼであり得る。

【００５１】

対象は、本発明の方法が望まれるいずれかの対象であり得る。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、たとえばヒトである。一部の実施形態では、対象は、実験動物、たとえばマウス、ラット、イヌ、またはサル、たとえば疾患の動物モデルである。特定の実施形態では、対象は、疾患または障害と診断されているかまたは疾患または障害を有することが疑われる対象であり得る。一部の実施形態では、対象は、たとえば遺伝学、家族の既往、毒素への曝露などにより、疾患または障害を発症するリスクがある対象であり得る。

【００５２】

本発明の方法で使用されるアフィニティー試薬（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ａｇｅｎｔ）は、標的エピトープに存在する目的のヒストンまたはＤＮＡ修飾を特異的に認識および結合するいずれかの作用物質であり得る。一部の実施形態では、アフィニティー試薬は、このエピトープに対する抗体または抗体フラグメントである。抗体またはそのフラグメントは、完全長のイムノグロブリン分子、Ｆａｂフラグメント、Ｆａｂ’フラグメント、Ｆ（ａｂ）’$_2$フラグメント、ｓｃＦｖフラグメント、Ｆｖフラグメント、ナノボディ、ＶＨＨ、または最小認識単位であり得る。アフィニティー試薬は、アプタマーまたは非イムノグロブリンスキャフォールド、たとえばアフィボディ、アフィリン分子、ＡｄＮｅｃｔｉｎ、リポカリンムテイン、ＤＡＲＰｉｎ、Ｋｎｏｔｔｉｎ、Ｋｕｎｉｔｚ型ドメイン、Ａｖｉｍｅｒ、Ｔｅｔｒａｎｅｃｔｉｎ、またはトランスボディであり得る。

【００５３】

一部の実施形態では、少なくとも１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化は、抗体ベースの検出アッセイにより検出される。抗体ベースの検出方法の例として、限定するものではないが、ＣｈＩＰ、ＥＬＩＳＡ、ＡｌｐｈａＬＩＳＡ、ＡｌｐｈａＳＣＲＥＥＮ、Ｌｕｍｉｎｅｘ、およびイムノブロッティングが挙げられる。一部の実施形態では、抗体ベースの検出アッセイは、基質の捕捉および検出のために２つの異なる抗体を使用する。一実施形態では、捕捉抗体および検出抗体は、それぞれ、（図３Ａに示されるように）ヒストンのＰＴＭおよび別のヌクレオソーム構造、たとえばＤＮＡまたは非修飾ヒストンに特異的に結合し得る。別の実施形態では、捕捉抗体および検出抗体は、それぞれ、（図３Ｂに示されるように）２つの異なるヒストンのＰＴＭに対する抗体である。一部の実施形態では、抗体ベースの検出アッセイは、（図３Ｃに示されるように）基質の捕捉および検出の両方に同じ抗体を使用する。

【００５４】

本発明の方法により定量化され得るヒストンまたはＤＮＡ修飾は、当該分野で公知であるかまたは将来同定される全ての修飾を含む。公知の翻訳後のアミノ酸の修飾として、限定するものではないが、セリンおよびアラニンのＮ－アセチル化；セリン、スレオニン、およびチロシンのリン酸化；リジンのＮ－クロトニル化、Ｎ－アシル化；リジンのＮ６－メチル化、Ｎ６，Ｎ６－ジメチル化、Ｎ６，Ｎ６，Ｎ６－トリメチル化；アルギニンのω－Ｎ－メチル化、対称性－ジメチル化、非対称性－ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化（ｕｂｉｑｕｉｔｉｎｙｌａｔｉｏｎ）；リジンのＳＵＭＯ化；セリンおよびスレオニンのＯ－メチル化、アルギニン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸のＡＤＰ－リボシル化；ならびに発がん性の変異（たとえばＨ３Ｋ４Ｍ、Ｈ３Ｋ９Ｍ、Ｈ３Ｋ２７Ｍ、Ｈ３Ｇ３４Ｒ、Ｈ３Ｇ３４Ｖ、Ｈ３Ｇ３４Ｗ、またはＨ３Ｋ３６Ｍ）が挙げられる。公知の転写後のＤＮＡ修飾として、限定するものではないが、５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシン、５－ホルミルシトシン、５－カルボキシルシトシン、３－メチルシトシン、５，６－ジヒドロウラシル、７－メチルグアノシン、キサ

ントシン、およびイノシンが挙げられる。
【００５５】
標的エピトープは、定量化および／またはモニタリングが望まれているコアヒストンまたはＤＮＡ上のいずれかのエピトープであり得る。一部の実施形態では、エピトープは、翻訳後修飾またはタンパク質のアイソフォームである。一部の実施形態では、コアヒストンのエピトープは、たとえばセリンおよびアラニンのＮ－アセチル化；セリン、スレオニン、およびチロシンのリン酸化；リジンのＮ－アシル化（たとえば、クロトニル化またはブチリル化）；リジンのＮ６－メチル化、Ｎ６，Ｎ６－ジメチル化、Ｎ６，Ｎ６，Ｎ６－トリメチル化；アルギニンのω－Ｎ－メチル化、対称性－ジメチル化、非対称性－ジメチル化；アルギニンのシトルリン化；リジンのユビキチン化（ｕｂｉｑｕｉｔｉｎｙｌａｔｉｏｎ）；リジンのＳＵＭＯ化；セリンおよびスレオニンのＯ－メチル化；セリン、スレオニン、またはチロシンのリン酸化；アルギニン、アスパラギン酸、およびグルタミン酸のＡＤＰ－リボシル化、ならびにそれらのいずれかの組み合わせからなる群から選択される、少なくとも１つの翻訳後アミノ酸修飾を含む。修飾は、単一または任意の組み合わせの、表１（ａ）～１（ｆ）に列挙される修飾のいずれかであり得る。
【００５６】
一部の実施形態では、エピトープは、コアヒストンの変異、たとえば疾患または障害に関連する変異である。一部の実施形態では、この変異は、発がん性変異、たとえば限定するものではないが、Ｈ３Ｋ４Ｍ、Ｈ３Ｋ９Ｍ、Ｈ３Ｋ２７Ｍ、Ｈ３Ｇ３４Ｒ、Ｈ３Ｇ３４Ｖ、Ｈ３Ｇ３４Ｗ、Ｈ３Ｋ３６Ｍ、およびそれらのいずれかの組み合わせを含む変異である。Ｈ３変異体は、Ｈ３のいずれかのバリアント骨格、たとえばＨ３．１、Ｈ３．２、またはＨ３．３に基づく変異体であり得る。
【００５７】
本発明のさらなる態様は、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化に基づきエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有する対象の予後を決定するための方法であって、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、
ｈ．１つ以上の標的エピトープの存在量に基づき対象の予後を決定するステップと
を含む、方法に関する。
【００５８】
ヌクレオソーム修飾の存在を検出および定量化する方法に関する上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。
【００５９】
一部の例では、エピトープのエピジェネティック状態は、エピジェネティック修飾に関

連する疾患または障害の予後を示している。よって、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有すると診断されているかまたは当該疾患または障害を有することが疑われる対象のエピトープのエピジェネティック状態の決定は、対象の予後の決定に有用であり得る。このような例の多くは、当該分野で公知である。１つの例として、限定するものではないが、前立腺腫瘍の再発の有意に高いリスクに関連するＨ３Ｋ１８アセチル化およびＨ３Ｋ４ジメチル化の増大、腫瘍のステージと相関するＨ４Ｋ１２アセチル化およびＨ４Ｒ３ジメチル化、ならびに腫瘍再発のリスクのある低グレード前立腺がん患者に関連するＨ３Ｋ９ジメチル化を含む、前立腺がんおよびヒストンＰＴＭである。別の例は、乳がん患者の全生存期間と、遺伝子ＣＲＥＢ５、ＥＸＰＨ５、ＺＮＦ７７５、ＡＤＣＹ３、およびＡＤＭＡ８におけるＣｐＧのメチル化状態との関連である。別の例は、グリオブラストーマ、ならびにＥＧＦＲ、ＰＴＥＮ、ＮＦ１、ＰＩＫ３Ｒ１、ＲＢ１、ＰＤＧＦＲＡ、およびＱＫＩのような遺伝子のイントロン領域の過剰メチル化状態である。さらなる例は、結腸癌の予後不良、ならびにＣＮＲＩＰ１、ＦＢＮ１、ＩＮＡ、ＭＡＬ、ＳＮＣＡ、およびＳＰＧ２０遺伝子のプロモーターのメチル化状態である。

【００６０】

本発明の別の態様は、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量化に基づきエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害のバイオマーカーを同定するための方法であって、

ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、

ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、

ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、

ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、

ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、

ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、

ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと、

ｈ．１つ以上の標的エピトープの存在量を、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害と相関させることにより、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害のバイオマーカーを同定するステップと

を含む、方法に関する。

【００６１】

ヌクレオソーム修飾の存在を検出および定量化する方法に関して上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。

【００６２】

この方法では、疾患状態の組織の生物サンプルは、疾患または障害を有する多くの患者から採取し、１つ以上のエピトープのエピジェネティック状態が決定され得る。次に、エピジェネティック状態と発症、ステージ、サブタイプ、予後診断などとの間の相関が、当該分野で周知の分析技術を使用して同定され得る。

【００６３】

本発明のさらなる態様は、対象の生物サンプルから１つ以上のヌクレオソーム修飾のエピジェネティック状態を修飾する作用物質をスクリーニングする方法であって、

方法が、作用物質の存在下および非存在下での１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量を

決定するステップを含み、１つ以上のヌクレオソーム修飾の定量を決定するステップが、
ａ．対象から生物サンプルを単離するステップと、
ｂ．生物サンプルから、標的エピトープにおける１つ以上のコアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾を含むヌクレオソームを含む、ネイティブモノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのライブラリーを調製するステップと、
ｃ．１つ以上のヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを保有するヌクレオソームを含む組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを調製するステップと、
ｄ．組み換え型ヌクレオソームのサンプルを、参照標準物質を作製するために様々な濃度で提供するステップと、
ｅ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照物質に、１つ以上のアフィニティー試薬を添加するステップと、
ｆ．ネイティブヌクレオソームライブラリーおよび組み換え型ヌクレオソーム参照標準物質におけるヌクレオソーム修飾量を測定するためにアフィニティー試薬ベースのアッセイを行うステップと、
ｇ．ネイティブヌクレオソームライブラリーにおける相対的存在量を参照標準物質と比較することにより、標的エピトープにおけるヌクレオソーム修飾の存在量を定量化するステップと
を含み、
作用物質の存在下および非存在下でのエピジェネティック状態の変化により、エピジェネティック状態を修飾する作用物質が同定される、
方法に関する。

【００６４】

ヌクレオソーム修飾の存在を検出および定量化する方法に関して上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。

【００６５】

スクリーニング方法は、エピジェネティック修飾を増大または減少させる作用物質を同定するために使用され得る。一部の実施形態では、検出される増大または減少は、統計学的に有意であり、たとえば少なくともｐ＜０．０５、たとえばｐ＜０．０１、０．００５、または０．００１である。他の実施形態では、検出される増大または減少は、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、１００％、またはそれ以上である。

【００６６】

目的の任意の化合物を、本発明に従ってスクリーニングすることができる。適切な試験化合物として、有機分子および無機分子が挙げられる。適切な有機分子として、限定するものではないが、小分子（約１０００ダルトン未満の化合物）、ポリペプチド（酵素、抗体、および抗体フラグメントを含む）、炭水化物、脂質、補酵素、および核酸分子（ＤＮＡ、ＲＮＡ、およびそれらのキメラおよびアナログを含む）、ならびにヌクレオチドおよびヌクレオチドアナログを挙げることができる。

【００６７】

さらに、本発明の方法は、可能性があるかまたは標的の調節因子のライブラリー、たとえば小分子のライブラリー、組み合わせられた化学化合物のライブラリー、ポリペプチドのライブラリー、ｃＤＮＡのライブラリー、アンチセンス核酸のライブラリー、ｓｉＲＮＡのライブラリーなど、またはポリペプチドおよび核酸アレイなどの化合物のアレイコレクションをスクリーニングするために行われ得る。

【００６８】

任意の適切なスクリーニングアッセイフォーマット、たとえばハイスループットスクリーニングが使用され得る。

【００６９】

また本方法は、クロマチンにおける特定のゲノムの遺伝子座のエピジェネティック状態

を修飾する作用物質として同定されている作用物質を特徴付けるために使用され得る。特徴付け、たとえば前臨床特徴付けは、たとえば、有効濃度の決定、有効な投与スケジュールの決定、ならびに薬物動態および薬力学の測定を含み得る。

【００７０】

本発明のさらなる態様は、本発明の方法を使用して、対象の生物サンプル由来のクロマチンにおける経時的なエピジェネティック状態の変化をモニタリングするための方法に関する。

【００７１】

ヌクレオソーム修飾の存在を検出および定量化する方法に関して上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。

【００７２】

本方法のステップは、エピジェネティック修飾の状態の変化をモニタリングするために必要に応じて何度も、たとえば２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２５、５０、または１００、またはそれ以上の回数で、繰り返され得る。本方法は、定期的なスケジュール（たとえば毎日、毎週、毎月、毎年）でまたは必要に応じて繰り返され得る。本方法は、たとえば、対象の治療的処置の前、間、および／もしくは後；対象の疾患もしくは障害の診断の後；対象の疾患もしくは障害の診断を決定する一部として；疾患もしくは障害の発症のリスクがあると対象を同定した後、またはエピジェネティック修飾もしくは変異の可能性のある変化をモニタリングすることが望ましい他のいずれかの状況で、繰り返され得る。

【００７３】

本発明のさらなる態様は、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有する対象のエピジェネティック療法の有効性をモニタリングするための方法であって、本発明の方法を使用して、前記対象の生物サンプル由来のクロマチンにおける経時的なエピジェネティック状態の変化をモニタリングするステップを含む、方法に関する。

【００７４】

ヌクレオソーム修飾の存在を検出および定量化する方法に関して上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。

【００７５】

エピジェネティック療法は、タンパク質（たとえばヒストン）またはＤＮＡのエピジェネティック状態を変化させるように設計された療法である。エピジェネティック療法の一例として、リジンデアセチラーゼ阻害剤（ヒストンデアセチラーゼ阻害剤とも称される）（たとえばボリノスタット（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）、ＣＩ－９９４（タセジナリン）、ＭＳ－２７５（エンチノスタット）、ＢＭＰ－２１０、Ｍ３４４、ＮＶＰ－ＬＡＱ８２４、ＬＢＨ－５２９（パノビノスタット）、ＭＧＣＤ０１０３（モセチノスタット）、ＰＸＤ１０１（ベリノスタット）、ＣＢＨＡ、ＰＣＩ－２４７８１、ＩＴＦ２３５７、バルプロ酸、トリコスタチンＡ、および酪酸ナトリウム）が挙げられ、これらは皮膚Ｔ細胞リンパ腫（ＣＴＣＬ）を処置するために使用されるか、または、肺がん、乳がん、膵臓がん、腎臓がん、および膀胱がん、メラノーマ、グリオブラストーマ、白血病、リンパ腫、および多発性骨髄腫を含む血液腫瘍および固形腫瘍の処置に関する臨床試験に使用される。エピジェネティック療法のさらなる例は、リジンアセチルトランスフェラーゼ阻害剤（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ阻害剤とも称される）（たとえばエピガロカテキン－３－ガラート、ガルシノール、アナカルジン酸、ＣＰＴＨ２、クルクミン、ＭＢ－３、ＭＧ１４９、Ｃ６４６、およびロミデプシン）である。エピジェネティック療法の別の例は、ＤＮＡメチルトランスフェラーゼ阻害剤（たとえばアザシチジン、デシタビン、ゼブラリン、コーヒー酸、クロロゲン酸、エピガロカテキン、ヒドララジン、プロカインアミド、プロカイン、およびＲＧ１０８）であり、これは、急性骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、および慢性骨髄単球性白血病の処置に関して、および固形腫瘍の処置に関する臨床試験において承認されている。他のエピジェネティック療法として、限定するものではないが、リジンメチルトランスフェラーゼ（たとえばピノメトスタット、タゼメト

スタット（ｔａｚｏｍｅｔｏｓｔａｔ）、ＣＰＩ－１２０５）；リジンデメチラーゼ（たとえばＯＲＹ１００１）；アルギニンメチルトランスフェラーゼ（たとえばＥＰＺ０２０４１１）；アルギニンデイミナーゼ（たとえばＧＳＫ４８４）；およびイソクエン酸デヒドロゲナーゼ（たとえばエナシデニブ、イボシデニブ）が挙げられる。それぞれ全体が本明細書中参照により組み込まれている、Ｆｉｓｃｈｌｅ ｅｔ ａｌ．，ＡＣＳ Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ．１１：６８９（２０１６）；ＤｅＷｏｓｋｉｎ ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖ．１２：６６１（２０１３）；Ｃａｍｐｂｅｌｌ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．１２４：６４（２０１４）；およびＢｒｏｗｎ ｅｔ ａｌ．，Ｆｕｔｕｒｅ Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．７：１９０１（２０１５）を参照されたい。

【００７６】

本方法のステップは、処置の有効性をモニタリングするために必要に応じて何度も、たとえば２、３、４、５、６、７、８、９、１０、２５、５０、または１００、またはそれ以上の回数、繰り返され得る。本方法は、定期的なスケジュール（たとえば毎日、毎週、毎月、毎年）でまたは必要に応じて、たとえば治療的処置が終了するまで、繰り返され得る。本方法は、たとえば、対象の治療的処置の前、間、および／または後、たとえば処置の各投与の後に、繰り返され得る。一部の実施形態では、処置は、本発明の方法が、この処置が有効であったことを示すまで続行される。

【００７７】

本発明の別の態様は、本発明の方法を使用して、対象の生物サンプル由来のクロマチンにおけるエピジェネティック状態に基づくエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有する対象に適切な処置を選択するための方法に関する。

【００７８】

ヌクレオソーム修飾または変異の存在を検出および定量化する方法に関して上述されている詳細は、同様にこの方法にも当てはまる。

【００７９】

本方法は、たとえばエピジェネティック修飾に関連する疾患または障害を有すると診断されているかまたは当該疾患または障害を有することが疑われる対象に、適用され得る。エピトープのエピジェネティック状態の決定は、エピトープの状態が修飾されていること、および修飾を正すためにエピジェネティック療法を対象に投与するべきであることを示し得る。逆に、エピトープの状態が修飾されていないとの決定は、エピジェネティック療法が有効であるとは予測されず、回避すべきであることを示すであろう。たとえば、特定のアセチル化ヒストン残基（Ｈ３Ｋ２７ａｃ）が脱アセチル化されているとの決定は、リジンデアセチラーゼ阻害剤による処置が適切であるということを示し得る。同様に、特定のメチル化ヒストン残基（Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３）が過剰メチル化されているとの決定は、リジンメチルトランスフェラーゼ阻害剤による処置が適切であることを示し得る。

【００８０】

本明細書中使用される場合、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害は、エピジェネティック修飾がこの疾患もしくは障害もしくはこの疾患もしくは障害の少なくとも１つの症状の原因であることがわかっているいずれかの疾患もしくは障害、またはエピジェネティック修飾がこの疾患もしくは障害のバイオマーカーである疾患もしくは障害である。本発明のいずれかの方法では、エピジェネティック修飾または変異に関連する疾患または障害は、がん、中枢神経系（ＣＮＳ）障害、自己免疫障害、炎症性障害、または感染性疾患であり得る。

【００８１】

がんは、いずれかの良性または悪性の細胞の異常な増殖であり、限定するものではないが、聴神経腫瘍、急性顆粒球白血病、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、腺癌、副腎癌、副腎皮質癌、肛門がん、未分化星状細胞腫、血管肉腫、基底細胞癌、胆管癌、膀胱がん、脳がん、乳がん、気管支原性肺癌、子宮頸癌、子宮頚部過形成、脊索腫、絨毛癌、慢性顆粒球性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸がん、結腸直腸がん、頭蓋咽頭腫、嚢状腺腫性肉腫、胚性がん腫、子宮内膜がん、内皮肉腫、上衣腫、上皮癌

、食道癌、本態性血小板増加症、ユーイング腫瘍、線維肉腫、尿生殖器癌、グリオブラストーマ、グリオーマ、膠肉腫、ヘアリーセル白血病、頭頸部がん、血管芽腫、肝細胞癌、ホジキン病、カポジ肉腫、平滑筋肉腫、白血病、脂肪肉腫、肺がん、リンパ管内皮肉腫（ｌｙｍｐｈａｇｉｏｅｎｄｏｔｈｅｌｉｏｓａｒｃｏｍａ）、リンパ管肉腫、リンパ腫、悪性カルチノイド細胞腫、悪性高カルシウム血症、悪性メラノーマ、悪性膵性インスリノーマ、マスト細胞腫、髄様癌（ｍｅｄｕｌｌａｒ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、髄芽腫、メラノーマ、髄膜腫、中皮腫、多発性骨髄腫、菌状息肉症、ミエローマ、粘液腫、粘液肉腫、ニューロブラストーマ、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、乏突起膠腫、骨原性肉腫、卵巣がん、膵がん、乳頭状腺癌、乳頭肉腫、松果体腫、真性多血症、原発性脳細胞腫、原発性マクログロブリン血症、前立腺がん、直腸がん、腎細胞癌、網膜芽細胞腫、横紋筋肉腫、皮脂腺肉腫、セミノーマ、皮膚がん、小細胞肺癌、軟部組織肉腫、扁平上皮癌、胃癌、汗腺癌、滑膜腫、精巣癌、咽頭がん、甲状腺癌、およびウィルムス腫瘍が挙げられる。

【００８２】

ＣＮＳ障害は、遺伝性障害、神経変性障害、精神障害、および腫瘍を含む。例示的なＣＮＳの疾患として、限定するものではないが、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、カナバン病、リー疾患、レフサム病、トゥレット症候群、原発性側索硬化症、筋萎縮性側索硬化症、進行性筋萎縮症、ピック病、筋ジストロフィー、多発性硬化症、重症筋無力症、ビンスワンガー病、脊椎または頭部の損傷による外傷、テイ・サックス病、レッシュ・ナイハン症候群（Ｌｅｓｃｈ－Ｎｙａｎ　ｄｉｓｅａｓｅ）、てんかん、脳梗塞、気分障害（たとえばうつ、双極性感情障害、遷延性感情障害、続発性気分障害、躁病、躁うつ病）、統合失調症、統合失調感情障害、統合失調症様障害、薬物依存（たとえばアルコール依存および他の物質の依存症）、ノイローゼ（たとえば不安、強迫性障害、身体表現性障害、解離性障害、悲嘆、分娩後うつ病）、精神病（たとえば幻覚および妄想、特定不能精神病、認知症、老化、妄想性障害、注意欠陥障害、精神性的障害、睡眠障害、疼痛性障害、摂食障害または体重障害（たとえば肥満、悪液質、神経性食欲不振症、および神経性大食症（ｂｕｌｅｍｉａ））を含む精神障害、網膜、後角、および視神経に関与する眼障害（たとえば網膜色素変性症、糖尿病性網膜症、および他の網膜変性疾患、ぶどう膜炎、加齢黄斑変性、緑内障）、ならびにＣＮＳのがんおよび腫瘍（たとえば下垂体腫瘍）が挙げられる。

【００８３】

自己免疫性および炎症性の疾患および障害として、限定するものではないが、心筋炎、心筋梗塞後症候群、心膜切開後症候群、亜急性細菌性心内膜炎、抗糸球体基底膜腎炎、間質性膀胱炎、ループス腎炎、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、アンチシンテターゼ症候群、副鼻腔炎、歯周炎、アテローム性動脈硬化、皮膚炎、アレルギー、アレルギー性鼻炎、アレルギー性気道炎症、慢性閉塞性肺疾患、好酸球性肺炎、好酸球性食道炎、好酸球増加症候群、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、結核、喘息、慢性消化性潰瘍、円形脱毛症、自己免疫性血管浮腫、自己免疫性プロゲステロン皮膚炎、自己免疫性蕁麻疹、水疱性類天疱瘡、瘢痕性類天疱瘡、疱疹状皮膚炎、円板状エリテマトーデス、後天性表皮水疱症、結節性紅斑、妊娠性類天疱瘡、化膿性汗腺炎、扁平苔癬、硬化性苔癬、線状ＩｇＡ病、モルフェア、尋常性天疱瘡、急性痘瘡状苔癬状粃糠疹、ムッハ・ハーベルマン病、乾癬、全身性強皮症、白斑、アジソン病、自己免疫性多内分泌腺症候群１型、自己免疫性多内分泌腺症候群２型、自己免疫性多内分泌腺症候群３型、自己免疫性膵炎、真性糖尿病１型、自己免疫性甲状腺炎、オルド甲状腺炎（Ｏｒｄ’ｓ　ｔｈｙｒｏｉｄｉｔｉｓ）、グレーブス病、自己免疫性卵巣炎、子宮内膜症、自己免疫性精巣炎、シェーグレン症候群、自己免疫性腸症、セリアック病、クローン病、過敏性腸症候群、憩室炎、顕微鏡的大腸炎、潰瘍性大腸炎、抗リン脂質抗体症候群、再生不良性貧血、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性リンパ増殖症候群、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性血小板減少性紫斑病、寒冷凝集素症、本態性混合型クリオグロブリン血症、エヴァンス症候群、悪性貧血、赤芽球癆、血小板減少症、有痛脂肪症、成人発症型スティル病、強直性脊椎炎、ＣＲＥＳＴ症候群、薬剤誘発性ループス、腱付着部炎関連関節炎、好酸球性筋膜炎、

フェルティ症候群、ＩｇＧ４関連疾患、若年性関節炎、ライム病（慢性）、混合性結合組織病、回帰性リウマチ、パリー・ロンバーグ症候群、パーソネージ・ターナー症候群、乾癬性関節炎、反応性関節炎、再発性多発軟骨炎、後腹膜線維症、リウマチ熱、関節リウマチ、サルコイドーシス、シュニッツラー症候群、全身性エリテマトーデス、未分化結合組織病、皮膚筋炎、線維筋痛症、筋炎、重症筋無力症、神経性筋強直症、傍腫瘍性小脳変性症、多発性筋炎、急性散在性脳脊髄炎、急性運動性軸索型ニューロパチー、抗Ｎメチル-－Ｄ－アスパラギン酸重要体脳炎、バロー同心円性硬化症、ビッカースタッフ脳炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、ギランバレー症候群、橋本脳症、突発性炎症性脱髄性疾患、ランバート・イートン筋無力症症候群、多発性硬化症、オシュトラン症候群（Ｏｓｈｔｏｒａｎ　ｓｙｎｄｒｏｍｅ）、連鎖球菌感染性小児自己免疫神経精神障害（ＰＡＮＤＡＳ）、進行性炎症性ニューロパチー、下肢静止不能症候群、全身硬直症候群、シデナム舞踏病、横断性脊髄炎、自己免疫性網膜症、自己免疫性ぶどう膜炎、コーガン症候群、グレーブス眼症、中間部ぶどう膜炎、木質性結膜炎、モーレン潰瘍、視神経脊髄炎、眼球クローヌス・ミオクローヌス症候群、視神経炎、強膜炎、スザック症候群、交感性眼炎、トロサ・ハント症候群、自己免疫性内耳疾患、メニエール病、ベーチェット病、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、巨細胞性動脈炎、多発血管炎性肉芽腫症、ＩｇＡ血管炎、川崎病、白血球破壊性血管炎、ループス血管炎、リウマチ性血管炎、顕微鏡的多発血管炎、結節性多発動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、蕁麻疹様血管炎、血管炎、および原発性免疫不全が挙げられる。

【００８４】

用語「感染性疾患」は、本明細書中使用される場合、感染性の作用物質による感染症に関連するいずれかの疾患を表す。感染性の作用物質の例として、限定するものではないが、ウイルスおよび微生物（たとえば細菌、寄生生物、原生動物、クリプトスポリジウム）が挙げられる。ウイルスとして、限定するものではないが、Ａ型肝炎ウイルス、Ｂ型肝炎ウイルス、Ｃ型肝炎ウイルス、Ｄ型肝炎ウイルス、Ｅ型肝炎ウイルス、Ｆ型肝炎ウイルス、Ｇ型肝炎ウイルスなどを含むヘパドナウイルス科；ヒトＣ型肝炎ウイルス（ＨＣＶ）、黄熱病ウイルスおよびデングウイルスを含むフラビウイルス科；ヒト免疫不全ウイルス（ＨＩＶ）およびヒトＴリンパ球向性ウイルス（ＨＴＬＶ１およびＨＴＬＶ２）を含むレトロウイルス科；単純ヘルペスウイルス（ＨＳＶ－１およびＨＳＶ－２）、エプスタイン・バーウイルス（ＥＢＶ）、サイトメガロウイルス、水痘帯状疱疹ウイルス（ＶＺＶ）、ヒトヘルペスウイルス６（ＨＨＶ－６）ヒトヘルペスウイルス８（ＨＨＶ－８）、およびヘルペスＢウイルスを含むヘルペスウイルス科；ヒトパピローマウイルスを含むパポバウイルス科；狂犬病ウイルスを含むラブドウイルス科；ＲＳウイルスを含むパラミクソウイルス科；ロタウイルスを含むレオウイルス科；ハンタウイルスを含むブニヤウイルス科；エボラウイルスを含むフィロウイルス科；アデノウイルス科；パルボウイルスＢ－１９を含むパルボウイルス科；ラッサウイルスを含むアレナウイルス科；インフルエンザウイルスを含むオルトミクソウイルス科；オーフウイルス、伝染性軟属腫ウイルス（ｍｏｌｌｕｓｃｕｍ　ｃｏｎｔａｇｅｏｓｕｍ　ｖｉｒｕｓ）、天然痘ウイルスおよびサル痘ウイルスを含むポックスウイルス科；ベネズエラウマ脳炎ウイルスを含むトガウイルス科；重症急性呼吸器症候群（ＳＡＲＳ）ウイルスなどのコロナウイルスを含むコロナウイルス科；ならびに、ポリオウイルスを含むピコルナウイルス科；ライノウイルス；オルビウイルス；ピコルナウイルス；脳心筋炎ウイルス（ＥＭＶ）；パラインフルエンザウイルス、アデノウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、ヒトパピローマウイルス、イヌジステンパーウイルス、伝染性イヌ肝炎ウイルス、ネコカリシウイルス、ネコ鼻腔気管炎ウイルス、ＴＧＥウイルス（ブタ）、口蹄疫ウイルス、シミアンウイルス５、ヒトパラインフルエンザウイルス２型、ヒトメタニューモウイルス、エンテロウイルス、ならびに、現在知られているかまたは後に同定される他のいずれかの病原性ウイルスが挙げられる（たとえば、病原性ウイルスの教示に関してその全内容が本明細書中参照により組み込まれている、Ｆｕｎｄａｍｅｎｔａｌ　Ｖｉｒｏｌｏｇｙ，　Ｆｉｅｌｄｓ　ｅｔ　ａｌ．，　Ｅｄｓ．，　３ｒｄ　ｅｄ．，　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ－Ｒａｖｅｎ

，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　１９９６を参照されたい）。
【００８５】
病原性微生物として、限定するものではないが、リケッチア、クラミジア、クラミドフィラ、マイコバクテリア、クロストリジウム、コリネバクテリウム、マイコプラズマ、ウレアプラズマ、レジオネラ、赤痢菌、サルモネラ、病原性大腸菌種、ボルデテラ（Ｂｏｒｄａｔｅｌｌａ）、ナイセリア、トレポネーマ、バチルス、ヘモフィルス、モラクセラ、ビブリオ、スタフィロコッカス種、ストレプトコッカス種、カンピロバクター種、ボレリア種、レプトスピラ種、エールリヒア種（Ｅｒｌｉｃｈｉａ　ｓｐｐ．）、クレブシエラ種、シュードモナス種、ヘリコバクター種、および現在知られているかまたは後に同定される他のいずれかの病原性微生物（たとえば、病原性微生物の教示に関してその全内容が本明細書中参照により組み込まれている、Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，　Ｄａｖｉｓ　ｅｔ　ａｌ，　Ｅｄｓ．，　４ｔｈ　ｅｄ．，　Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，　Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ，　１９９０を参照されたい）。微生物の具体的な例として、限定するものではないが、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）、クラミジア・ニューモニエ（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、クラミジア・トラコマチス（Ｃｈｌａｍｙｄｉａ　ｔｒａｃｈｏｍａｔｉｓ）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（Ｕｒｅａｐｌａｓｍａ　ｕｒｅａｌｙｔｉｃｕｍ）、マイコプラズマ・ニューモニエ（Ｍｙｃｏｐｌａｓｍａ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、スタフィロコッカス・アウレウス（Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｏｃｃｕｓ　ａｕｒｅｕｓ）、ストレプトコッカス・ピオゲネス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｙｏｇｅｎｅｓ）、ストレプトコッカス・ニューモニエ（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｐｎｅｕｍｏｎｉａｅ）、緑色レンサ球菌（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ　ｖｉｒｉｄａｎｓ）、エンテロコッカス・フェカリス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ　ｆａｅｃａｌｉｓ）、ナイセリア・メニンギティディス（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｍｅｎｉｎｇｉｔｉｄｉｓ）、ナイセリア・ゴノレア（Ｎｅｉｓｓｅｒｉａ　ｇｏｎｏｒｒｈｏｅａｅ）、梅毒トレポネーマ（Ｔｒｅｐｏｎｅｍａ　ｐａｌｌｉｄｕｍ）、バシラス・アンスラシス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ　ａｎｔｈｒａｃｉｓ）、サルモネラ・チフィ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉ）、ビブリオ・コレレ（Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａ）、ペスト菌（エルシニア・ペスチス（Ｙｅｒｓｉｎｉａ　ｐｅｓｔｉｓ））、シュードモナス・エルジノーサ（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ　ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ）、カンピロバクター・ジェジュニ（Ｃａｍｐｙｌｏｂａｃｔｅｒ　ｊｅｊｕｎｉ）、クロストリジウム・ディフィシル（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｄｉｆｆｉｃｉｌｅ）、クロストリジウム・ボツリヌム（Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｂｏｔｕｌｉｎｕｍ）、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｔｕｂｅｒｃｕｌｏｓｉｓ）、ボレリア・ブルグドルフェリ（Ｂｏｒｒｅｌｉａ　ｂｕｒｇｄｏｒｆｅｒｉ）、ヘモフィルス・デュクレイ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｄｕｃｒｅｙｉ）、コリネバクテリウム・ジフテリエ（Ｃｏｒｙｎｅｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ｄｉｐｈｔｈｅｒｉａ）、ボルデテラ・パータシス（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ　ｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、ボルデテラ・パラパータシス（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ　ｐａｒａｐｅｒｔｕｓｓｉｓ）、ボルデテラ・ブロンキセプチカ（Ｂｏｒｄｅｔｅｌｌａ　ｂｒｏｎｃｈｉｓｅｐｔｉｃａ）、ヘモフィルス・インフルエンザエ（Ｈａｅｍｏｐｈｉｌｕｓ　ｉｎｆｌｕｅｎｚａ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム（Ａｎａｐｌａｓｍａ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、腸管毒素原性大腸菌（ｅｎｔｅｒｏｔｏｘｉｃ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ）、およびビルハルツ住血吸虫が挙げられる。
【００８６】
本発明の別の態様は、コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープに関する検出試薬（抗体またはそのフラグメント、アプタマーなど）の特異性を決定する方法であって、コアヒストンおよび／またはＤＮＡ修飾標的エピトープを含む本発明の組み換え型モノヌクレオソームおよび／またはポリヌクレオソームのサンプルを使用するステップを含む、方法に関する。

【００８７】
一部の実施形態では、疾患または障害として、限定するものではないが、肥満、糖尿病、心疾患、自閉症、脆弱Ｘ症候群、ＡＴＲ－Ｘ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、ベックウィズ・ウィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、コフィン・ローリー症候群、免疫不全－セントロメア不安定性－顔貌異常症候群、αサラセミア、白血病、コルネリア・デランゲ症候群、歌舞伎症候群、進行性全身性硬化症、および心肥大が挙げられる。
【００８８】
一部の実施形態では、エピジェネティック修飾に関連する疾患または障害は、腎細胞癌、グリオーマ、膠肉腫、未分化星状細胞腫、髄芽腫、肺がん、小細胞肺癌、子宮頸癌、結腸がん、直腸がん、脊索腫、咽頭がん、カポジ肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、結腸直腸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、乳がん、膵がん、前立腺がん、腎細胞癌、肝臓癌、胆管癌、絨毛癌、セミノーマ、精巣腫瘍、ウィルムス腫瘍、ユーイング腫瘍、膀胱癌、血管肉腫、内皮肉腫、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉腫、乳頭肉腫、乳頭状腺癌、嚢状腺腫性肉腫、気管支原性肺癌、髄様癌（ｍｅｄｕｌｌａｒ　ｃａｒｃｉｎｏｍａ）、マスト細胞腫、中皮腫、滑膜腫、メラノーマ、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、ニューロブラストーマ、網膜芽細胞腫、グリオブラストーマ、乏突起膠腫、聴神経腫瘍、血管芽腫、髄膜腫、松果体腫、上衣腫、頭蓋咽頭腫、上皮癌、胚性がん腫、扁平上皮癌、基底細胞癌、線維肉腫、粘液腫、粘液肉腫、グリオーマ、脂肪肉腫、ヘリコバクター・ピロリ（Ｈｅｌｉｃｏｂａｃｔｅｒ　ｐｙｌｏｒｉ）、リステリア・モノサイトゲネス（Ｌｉｓｔｅｒｉａ　ｍｏｎｏｃｙｔｏｇｅｎｅｓ）、シゲラ・フレックスネリ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｆｌｅｘｎｅｒｉ）、アナプラズマ・ファゴサイトフィルム（Ａｎａｐｌａｓｍａ　ｐｈａｇｏｃｙｔｏｐｈｉｌｕｍ）、クラミドフィラ、エプスタイン・バーウイルス、ヘルペス、ＨＩＶ、ビルハルツ住血吸虫により引き起こされる感染症；肥満、糖尿病、心疾患；自閉症、脆弱Ｘ症候群、ＡＴＲ－Ｘ症候群、アンジェルマン症候群、プラダー・ウィリー症候群、ベックウィズ・ウィーデマン症候群、レット症候群、ルビンシュタイン・テイビ症候群、コフィン・ローリー症候群、免疫不全－セントロメア不安定性－顔貌異常症候群、αサラセミア、白血病、ハンチントン病、統合失調症、双極性疾患、老化、認知症、アルツハイマー病、パーキンソン病、コルネリア・デランゲ症候群、歌舞伎症候群、シェーグレン症候群、白斑、進行性全身性硬化症、乾癬、原発性胆汁性肝硬変、クローン病および潰瘍性大腸炎、橋本甲状腺炎、グレーブス病、炎症性腸疾患、アテローム性動脈硬化、ならびに心肥大からなる群から選択される。
【００８９】
本発明の別の態様は、本明細書中記載の方法のうちの１つを行うための試薬および試薬を含むキットを提供する。この試薬は、適切なパッケージまたは容器に含まれ得る。本キットは、エピトープの定量化のため、たとえば抗体ベースの検出アッセイにおけるエピトープの定量化のために、本明細書中記載される組み換え型ヌクレオソームを含む１つ以上の試薬を含み得る。また本キットは、本明細書中記載の少なくとも１つのアフィニティー試薬、たとえば抗体またはそのフラグメントもしくはバリアントを含み得る。
【００９０】
一部の実施形態では、組み換え型ヌクレオソームは、ヒストン、ヒストンアイソフォーム、ヒストン翻訳後修飾、またはヒストン変異と共に作製されたＤＮＡ－タンパク質複合体を含む。様々な実施形態では、当該分野で知られているコアヒストン配列のいずれかのバリアント、または表１（ａ）～１（ｆ）に定義されるものを含む翻訳後修飾を、ヒストン８量体を含むヒストン上に配置することができる。一実施形態では、組み換え型ヌクレオソームのセットが提供される。
【００９１】
他の実施形態では、本キットは、パッケージまたは容器の中に１つ以上の洗浄バッファー（たとえばリン酸緩衝生理食塩水）および／または他のバッファーを含み得る。また本キットは、捕捉した標準物質またはサンプルの量の測定に必要な試薬を含み得る。

【００９２】
キットを供給する場合、異なる構成要素は、別々の容器にパッケージングされ、使用の直前に混合され得る。このような構成要素のパッケージングは、別々に、有効な構成要素の機能を失うことなく長期間の保存を可能にし得る。またキットは、説明材料と共に供給され得る。説明書は、紙もしくは他の物質の上に印刷されていてもよく、かつ／または電子可読媒体として供給されてもよい。
【００９３】
一部の実施形態では、本キットは、たとえば単一のヒストンまたは複数のヒストンの、たとえばリジンのメチル化、リジンのアシル化、またはアルギニンのメチル化といった、特定のクラスのＰＴＭの異なる可能性のうちの一部または全てを表す標準物質のパネルを含み得る。このパネルは、１つ以上の疾患に関連すると考えられる修飾の一部または全てを含み得る。一部の実施形態では、本キットは、たとえば単一のヒストンまたは複数のヒストンの、たとえば発がん性ヒストン変異といったヒストン変異の異なる可能性のうちの大部分または全てを表す標準物質のセットを含み得る。このパネルは、アフィニティー試薬の特異性を評価するため、技術的変動をモニタリングするため、および実験を正規化するために使用され得る。
【００９４】
本発明を説明してきたが、同じ内容を、単なる例としての目的のために本発明に含まれており、本発明を限定する意図のない以下の実施例において説明する。
【実施例】
【００９５】
実施例１：修飾組み換え型デザイナーヌクレオソーム（ｄＮｕｃ）の合成および定性的バリデーション
組み換え型ｄＮｕｃは、十分に定義されており内在性抗体標的を模倣することから、理想的なＥＬＩＳＡ標準物質である。図１Ａ～Ｃは、ｄＮｕｃアセンブリに関する代表的な定性的計量を示している。この実施例では、Ｈ３Ｒ２／Ｒ８／Ｒ１７トリシトルリン化ヒストン（Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ）を、公開されている方法（Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈｅｍｂｉｏｃｈｅｍ １５（１４）：２０７１（２０１４））に基づくネイティブ化学的ライゲーションの手法を使用して作製した。得られた修飾ヒストンは、分析用ＨＰＬＣにより、９５％超の純度であり、高分解能質量分析による予測質量の１ダルトン以内であった（図１Ａ）。シトルリン化ｄＮｕｃを作製するために、非修飾ヒストンＨ３サブユニットを、８量体の組み立ての間にＨ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔヒストンに置換した。予想されるように、得られたｄＮｕｃは、抗シトルリン化ヒストン（Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ）抗体と免疫反応性であり（図１Ｂ；上部）、等しいヒストンの化学両論比を示し（図１Ｂ；底部）、検出可能な遊離ＤＮＡを示さなかった（図１Ｃ）。これらデータは、ｄＮｕｃが、高度に純粋であり、これによりそれらはヒストンＰＴＭの定量化を目的とするＥＬＩＳＡの非常に優れた標準物質となることを示している。
【００９６】
実施例２：ヌクレオソームは、ヒト血漿において予測値で回収され、信頼できる較正を提供する。
セルフリーヌクレオソーム（ＣＦＮ）解析の近年の進歩により、非侵襲性のクロマチン標的化液体生検は可能性がある現実となった（Ｈｏｌｄｅｎｒｉｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｉｎｔ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ ９５（２）：１１４（２００１）；Ｈｏｌｄｅｎｒｉｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ａｎｎ．ＮＹ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１１３７：１８０（２００８）；Ｒｕｍｏｒｅ ｅｔ ａｌ．，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８６（１）：６９（１９９０）；Ｈｏｌｄｅｎｒｉｅｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．５１（８）：１５４４（２００５））。しかしながら、既存のヌクレオソームＰＴＭの定量化のアッセイは、通常、アッセイ標準物質として修飾ヒストンサブユニットを使用する。これらは、ネイティブクロマチンの結合特徴を再現することができず、よっ

て、アッセイ内対照として使用する場合相対的測定を提供することができるに過ぎない。さらに、ヒストンは血漿／血清中で不安定であるため、液体生検におけるその有用性が限定されていることから、ヌクレオソームＰＴＭのアッセイおよびバイオマーカーの開発は急速に新たな中心となりつつある。

【００９７】

図２Ａ～２Ｂでは、健常なヒト血漿の中に添加されたシトルリン化ｄＮｕｃおよびヒストンＨ３サブユニットの回収を比較した。このために、標準的なサンドイッチＥＬＩＳＡを、ヒストンシトルリン化を測定するために開発した：抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ抗体を、捕捉基質に対し使用し、Ｈ３の非修飾Ｃ末端に特有のＨＲＰコンジュゲート抗体によって検出を行った。図２Ａでは、Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔヒストンまたはｄＮｕｃを、５％のヒト血漿の中に１，０００倍の範囲（１ｎＭ～１μＭ）で添加した。ＥＬＩＳＡシグナルは、シトルリン化ヒストンＨ３を含む血漿において定量化した際に、ｄＮｕｃと比較して劇的に低減することに留意されたい。これら結果は、１）血漿中に添加したシトルリン化ｄＮｕｃの一次回収、および２）シトルリン化Ｈ３と比較して血漿中のシトルリン化ｄＮｕｃの検出の感受性の増大（すなわち幅広い範囲の分析物の検出）を示している。

【００９８】

信頼性のある検量体は、アッセイマトリックス（たとえば血漿または細胞のライセート）において安定している。観察されるヒストンシグナルの喪失が異常な凝集または血漿タンパク質との相互作用によるものであるかどうかを決定するために、Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔヒストンまたはｄＮｕｃ基質を、１００％の血漿に添加し、次にサンプルを５％血漿に希釈し、Ｈ３シトルリン化を定量化した（図２Ｂ）。サンプルを、５％血漿で調製した標準物質に対して正規化した（図２Ａ）。注目すべきことに、シトルリン化ｄＮｕｃは、予測値で容易に回収された（図２Ｂ）。しかしながら、シトルリン化ヒストンＨ３は、５％と比較して１００％血漿に添加した際に有意に低かった（すなわち検出可能でなかった）。これらデータは、シトルリン化ｄＮｕｃ（ヒストンＨ３ではない）のみが、血漿サンプルにおいて確実な較正を提供することを証明している。さらにこの結果は、患者の血漿に直接由来するヒストンＰＴＭの正確な定量化を可能にする次世代の液体生検アッセイにとって信頼できる標準物質としてのｄＮｕｃの開発を支持する。

【００９９】

実施例３：組み合わせた修飾ｄＮｕｃを使用したヌクレオソームＰＴＭに対するＥＬＩＳＡの最適化

ｄＮｕｃは、内在性ヌクレオソームに対する構造的アナログであり、同様の結合の特徴を呈するため（Ｓｈａｈ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ ７２（１）：１６２（２０１８）、感受性および特異性の高いヒストンＰＴＭ検出アッセイを設計するために使用され得ることが推論された。よって、Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ ｄＮｕｃを、ヌクレオソームのシトルリン化の検出に関するＥＬＩＳＡの開発に適用した。最初に、ｄＮｕｃを使用して、オフターゲットＰＴＭ結合活性が低く非常に特異的な抗体を同定した。次に、ｄＮｕｃを、様々な捕捉抗体および検出抗体の対を使用して、ＥＬＩＳＡの開発のための高度に精製された基質として適用した。図３Ａ～３Ｃに記載される３つ全ての例は、３種類の異なるビオチン化検出抗体：１）ヒストンＨ３の非修飾部分に対する抗体（図３Ａ）；２）別の共存するＰＴＭ、Ｈ３Ｒ２ｃｉｔを認識する抗体（図３Ｂ）；および３）ｄＮｕｃの捕捉のために使用される同じ抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体と対にしてＰＴＭ特異的（抗－Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ）捕捉抗体を使用した。ＥＬＩＳＡシグナルは、ストレプトアビジンコンジュゲートＨＲＰ（ＳＡ－ＨＲＰ）を使用して作製した。示される３つ全ての実験で、非修飾ｄＮｕｃを、バックグラウンドシグナルをモニタリングするための陰性対照として含めた。

【０１００】

驚くべきことに、感受性が最も高く、最小のバックグラウンドを伴うアッセイは、捕捉および検出の両方に同じ抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を使用した（図３Ｃ、底部）。異なるＰＴ

Ｍを標的化すること（図３Ｂ）は、類似の特異性を有していたが、非修飾Ｎｕｃ対照においてバックグラウンドのわずかな上昇を示した。これら実験は、抗体が同じヌクレオソーム上の複数のＰＴＭ（たとえばＨ３Ｒ８Ｃｉｔ／Ｈ３Ｒ２ＣｉｔまたはＨ３Ｒ８ｃｉｔ／Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ）に結合する顕著な能力を証明しており、これによって、今後の研究において共存するＰＴＭの定量化が可能となり得る。注目すべきことに、ヌクレオソームにおいて各ヒストンサブユニット（たとえばＨ２Ａ、Ｈ２Ｂ、Ｈ３、およびＨ４）は２コピー物存在する。よって、Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ／Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ　ＥＬＩＳＡの組み合わせが、シスまたはトランスでこれらヒストンＰＴＭを検出しているかどうかは依然として明らかではない。これらの可能性がある作用機構を決定するためには、非対称的に修飾を保有するヌクレオソーム（すなわちヒストンサブユニットのうち１つのみが修飾されている）の開発が必要とされる。

【０１０１】

抗ヒストンＨ３抗体での検出（図３Ａ、底部）は、ＰＴＭ抗体による検出と比較して感受性の実質的な低減を示した。特に、この種類の捕捉／検出の設定は、ヒストンＰＴＭのＥＬＩＳＡ（ヒストンベースの基質または標準物質を使用する）にとって慣習となっている産業上の手法であり、ヌクレオソーム構造を利用することによりアッセイの特異性および感受性において有意な進歩が存在することを示唆している。実際に、ヌクレオソームＰＴＭを測定する既存のアッセイは、標的分析物の内因性レベルが未知である精製ヒストン抽出物またはヒト血漿を使用して開発されている。図３Ａ～３Ｃに示されるように、高度精製ｄＮｕｃの生成によって、ＥＬＩＳＡにとって最も感受性が高く特異的な抗体対を経験的に決定でき、前例のない正確さおよび精度でアッセイを実現することが可能である。さらに、ｄＮｕｃシグナルの一次回収は、ヌクレオソームＰＴＭ特異的アッセイのキャリブレーターとしてｄＮｕｃの開発の継続を支持する。

【０１０２】

実施例４：ｄＮｕｃは、ヒト血漿から確実に回収され、定量化される。

臨床アッセイにおけるキャリブレーターとしてのｄＮｕｃの有用性は、血漿などの生体マトリックスから正確に回収される能力に依存している。よって、図３Ａ～３Ｃ由来の最適化されたサンドイッチＥＬＩＳＡのうちの１つを、基質捕捉のための抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を使用し、次にビオチン化抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ抗体およびストレプトアビジン－ＨＲＰによって検出することにより、使用した。最初に標準曲線を、ＥＬＩＳＡバッファーにおいて６点濃度範囲で添加したＨ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ　ｄＮｕｃを使用して作成した（図４Ａ）。この標準曲線は、R^2＝０．９８で、ＥＬＩＳＡバッファーにおけるｄＮｕｃの一定した一次回収を示している。並行した実験では、Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ　ｄＮｕｃ（５０ｎｇ／ｍＬ）を、健常なヒト血漿の様々な希釈物に添加し、パーセント回収を、標準曲線から内挿した（図４Ｂ）。これら結果は、血漿で２倍～３２倍希釈した場合にｄＮｕｃシグナルの９５％超の回収を証明し、アッセイマトリックスによる干渉が最小限であることを示しており、ｄＮｕｃが、幅広い血漿希釈物にわたり、高度に安定しており、信頼できる定量的な標準物質を提供することを示唆している。

【０１０３】

実施例５：ｄＮｕｃは、ヒト血漿における内在性循環性の修飾ヌクレオソームの濃度を推定する。

アッセイキャリブレーターとしてｄＮｕｃを完全に適用するためには、これらが内在性ヌクレオソームと類似の挙動（すなわち、結合および検出特徴）を示すことが必要である。この目的のため、血漿を、中程度および重篤な関節リウマチ（ＲＡ）の症状（ＤＡＳ２８スコアに基づく（Ｐｒｅｖｏｏ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ　Ｒｈｅｕｍ．　３８（１）：４４　（１９９５））を有する患者から回収した。ＲＡ患者は、高レベルのヌクレオソームシトルリン化を有し（Ｐｒａｔｅｓｉ　ｅｔ　ａｌ．，　Ａｎｎ．　Ｒｈｅｕｍ．　Ｄｉｓ．　７３（７）：１４１４　（２０１４）；　Ｄｗｉｖｅｄｉ　ｅｔ　ａｌ．，　ＦＡＳＥＢ　Ｊ．　２８（７）：２８４０　（２０１４）；　Ｓｏｈｎ　ｅｔ　ａｌ．

，Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｒｈｅｕｍａｔｏｌ．６７（１１）：２８７７（２０１５））、このため、この概念実証試験の理想的な候補である。ＲＡ患者（年齢および性別が一致した健常な対照と共に）由来の血漿を、２倍～１２８倍に希釈し、ＥＬＩＳＡで解析した（図５Ｂ、５Ｄ）。この試験では、ヌクレオソームシトルリン化の検出のためＥＬＩＳＡを、ヌクレオソーム捕捉のために抗Ｈ３Ｒ８ｃｉｔ抗体を使用し、検出のためにビオチン化抗Ｈ３Ｒ２ｃｉｔ抗体およびストレプトアビジン－ＨＲＰを使用して、利用した。標準曲線を、ＥＬＩＳＡバッファーにおいて６点濃度範囲で添加したＨ３Ｒ２ｃｉｔ／Ｒ８ｃｉｔ／Ｒ１７ｃｉｔ ｄＮｕｃを使用して作成し、線形回帰法（図５Ａ）および非線形回帰法（図５Ｃ）を使用して解析した。ここで（図５Ｂ、図５Ｄ）、本出願人らの進行中の試験由来の各カテゴリー（健常、中程度のＲＡ、および重篤なＲＡ）の１名の患者の平均値を示す。

【０１０４】

図５Ｂに示されるように、ヒト血漿サンプルの希釈物は、図５Ａの標準曲線のものと同様の線形曲線をもたらした。これらデータにより、この標準曲線が、サンプル－希釈物の曲線を正確に表していることが確認され、内在性物質を定量化するために選択したキャリブレーターの使用を検証した。ＥＬＩＳＡデータをまた、非線形曲線を使用して正規化すると（図５Ｃ、５Ｄ）、幅広い範囲の血漿希釈物を通して一貫した回収を提供した。さらに、これら分析物は、対照と中程度から重度ＲＡとの間でのヌクレオソームシトルリン化のレベルの変更を示しており、臨床に関連するアッセイでの定量化のための標準物質としてのｄＮｕｃの導入を支持する。

【０１０５】

上記は、本発明の例であり、その限定と解釈すべきではない。本発明は、以下の特許請求の範囲、およびその中に含まれる均等物により定義される。

【０１０６】

【表１】

表１（ａ）ヒトのヒストンＨ２Ａ　１／２／３型、Ｈ２Ａ．Ｘ、Ｈ２Ａ．Ｚ、およびＨ２Ａ．Ｖ　アイソフォーム１／２／３／４／５の翻訳後修飾

位置	修飾の種類の説明
ヒトヒストン H2a 1/2/3型	
1	N-アセチルセリン
1	ホスホセリン
3	シトルリン
5	N6-アセチルリジン
36	N6-クロトニル-L-リジン
118	N6-クロトニル-L-リジン
119	N6-クロトニル-L-リジン
120	ホスホスレオニン
126	N6-クロトニル-L-リジン
13	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
15	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
119	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
ヒトヒストン H2A.X	
1	N-アセチルセリン
1	ホスホセリン
36	N6-アセチルリジン
119	ホスホセリン
142	ホスホチロシン
13	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
15	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
119	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
ヒトヒストン H2A.Z	
1	N-アセチルアラニン
4	N6-アセチルリジン
7	N6-アセチルリジン
11	N6-アセチルリジン
13	N6-アセチルリジン
121	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
ヒトヒストン H2A.V アイソフォーム1/2/3/4/5	
4	N6-アセチルリジン
7	N6-アセチルリジン
11	N6-アセチルリジン
121	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)

【表２】

表１（ｂ）：ヒトヒストンＨ２Ａ．ＪおよびＨ２Ｂ１型の翻訳後修飾

位置	修飾の種類の説明
ヒトヒストン H2A.J	
1	N-アセチルセリン
1	ホスホセリン
5	N6-アセチルリジン
120	ホスホスレオニン
122	ホスホセリン
13	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
15	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
119	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
ヒトヒストン H2B 1型	
1	N-アセチルプロリン
6	N6-アセチルリジン
6	N6-クロトニル-L-リジン
12	N6-アセチルリジン
12	N6-クロトニル-L-リジン
13	N6-アセチルリジン
13	N6-クロトニル-L-リジン
16	N6-アセチルリジン
16	N6-クロトニル-L-リジン
17	N6-アセチルリジン
17	N6-クロトニル-L-リジン
21	N6-アセチルリジン
21	N6-クロトニル-L-リジン
24	N6-アセチルリジン
24	N6-クロトニル-L-リジン
35	N6-クロトニル-L-リジン
37	ホスホセリン
47	N6-メチルリジン
58	N6,N6-ジメチルリジン
80	ジメチル化 アルギニン
85	ホスホセリン
86	N6,N6,N6-トリメチルリジン
86	N6-アセチルリジン
87	Ω-N-メチルアルギニン
93	Ω-N-メチルアルギニン
109	N6-メチルリジン
116	ホスホスレオニン
117	N6-メチル化 リジン

35	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
121	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)

【表３】

表１（ｃ）ヒトヒストンＨ２Ｂ　　２／３／Ｆ－Ｓ型の翻訳後修飾

位置	修飾の種類の説明
1	N-アセチルプロリン
5	N6-アセチルリジン
5	N6-クロトニル-L-リジン
11	N6-アセチルリジン
11	N6-クロトニル-L-リジン
12	N6-アセチルリジン
12	N6-クロトニル-L-リジン
14	ホスホセリン
15	N6-アセチルリジン
15	N6-クロトニル-L-リジン
16	N6-アセチルリジン
16	N6-クロトニル-L-リジン
20	N6-アセチルリジン
20	N6-クロトニル-L-リジン
23	N6-アセチルリジン
23	N6-クロトニル-L-リジン
34	N6-クロトニル-L-リジン
36	ホスホセリン
46	N6-メチルリジン
57	N6,N6-ジメチルリジン
79	ジメチル化 アルギニン
85	N6,N6,N6-トリメチルリジン
85	N6-アセチルリジン
86	Ω-N-メチルアルギニン
92	Ω-N-メチルアルギニン
108	N6-メチルリジン
115	ホスホスレオニン
116	N6-メチル化 リジン
112	O-結合(GlcNAc)
34	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)
121	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)

【表４】

表１（ｄ）：ヒト推定ヒストンＨ２Ｂ　２－Ｄ／２－Ｃ型の翻訳後修飾

位置	修飾の種類の説明
1	N-アセチルプロリン
5	N6-アセチルリジン
5	N6-クロトニル-L-リジン
11	N6-アセチルリジン
11	N6-クロトニル-L-リジン
12	N6-アセチルリジン
12	N6-クロトニル-L-リジン
14	ホスホセリン
15	N6-アセチルリジン
15	N6-クロトニル-L-リジン
16	N6-アセチルリジン
16	N6-クロトニル-L-リジン
20	N6-アセチルリジン
20	N6-クロトニル-L-リジン
23	N6-アセチルリジン
23	N6-クロトニル-L-リジン
34	N6-クロトニル-L-リジン
36	ホスホセリン
46	N6-メチルリジン
57	N6,N6-ジメチルリジン
79	ジメチル化 アルギニン
85	N6,N6,N6-トリメチルリジン
85	N6-アセチルリジン
86	Ω-N-メチルアルギニン
92	Ω-N-メチルアルギニン

【表５】

表１（ｅ）：ヒトヒストンＨ３．１／Ｈ３．１ｔ／Ｈ３．２／Ｈ３．３／Ｈ３．３Ｃの翻訳後修飾

位置	修飾の種類
2	非対称性 ジメチルアルギニン
3	ホスホスレオニン
4	アリシン
4	N6,N6,N6-トリメチルリジン
4	N6,N6-ジメチルリジン
4	N6-アセチルリジン
4	N6-クロトニル-L-リジン
4	N6-メチルリジン
6	ホスホスレオニン
8	シトルリン
8	対称性ジメチルアルギニン
9	N6,N6,N6-トリメチルリジン
9	N6,N6-ジメチルリジン
9	N6-アセチルリジン
9	N6-クロトニル-L-リジン
9	N6-メチルリジン
10	ホスホセリン
11	ホスホスレオニン
14	N6-アセチルリジン
17	非対称性ジメチルアルギニン
17	シトルリン
18	N6-アセチルリジン
18	N6-クロトニル-L-リジン
18	N6-メチルリジン
23	N6-アセチルリジン
23	N6-クロトニル-L-リジン
23	N6-メチルリジン
27	N6,N6,N6-トリメチルリジン
27	N6,N6-ジメチルリジン
27	N6-アセチルリジン
27	N6-クロトニル-L-リジン
27	N6-メチルリジン
28	ホスホセリン
36	N6,N6,N6-トリメチルリジン
36	N6,N6-ジメチルリジン
36	N6-アセチルリジン
36	N6-メチルリジン
37	N6-メチルリジン
41	ホスホチロシン
56	N6,N6,N6-トリメチルリジン
56	N6-アセチルリジン
56	N6-クロトニル-L-リジン
56	N6-メチルリジン

57	ホスホセリン
64	N6-メチルリジン
79	N6,N6,N6-トリメチルリジン
79	N6,N6-ジメチルリジン
79	N6-アセチルリジン
79	N6-メチルリジン
80	ホスホスレオニン
107	ホスホスレオニン
115	N6-アセチルリジン
122	N6-アセチルリジン
122	N6-メチルリジン

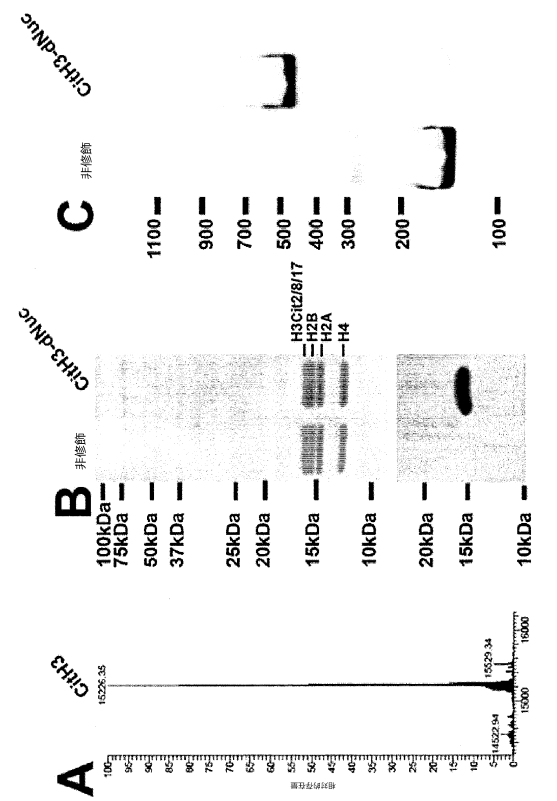
【表６】

表１（ｆ）ヒトヒストンＨ３様のセントロメアタンパク質Ａおよびヒトヒストン
Ｈ４の翻訳後修飾

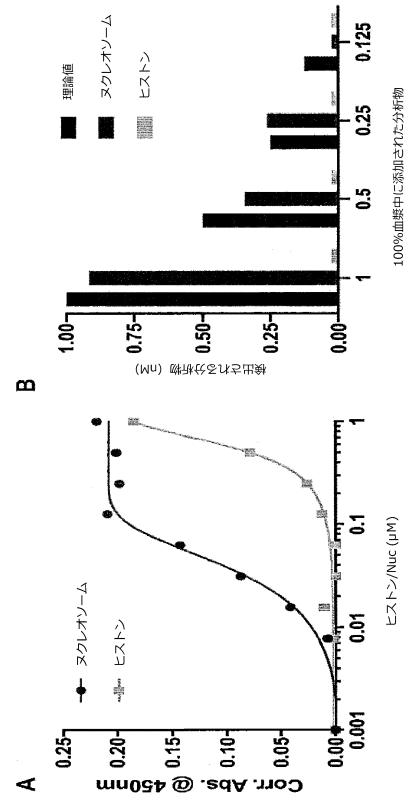
位置	修飾の種類の説明
ヒトヒストン H3-様セントロメアタンパク質A	
6	ホスホセリン; AURKAおよびAURKBによる
16	ホスホセリン
18	ホスホセリン
26	ホスホセリン
ヒトヒストン H4	
1	N-アセチルセリン
1	ホスホセリン
3	非対称性 ジメチルアルギニン
3	シトルリン
3	Ω-N-メチルアルギニン
3	対称性ジメチルアルギニン
5	N6-アセチルリジン
5	N6-クロトニル-L-リジン
8	N6-アセチルリジン
8	N6-クロトニル-L-リジン
12	N6-アセチルリジン
12	N6-クロトニル-L-リジン
16	N6-アセチルリジン
16	N6-クロトニル-L-リジン
20	N6,N6,N6-トリメチルリジン
20	N6,N6-ジメチルリジン
20	N6-メチルリジン
31	N6-アセチルリジン
47	ホスホセリン
51	ホスホチロシン
88	ホスホチロシン
91	N6-アセチルリジン
91	グリシル リジン イソペプチド (Lys-Gly) (ユビキチンにおけるG-Cterとの鎖間)

【図面】

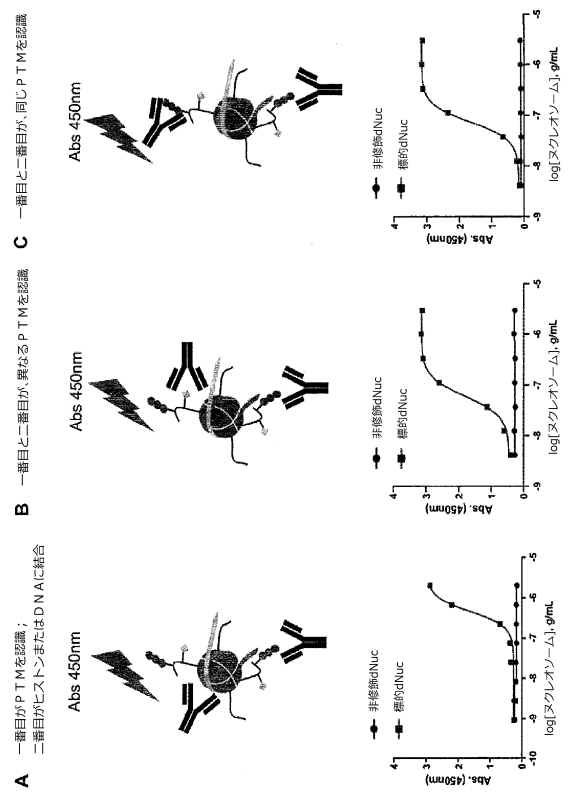
【図１】


A
B
C
Cit H3
Cit H3-dNuc
非修飾
100kDa
75kDa
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa
15kDa
10kDa
H3Cit2/8/17
H2B
H2A
H4
1100
900
700
500
400
300
200
100

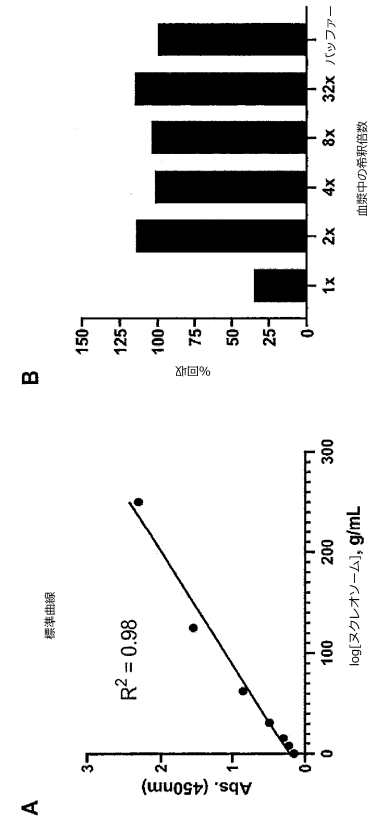
【図２】


A
B
ヌクレオソーム
ヒストン
理論値
Corr. Abs. @ 450nm
ヒストン/Nuc (μM)
検出される分析物 (nM)
100%血漿中に添加された分析物

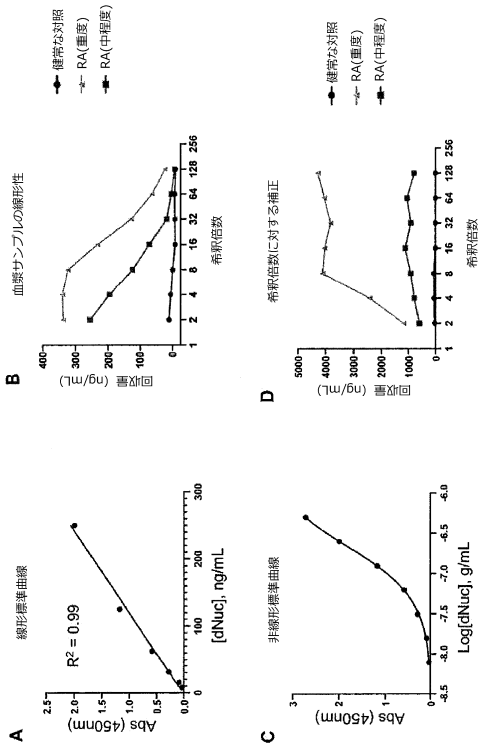
【図３】


A 一番目がPTMを認識；
二番目がヒストンまたはDNAに結合
B 一番目と二番目が、異なるPTMを認識
C 一番目と二番目が、同じPTMを認識
Abs 450nm
非修飾dNuc
標的dNuc
Abs. (450nm)
log[ヌクレオソーム], g/mL

【図４】


A
B
標準曲線
$R^2 = 0.98$
Abs. (450nm)
log[ヌクレオソーム], g/mL
%回収
血漿中の希釈倍数
1x
2x
4x
8x
32x
バッファー

【図５】


A
線形標準曲線
R² = 0.99
Abs (450nm)
[dNuc], ng/mL
B
血漿サンプルの線形性
健常な対照
RA(重度)
RA(中程度)
回収量 (ng/mL)
希釈倍数
C
非線形標準曲線
Abs (450nm)
Log[dNuc], g/mL
D
希釈倍数に対する補正
健常な対照
RA(重度)
RA(中程度)
回収量 (ng/mL)
希釈倍数

フロントページの続き

弁理士　高橋 香元
(72)発明者　コウルズ，マルティス ウィリアム
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２７５１４，チャペル ヒル，１０８ シンシア ドライブ
(72)発明者　ウェリハン，マシュー エフ．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２７７１３，ダラム，５８０８ ウォルナット コーヴ ドライブ
(72)発明者　ジョンストン，アンドレア エル．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２７５０２，エーペックス，１９３７ ケイトランド コート
(72)発明者　キーオ，マイケル－クリストファー
アメリカ合衆国，マサチューセッツ州 ０２１４１，ケンブリッジ，アパートメント １２２４，２２ ウォーター ストリート
(72)発明者　スン，ズ－ウェン
アメリカ合衆国，テネシー州 ３７０２７，ブレントウッド，１１４５ ホーリー ツリー ファームス ロード
(72)発明者　ホール，ネイサン ダブリュー．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２７５１７，チャペル ヒル，１２８ ティンバー クリーク パス
(72)発明者　マルンデ，マシュー アール．
アメリカ合衆国，ノースカロライナ州 ２７５１０，キャルボロ，２００ クレスト ストリート エー７

審査官　大瀧 真理
(56)参考文献　特表２０１７－５０６０７３（ＪＰ，Ａ）
米国特許出願公開第２００７／０１６０９８９（ＵＳ，Ａ１）
国際公開第２０１７／００１８６３（WO，Ａ１）
国際公開第２０１１／０１６８６９（WO，Ａ１）
国際公開第２０１７／０７９７３８（WO，Ａ１）
米国特許出願公開第２０１４／０２０６０１５（ＵＳ，Ａ１）
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／４８ － ３３／９８
Ｃ１２Ｑ　１／３４
Ｃ０７Ｋ　１６／１８