

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6831841号
(P6831841)

(45) 発行日 令和3年2月17日 (2021.2.17)

(24) 登録日 令和3年2月2日 (2021.2.2)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/574 (2006.01)

G O 1 N 33/574 A

G O 1 N 27/62 (2021.01)

G O 1 N 27/62 V

C 1 2 N 15/10 (2006.01)

C 1 2 N 15/10 1 O O Z

請求項の数 18 (全 30 頁)

(21) 出願番号 特願2018-520599 (P2018-520599)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月21日 (2016.10.21)
 (65) 公表番号 特表2019-500582 (P2019-500582A)
 (43) 公表日 平成31年1月10日 (2019.1.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2016/053305
 (87) 国際公開番号 W02017/068371
 (87) 国際公開日 平成29年4月27日 (2017.4.27)
 審査請求日 令和1年10月7日 (2019.10.7)
 (31) 優先権主張番号 1518665.3
 (32) 優先日 平成27年10月21日 (2015.10.21)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(73) 特許権者 517151969
 ベルジアン ポリション エスピーアール
 エル
 ベルギー ビーイー-5032 イスネス
 ルエ プホカス レジュネ 22
 (74) 代理人 100097456
 弁理士 石川 徹
 (72) 発明者 ジャコブ ビンセント ミカレフ
 ベルギー ビーイー-5032 イスネス
 ルエ プホカス レジュネ 22 シー
 /オー ベルジアン ポリション エスピー
 アールエル

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 無細胞ヌクレオソームの濃縮のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製によって分析する方法であって：

(i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
 (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；及び
 (iii) 免疫アッセイ又は質量分析により該単離ヌクレオソームを分析する工程、を含む、前記方法。

【請求項 2】

前記ヒストンH1結合剤が：ヒストンH1タンパク質、バリエント、アイソフォーム、又はそれらの修飾と結合する結合剤から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記ヒストンH1結合剤が：ヒストンH1タンパク質又はH1.0、H1.10、若しくはH1.Xから選択されるヒストンH1バリエントと結合する結合剤から選択される、請求項1又は2記載の方法。

【請求項 4】

前記単離ヌクレオソームを：ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、修飾ヌクレオチド、又は付加非ヒストンタンパク質から選択される後成的特徴を含むかどうかについて免疫アッセイ又は質量分析により分析する、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

。

【請求項 5】

前記単離ヌクレオソームを分析する工程が、免疫アッセイを含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 6】

前記単離ヌクレオソームを分析する工程が、質量分析を含む、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

【請求項 7】

生体試料から精製腫瘍DNAを単離するための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) ヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 工程(ii)において単離されたヌクレオソーム試料からDNAを抽出する工程；及び
- (iv) 該抽出されたDNAを分析する工程、を含む、前記方法。

10

【請求項 8】

前記抽出されたDNAを分析する工程が：DNA配列決定法、メチル化DNA配列決定分析、PCR、BEAMing、NGS（標的型又は全ゲノム型）、デジタルPCR、cold PCR（低変性温度のPCRによる共増幅）、MAP（MIDI活性化加ピロリン酸分解）、PARE（個人化された再配列末端の分析）、又は質量分析を含む、請求項7記載の方法。

【請求項 9】

前記単離ヌクレオソームをヒストンH3.1及び/又はH3.2及び/又はH3t結合剤と接触させることをさらに含む、請求項1～8のいずれか1項記載の方法。

20

【請求項 10】

生体試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープを検出するための免疫アッセイ法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤を含む第1の結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該第1の結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 該ヌクレオソームを該エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；
- (iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び
- (v) 該試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの特定のエピトープの存在の尺度として、そのような結合の存在又は程度を使用する工程、を含む、前記方法。

30

【請求項 11】

前記エピトープがヒストン修飾を含む、請求項10記載の方法。

【請求項 12】

前記ヒストン修飾がH3K27Ac及び/又は5-メチルシトシンを含む、請求項11記載の方法。

【請求項 13】

前記エピトープが修飾ヌクレオチドを含む、請求項10記載の方法。

【請求項 14】

前記エピトープがヒストンH2A、H2B、H3、又はH4バリエント又はアイソフォームを含む、請求項10記載の方法。

【請求項 15】

前記エピトープがヌクレオソーム付加物又はそのバリエントを含む、請求項10記載の方法。

40

【請求項 16】

前記生体試料が、血液、血清、血漿、月経血、脳脊髄液（CSF）、子宮内膜液、尿、唾液、糞便、涙液、滑液、喀痰、若しくは呼気、又はそれらからの抽出物若しくは精製物、又はそれらの希釈物を含む、請求項1～15のいずれか1項記載の方法。

【請求項 17】

前記生体試料が血液、血清、又は血漿試料を含む、請求項16記載の方法。

【請求項 18】

請求項1～17のいずれか1項記載の方法を実施するための、ヒストンH1結合剤を含むキッ

50

ト。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は血液、血清、又は血漿からの腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソーム及び会合している腫瘍DNAの精製又は濃縮方法に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

細胞DNAはクロマチンと呼ばれるタンパク質-核酸複合体として存在する。ヌクレオソームはクロマチン構造の基本単位であり、タンパク質複合体の周囲に巻きつけられた二本鎖DNA(dsDNA)からなる。DNAはしばしば「ひも上のビーズ」に似ているといわれる構造中の連続するヌクレオソームの周囲に巻きつけられており、このことは開いたクロマチン、すなわちユークロマチンの基本構造を形成する。圧縮クロマチン、すなわちヘテロクロマチンにおいて、このひもは閉じた複雑な構造中で螺旋構造をとり、超螺旋構造をとる。

【0003】

クロマチン中の各ヌクレオソームは8つの高度に保存されたコアヒストン(ヒストンH2A、H2B、H3、及びH4の各々の対から構成される)のタンパク質複合体からなる。この複合体の周囲におよそ146塩基対(bp)のDNAが巻きついている。もう1つのヒストン、H1又はH5は、ヌクレオソーム上のコアヒストンの外側に位置しており、リンカーとして働き、クロマチンの凝縮に関与する。無細胞ヌクレオソームは、細胞死の際のクロマチンの消化によるクロマチン断片として生産された、会合しているDNAと一緒にになった単一ヌクレオソームを主に含むと報告されている。

【0004】

成体ヒトにおける正常な細胞のターンオーバーは、細胞分裂による1日に数千億個の細胞の発生と、主にアポトーシスによる同等数の死を伴う。アポトーシスの過程では、クロマチンは単一ヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームへと分解し、その一部は循環中に認めることができる。通常の条件下では、健常対象において認められる循環ヌクレオソームのレベルは低いことが報告されている。多くの癌、自己免疫性疾患、炎症性状態、卒中及び心筋梗塞を含む様々な状態を有する対象において、上昇したレベルが認められる(Holdenreider及びStieberの文献、2009)。また、死細胞からのヌクレオソームは他の体液、例えば尿、糞便、又は喀痰中に流出し得る。

【0005】

DNA異常は全ての癌疾患の特徴である。癌細胞のDNAは健常細胞のDNAと多くの点で異なっており、これらに限定するものではないが、点変異、転座、遺伝子コピー数、マイクロサテライト異常、DNA鎖の完全性、及びヌクレオチド修飾(例えば、シトシンの5位のメチル化)が挙げられる。これらの腫瘍関連のDNA構造又は配列の変化は、臨床診断、予後、及び治療選択目的の生検若しくは外科手術で採取した癌細胞、又は組織において定例的に調べられる。腫瘍の遺伝学的及び後成的特徴は、異なる腫瘍型間で、及び同じ腫瘍疾患を有する異なる患者間で異なる。さらに、これらの特徴は同じ患者の同じ癌内で、疾患の進行に伴い、かつ薬物又は他の治療法への獲得耐性の発生において、時間とともに変化する。従って、手術又は生検で採取された細胞における腫瘍DNAの連続的な調査は、臨床医が疾患の進行をモニタリングし、あらゆる再発又は獲得型治療抵抗性を早い段階で(ことによるとX線検出よりも何ヶ月も早く)検出し、治療経過を潜在的に首尾よく変化させる一助となり得る。

【0006】

しかしながら、モニタリングの目的で患者に対し侵襲的生検手順を繰り返し実施することはできないため、組織DNA検査には限界がある。一部の患者に対しては、生検は全く使用できない。生検は実施するのに費用がかさみ、患者に不快感を与え、患者をリスクにさ

10

20

30

40

50

らし、外科的併発症をもたらし得る。さらに、ある患者における腫瘍は同じ腫瘍の異なる領域に位置する複数の腫瘍クローン又は異なる転移部（転移癌における）に位置する複数の腫瘍クローンからなる場合があり、これらの全てが生検で採取できるわけではない。従って、組織生検DNA調査はある特定の瞬間における、腫瘍の異なる領域内に位置する異なる腫瘍クローン間で、時間的にも、空間的にも、腫瘍の一側面のみを提供する。

【 0 0 0 7 】

癌患者の血液には、瀕死の癌細胞又は死んだ癌細胞から循環へのクロマチン断片又はヌクレオソームの放出に由来すると考えられる循環腫瘍DNA（ctDNA）が含まれている。癌患者からの適合した血液及び組織試料の調査から、患者の腫瘍に存在する（しかし、患者の健常細胞には存在しない）癌関連変異が、同患者から採取された血液試料中のctDNAにおいても存在することが示される（Newmanらの文献，2014）。同様に、癌細胞における差別的にメチル化を受けた（シトシン残基のメチル化によって後成的に変化した）DNA配列も、循環中のctDNAにおけるメチル化配列として検出することができる。さらに、ctDNAから構成される無細胞循環DNA（cfDNA）の比率は腫瘍負荷に関係し、そのため疾患の進行を、存在するctDNAの比率により定量的に、かつその遺伝学的及び/又は後成的組成により定性的にモニタリングすることができる。ctDNAの分析は、腫瘍内の全ての又は多くの異なるクローンを起源とするDNAに付随する非常に有用で臨床的に正確なデータを生じることができ、そのためにこうしたデータは腫瘍クローンを空間的に統合する。さらに、経時的な繰返しの試料採取はずっと実用的で経済的な選択肢となる。（ctDNA）の分析は腫瘍の検出及びモニタリング、並びに侵襲的な組織生検手順を伴わずに腫瘍DNAを調査することによって、腫瘍治療の選択のための早期段階における再発及び獲得薬物耐性の検出に大変革をもたらす可能性を有する。そのようなctDNAの検査は全ての型の癌に関連するDNA異常（例えば、点変異、ヌクレオチド修飾状態、転座、遺伝子コピー数、マイクロサテライト異常、及びDNA鎖の完全性）を調査するために使用することができ、定例の癌スクリーニング、定期的かつより頻繁なモニタリング、及び最適な治療レジメンの定期的点検に適用可能性があるだろう（Zhouらの文献，2012）。

【 0 0 0 8 】

血液、血漿、又は血清はctDNAアッセイに基質として使用することができ、限定することなく、DNA配列決定法、後成的DNA配列決定分析（例えば、5-メチルシトシンを含む配列に対する）、PCR、BEAMing、NGS（標的型又は全ゲノム型）、デジタルPCR、cold PCR（低変性温度のPCRによる共増幅（co-amplification at lower denaturation temperature-PCR））、MAP（MIDI活性化加ピロリン酸分解（MIDI-Activated Pyrophosphorolysis））、PARE（個人化された再配列末端の分析（personalized analysis of rearranged ends））、及び質量分析を含む任意のDNA分析法が利用できる。

【 0 0 0 9 】

DNA異常は全ての癌疾患の特徴であり、ctDNAは調査された全ての癌疾患に対し観察されているため、ctDNA検査は全ての癌疾患において適用可能性を有する。調査された癌には、限定することなく、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、黒色腫、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、肝癌、子宮内膜癌、卵巣癌、リンパ腫、口腔癌、白血病、頭頸部癌、及び骨肉腫がある（Crowleyらの文献，2013；Zhouらの文献，2012；Jungらの文献，2010）。ここでctDNA検査の性質を、3つの（非限定的な）例示によるアプローチを概説することで示すこととする。

【 0 0 1 0 】

第一の例は、ctDNAにおける癌関連遺伝子配列変異の検出を必要とする。ctDNAにおける単一遺伝子変異の検出を伴う血液検査は、一般的に臨床上低感度である。これには2つの理由がある。第一に、全ての癌が変異を有しているものの、特定の癌疾患における任意の特定の変異の頻度は通常低い。例えば、K-ras及びp53の変異は2つの比較的高頻度の癌変異とみなされ、膀胱癌、乳癌、結腸癌、肺癌、肝癌、膵癌、子宮内膜癌及び卵巣癌を含む広範囲の癌において研究されてきたものの、これらはそれぞれ23%～64%及び17%～54%の癌組織試料で検出された。第二に、たとえ患者の癌組織がまさにその変異を含んでいたとしても、該患者の血液中に存在する変異ctDNAのレベル又は濃度は低く、検出困難とな

10

20

30

40

50

り得る。例えば、K-ras及びp53の変異はK-ras及びp53組織陽性患者の0%～75%のctDNAで検出することができる。これらの2つの効果の和は、K-ras又はp53の変異は癌患者の40%未満の血液中で検出されることを意味していた（Jungらの文献，2010）。

【0011】

第二の例は、ctDNAにおける複数の癌関連遺伝子配列の変異の検出を必要とする。K-ras又はp53のような任意の特定の遺伝子の変異は少数の癌のみにおいて存在し得るものの、全ての癌は変異を含んでおり、そのため十分に大きなパネルの変異の研究は原則的に、大部分の腫瘍、又は全ての腫瘍さえもの検出を促進するはずである。従ってそのような検査の臨床感度を増加させるための1つの方法は、多くの遺伝子における広範囲の変異を検査することである。Newmanらは非小細胞肺癌（NSCLC）に対しこのアプローチを適用し、変異が頻発する139個の遺伝子由来の521個のエキソン及び13個のイントロン配列を調査した。調べた変異は複数のクラスの癌関連遺伝学的変化を包含し、そこには一塩基多様性（SNV）及び融合遺伝子が含まれていた。このやり方でNewmanらは、ctDNA血液検査において96%の特異度で95%超のステージII～IVの腫瘍、50%のステージIの腫瘍を検出したことを報告した（Newmanらの文献，2014）。

【0012】

第三の例は、ctDNAにおける特定の遺伝子配列への癌関連後成的変化の検出を必要とする。このアプローチは任意のDNA又はヌクレオチド修飾に適用することができる。このアプローチの最も重要な例は、特定の癌のシトシン残基で差次的にメチル化された遺伝子の検出である。この目的のために様々な癌において、多数の遺伝子が調査された。これらのうちの少数は、セプチン-9、APC、DAPK、GSTP1、MGMT、p16、RASSF1A、T1G1、BRCA1、ER、PRB、TMS1、MLH1、HLTF、CDKN2A、SOCS1、SOCS2、PAX5、PGR、PTGS2、及びRAR 2であり、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、黒色腫、卵巣癌及び前立腺癌において調査された。このアプローチの説明的な例は、結腸直腸癌（CRC）の検出のためのctDNAにおけるメチル化セプチン-9の検出であり、68%のCRC症例を89%の臨床的特異度で検出したことが報告された（Grutzmannらの文献，2008）。

【0013】

cfDNAの腫瘍由来ctDNAフラクションは単一ヌクレオソームの形態で循環するDNA断片について予測される長さとも一致する、200 bp未満の長さの小さなDNA断片として循環する（Newmanらの文献，2014）。癌患者は健常対象よりも高いcfDNAレベルを有していると報告されている。この分野の研究者らは健常対象では0～100 ng/ml（平均30 ng/ml）の範囲のcfDNAを報告し、癌を有する対象では0～1000 ng/ml（平均180 ng/ml）のcfDNAを報告している（Schwarzenbachらの文献，2011）。循環するcfDNAは最大20,000塩基対の長さの様々なサイズのDNA分子からなる（Zhouらの文献，2012）。ctDNAが主に単一ヌクレオソームとして循環するという仮説と一致して、循環中の無細胞ヌクレオソームの測定されたレベルは、DNAのレベルと同様に、健常対象よりも癌患者において高くなる（Holdenriederらの文献，2001）。しかしながら、ヌクレオソームは細胞死の非特異的な産物であり、上昇したレベルは急性外傷を含む上昇した細胞死を伴う多くの状態で観察されるため、循環ヌクレオソームそれ自体のレベルの上昇は臨床上癌のバイオマーカーとして使用されない（Holdenrieder及びStieberの文献，2009）。細胞死の産物として、循環ヌクレオソームのレベルは細胞傷害性薬物又は放射線療法による処置により顕著に上昇し得る。しかしながら、ヌクレオソームはまた循環から除去されるため、レベルが処置により急激に上昇し、続いて下降し得る（Holdenriederらの文献，2001）。

【0014】

循環無細胞ヌクレオソームそれ自体のレベルは癌の血液ベースバイオマーカーとして臨床的实践においては使用されていないものの、それらのヒストン修飾、ヒストンバリエーション、DNA修飾、及び付加物含有量の観点から、循環無細胞ヌクレオソームの後成的組成は、癌における血液ベースのバイオマーカーとして調査されている（WO 2005/019826；WO 2013/030577；WO 2013/030579；WO 2013/084002）。

【0015】

cfDNAの生物学的起源は十分に理解されていない。単一ヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソームを産生するクロマチンの断片化は、アポトーシス細胞死の特徴である。壊死細胞はより大きい数千塩基対の長さのDNA分子を産生すると考えられているが、いくつかの壊死の事例では、DNAの断片化も起こり得る。さらに、共通DNA反復配列（例えば、ALU又はLINE1配列）は、非アポトーシス性又は壊死性の細胞死を受ける細胞から、200～400塩基対のDNA断片として放出され得る（Schwarzenbachらの文献，2011）。また、DNA断片は細胞間コミュニケーションの形態として細胞により分泌され得る。ctDNAの起源は癌細胞の死と関連すると考えられている。DNA断片は壊死腫瘍細胞及び/又はアポトーシス腫瘍細胞からヌクレオソームとして放出され得る。しかし、壊死細胞及びアポトーシス細胞は通常、マクロファージ又は他のスカベンジャー細胞によって貪食され、DNAは壊死細胞又はアポトーシス細胞を飲み込んだマクロファージによって放出され得る（Schwarzenbachらの文献，2011）。

10

【 0 0 1 6 】

血液、血清、又は血漿からcfDNAを抽出するために利用可能な様々な方法があり、これらは抽出されるDNAの収量、及びその様々な長さのDNA断片の抽出効率について比較されてきた。フェノール-クロロホルム及びヨウ化ナトリウム抽出法は最も高い収量を提供し、200 bp未満の長さの小さなDNA断片を抽出する。検査された他の方法（商業上利用可能な方法を含む）は、より低いDNA抽出収量を有し、200 bp未満の長さの小さなDNA断片を抽出できないことが報告されている（Fongらの文献，2009）。

【 0 0 1 7 】

20

ctDNAの分析のための血液、血清、又は血漿からのcfDNAの抽出は、通常商業的に利用可能なDNA抽出製品を用いて実施される。そのような抽出法については循環DNAの高い回収率（>50%）が主張され、一部の製品（例えば；Qiagen社製のQIAamp循環核酸キット）については小さなサイズのDNA断片を抽出することが主張されている。使用される典型的な試料容量は、1～5 mLの範囲の血清又は血漿である。

【 0 0 1 8 】

いくつかの制約から、臨床腫瘍学を目的とした定例の使用におけるctDNAベースの検査は現在存在しない。主要な方法論的制約は、高品質のDNAが要求されることである。現在のctDNAの採取方法は、試料の性質が原因で低品質のctDNA試料を産生する。主な困難は、循環中にはあらゆるctDNAの分析を複雑にする非腫瘍cfDNAが大量に存在することにある。異なる研究者が出した推定値は異なっているが、循環中に存在するctDNAのフラクションは低すぎて検出できないか、cfDNAの50%超であり得る。しかしながら、大部分の癌患者について、ctDNAのフラクションはcfDNAのうちの小さな割合である。例えば、最近の研究では、治療前の肺癌患者において、ctDNAのフラクションが腫瘍サイズとともに増加することが報告されている。認められた最も高いレベルは大きな腫瘍負荷を有する患者で3.2%であったが、大部分の患者では0.1%未満のctDNAフラクションを有することが認められた（Newmanらの文献，2014）。このことは、多くの患者試料について、非常に低いレベルのctDNAを、ずっと高いレベルの非腫瘍由来DNAの存在下で分析しなければならないことを意味する。さらに、このDNAは同じ対象由来であり、それ故類似した配列を有し、ctDNAの定量化又は分析のための任意の方法において干渉することとなる。

30

40

【 0 0 1 9 】

同様の問題は癌のバイオマーカーとしての循環無細胞ヌクレオソーム及び/又は循環ヌクレオソームの後成的組成の測定について発生するが、それはヌクレオソームそれ自体が細胞死の非特異的な指標であり、体の正常な細胞ターンオーバープロセスの一部として、並びに自己免疫性疾患、卒中、敗血症、外傷後、火傷、心筋梗塞、脳卒中、臓器移植後の移植片拒絶反応中に、及び激しい運動後のような細胞死のレベルの上昇と関連する状態において放出されるためである。従って、腫瘍を起源とするヌクレオソームは様々な細胞起源及び組織起源の他の非腫瘍ヌクレオソームとともに循環する。これらの非腫瘍ヌクレオソームは、腫瘍を起源とするヌクレオソームの定量化又は後成的分析についてのあらゆる方法において干渉することとなる。同様の効果は、他の体液においても生じ得る。例えば

50

、糞便は、健常結腸又は直腸細胞を起源とするヌクレオソームと一緒に、結腸直腸癌を起源とするヌクレオソーム及び会合しているDNAを含み得る。喀痰は、健常肺細胞を起源とするヌクレオソームと一緒に、肺癌細胞を起源とするヌクレオソーム及び会合しているDNAを含み得る。同様の効果は、他の体液において生じるだろう。

【0020】

従って、血液、血清、又は血漿試料及び他の体液試料からの腫瘍を起源とするヌクレオソーム及びDNAの濃縮方法は、強く求められている。同様に、癌の疾患状態の検出の向上のための腫瘍起源及び腫瘍を起源としないヌクレオソームを区別することができる循環無細胞ヌクレオソームの分析方法が、求められている。

【発明の概要】

【0021】

(発明の概要)

本発明の第1の態様に従って、生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製によって分析する方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；及び
- (iii) 免疫アッセイ又は質量分析により単離ヌクレオソームを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0022】

本発明のさらなる態様に従って、生体試料から精製腫瘍DNAを単離するための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) ヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 工程(ii)において単離されたヌクレオソーム試料からDNAを抽出する工程；及び
- (iv) 抽出されたDNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0023】

本発明のさらなる態様に従って、生体試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープを検出するための免疫アッセイ法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤を含む第1の結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該第1の結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 該ヌクレオソームを該エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；
- (iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び
- (v) 該試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの特定のエピトープの存在の尺度として、そのような結合の存在又は程度を使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0024】

本発明のさらなる態様に従って、動物又はヒト対象における癌を検出するための方法であって：

- (i) 該対象から生体試料を取得する工程；
- (ii) 後成的特徴を含み、またヒストンH1をも含む無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって該試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は特定の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH1と結合するように方向づけられる、前記工程；
- (iii) 該特定の後成的特徴を含み、ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方であり得る循環無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって、該試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は該後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方は任意のヒストンH2、H3、若しくはH4エピトープ、任意のDNAエピトープ、又はクロマチン断片に存在するヒストンH1エピトープ以外の任意の他のエピトープを含む、共通のコアヌクレオソームエピトープと結合するように方向づけられる、前記工程；並びに

10

20

30

40

50

(iv) 工程(ii)及び(iii)で得られた免疫アッセイの結果の組合わせを該対象における該癌の存在を示す組合わせバイオマーカーとして使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0025】

本発明のさらなる態様に従って、生体試料から腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームを検出し、単離し、かつ/又は精製するためのヒストンH1結合剤の使用が提供される。

【0026】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書に記載の方法におけるヒストンH1結合剤を含むキットの使用が提供される。

【図面の簡単な説明】

10

【0027】

(図面の簡単な説明)

【図1】69名のヒト対象についての、[腫瘍由来及び非腫瘍由来ヌクレオソーム]：[主に非腫瘍由来ヌクレオソーム]の相対比率を示すOD比(OD2：OD1)。

【発明を実施するための形態】

【0028】

(発明の詳細な説明)

ヌクレオソーム構造は後成的シグナル組成の観点から、健常細胞と比較して癌細胞において変化し得る。健常細胞におけるよりも癌細胞においてより一般的な、又はその逆である後成的シグナルに結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子の使用により、細胞起源の混合物を有する無細胞ヌクレオソームを含む対象から採取された生体試料における、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームの単離(すなわち、ポジティブ選択又はネガティブ選択による)が可能となる。

20

【0029】

ヌクレオソームのコアは、H2A、H2B、H3、及びH4ヒストンタンパク質の各々の対を含む、8つのヒストンタンパク質からなる。ヒストンH1(H1)はコアヒストンではないが、コアの外側に位置し、リンカーとして働く。特に、H1は「ひも上のビーズ」基礎構造の高次構造への詰め込みに関与する。理論に束縛されることなく、本発明者らは、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームが、健常細胞を起源とするヌクレオソームよりもヒストンH1をより低頻度を含むことを突き止めた。従って、腫瘍を起源とするヌクレオソームは8つのコアヒストンタンパク質H2A、H2B、H3、及びH4(+DNA及び任意の付加的分子)のみからなる可能性がより高い。このように、血液中の腫瘍を起源に有する又は腫瘍を起源に有さない循環無細胞ヌクレオソームは、腫瘍起源の大部分のヌクレオソームが会合しているDNA断片と一緒に、8つのヒストンタンパク質のコアヌクレオソーム構造を含むのに対し、腫瘍を起源としない大部分のヌクレオソームは、同様のコアヌクレオソーム構造及び会合しているDNA断片に加え、追加的なヒストンH1タンパク質成分を含む点において、定性的に異なると考えることができる。この定性的な差異は、対象又は患者から収集された体液試料における腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームの濃縮のためのネガティブ選択方法の基礎として使用することができる。

30

【0030】

本発明者らは過去、血液及び他の体液中の無細胞ヌクレオソームの後成的分析のための方法を報告した(WO2013/030577、WO2013/030578、WO2013/030579、WO2013/084002)。先に論じたように、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームは腫瘍を有する対象の循環中に放出されるが、これらは正常細胞のターンオーバーに起因して循環中に既に存在する無細胞ヌクレオソームの中であって希釈される。腫瘍を起源としないあらゆるそのようなヌクレオソームは、腫瘍ヌクレオソームの遺伝学的又は後成的分析に干渉する。体液試料から腫瘍を起源としない無細胞ヌクレオソームを除去すれば、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームの純度が高まり、試料中の腫瘍ヌクレオソーム又は腫瘍クロマチン断片の遺伝学的又は後成的分析の結果が改善される。

40

【0031】

50

本発明の好ましい態様において、疾患を起源とする循環無細胞ヌクレオソームを、免疫アッセイ又は質量分析により後成的特徴について精製及び分析する。この態様において；血液、血清、血漿、又は他の体液試料を対象から採取し、かつヒストンH1成分を含む無細胞ヌクレオソームを除去することにより、該試料を疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームについて濃縮する。疾患の徴候となる残る無細胞ヌクレオソームを、免疫アッセイ法又は質量分析法を用いて後成的特徴について分析する。分析可能なヌクレオソームの後成的特徴には；特定のヒストンの翻訳後修飾、特定のヒストンアイソフォーム、特定のヌクレオチド又は修飾ヌクレオチド（例えば、メチル化、ヒドロキシルメチル化、又は他のヌクレオチド修飾）のいずれか又は全てがある。免疫アッセイ法及び質量分析法の利点としては、費用が低く、分析の感度及び特異性が高く、かつハイスループットであることが挙げられる。

10

【0032】

一実施態様において、生体試料由来の疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームのアフィニティー精製による単離及び後成的分析のための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；及び
- (iii) 修飾ヌクレオチドに結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子を必要とする免疫アッセイ法を用いて、単離ヌクレオソームフラクションを修飾ヌクレオチドを含むかどうかについて分析する工程、を含む、前記方法が、提供される。

20

【0033】

別の実施態様において、生体試料由来の疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームのアフィニティー精製による単離及び後成的分析のための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；及び
- (iii) 翻訳後修飾されたヒストンに結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子を必要とする免疫アッセイ法を用いて、単離ヌクレオソームフラクションを翻訳後修飾されたヒストンを含むかどうかについて分析する工程、を含む、前記方法が、提供される。

30

【0034】

さらなる実施態様において、生体試料由来の疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームのアフィニティー精製による単離及び後成的分析のための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；及び
- (iii) ヒストンアイソフォームに結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子を必要とする免疫アッセイ法を用いて、単離ヌクレオソームフラクションをヒストンアイソフォームを含むかどうかについて分析する工程、を含む、前記方法が、提供される。

【0035】

さらなる実施態様において、生体試料由来の疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームのアフィニティー精製による単離及び後成的分析のための方法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；及び
- (iii) 非ヒストンタンパク質に結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子を必要とする免疫アッセイ法を用いて、単離ヌクレオソームフラクションを付加的な非ヒストンタンパク質との結合について分析する工程、を含む、前記方法が、提供される。

40

【0036】

さらなる実施態様において、生体試料由来の疾患を起源とする無細胞ヌクレオソームのアフィニティー精製による単離及び検出のための方法であって：

50

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；
- (iii) 免疫アッセイにより単離ヌクレオソームを定量化する工程；及び
- (iv) 対象の疾患状態の指標として、ヒストンH1成分を含まない無細胞ヌクレオソームの存在又はレベルを使用する工程、を含む、前記方法が、提供される。

【0037】

本発明の好ましい分析的な態様において、試料中に存在する循環無細胞ヌクレオソームの後成的特徴は、(i) ヒストンH1を含むヌクレオソーム及び(ii) ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方であり得る全てのヌクレオソームにおいて分析され、又は測定される。ヒストンH1を含むヌクレオソーム（すなわち、主に非腫瘍ヌクレオソーム）の後成的特徴の測定は、限定することなく、質量分析を含む当技術分野で公知の方法により、又は2つの抗体（又は他の結合剤）を用いる免疫アッセイにより実施することができ、該抗体（又は他の結合剤）のうちの一方は対象の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH1と結合するように方向づけられる。ヒストンH1を含まないヌクレオソーム（すなわち、主に腫瘍ヌクレオソーム）の後成的特徴の直接的測定は、本明細書に記載のアフィニティー精製法を用いたH1会合ヌクレオソームの除去による濃縮に続けて行う場合に、最も効果的に実施される。しかしながら、ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方（すなわち、腫瘍及び非腫瘍ヌクレオソームの両方）であり得る（全ての）循環無細胞ヌクレオソームは、質量分析により、又は2つの抗体（又は他の結合剤）を用いる免疫アッセイにより分析し、又は測定することができ、該抗体（又は他の結合剤）の一方は対象の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH2、H3、又はH4エピトープのいずれか、任意のDNAエピトープ、又はヒストンH1エピトープ以外のクロマチン断片中に存在する任意の他のエピトープを含む共通のコアヌクレオソームエピトープに結合するように方向づけられる。本発明のこの態様において、後成的特徴を含み、かつヒストンH1を包含もする循環無細胞ヌクレオソーム（すなわち、非腫瘍ヌクレオソーム）並びにヒストンH1を含むヌクレオソーム及び含まないヌクレオソームの両方（すなわち、腫瘍及び非腫瘍ヌクレオソームの両方）を含む後成的特徴を含む循環無細胞ヌクレオソームを測定することができる。これら2つの分析又は測定は、ヒストンH1と会合しない特定の後成的特徴を含む試料中に存在する循環無細胞ヌクレオソームの量又は比率の指標として一緒に使用することができる。それは、腫瘍を起源に有する可能性があるヌクレオソームの量又は比率である。例えば、2つの測定値の差を使用することができるか、又は2つの測定値の比を使用することができる。

【0038】

本発明のこの分析的態様の好ましい実施態様において、対象から採取された生体試料における後成的エピトープを含む、腫瘍を起源とする循環無細胞ヌクレオソームの比率を測定するための方法であって、

- (i) 対象から体液試料を取得する工程
- (ii) 第1の免疫アッセイを実施する工程であって；
 - (1A) 試料を該後成的エピトープと結合する第1の結合剤と接触させる工程；
 - (1B) ヌクレオソーム又は試料をヒストンH1と結合する第2の結合剤と接触させる工程；及び
 - (1C) 該第2の結合剤の試料中のヌクレオソームとの結合を検出し、又は定量化する工程、を含む、前記工程；
- (iii) 第2の免疫アッセイを実施する工程であって；
 - (2A) 試料を該後成的エピトープと結合する第1の結合剤と接触させる工程；
 - (2B) ヌクレオソーム又は試料を、非ヒストンH1ヌクレオソーム又はクロマチン断片エピトープと結合する第3の結合剤と接触させる工程；及び
 - (2C) 該第3の結合剤の試料中のヌクレオソームとの結合を検出し、又は定量化する工程、を含む、前記工程、

(iv) 工程(1C)及び(2C)の測定値を該後成的エピトープを含み、かつ腫瘍を起源とする試料中の無細胞ヌクレオソームの量又は比率の指標として組合わせる工程、を含む方法が提供される。

【0039】

本発明のこの分析態様の別の実施態様において、腫瘍を起源とする循環無細胞ヌクレオソームの比率を測定する方法であって、対象から採取された生体試料中の後成的エピトープを含み、

(i) 対象から体液試料を取得する工程；

(ii) 第1の免疫アッセイを実施する工程であって；

(1A) 試料をヒストンH1と結合する第1の結合剤と接触させる工程；

(1B) ヌクレオソーム又は試料を該後成的エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；及び

(1C) 該第2の結合剤の試料中のヌクレオソームとの結合を検出し、又は定量化する工程、を含む前記工程；

(iii) 第2の免疫アッセイを実施する工程であって；

(2A) 試料を非ヒストンH1ヌクレオソーム又はクロマチン断片エピトープと結合する第1の結合剤と接触させる工程；

(2B) ヌクレオソーム又は試料を該後成的エピトープと結合する第3の結合剤と接触させる工程；及び

(2C) 該第3の結合剤の試料中のヌクレオソームとの結合を検出し、又は定量化する工程、を含む前記工程；

(iv) 工程(1C)及び(2C)の測定値を試料中の該後成的エピトープを含み、かつ腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームの量又は比率の指標として組合わせる工程、を含む、前記方法が提供される。

【0040】

当業者には、先に言及された「第1」及び「第2」の免疫アッセイを、任意の順序で、又は並行して、又は多重形式で実施することができることが明らかであろう。また、2つの免疫アッセイにおいて使用される第1及び第2の、又は第1及び第3の結合剤の順列は、必ずしも先に記載のように対称的であるわけではないことも明らかであろう。

【0041】

好ましい実施態様において、後成的エピトープ又は特徴は、(i) ヒストンH2、H3、又はH4のアイソフォーム、(ii) ヒストンH2、H3、又はH4中に存在する翻訳後修飾、(iii) 修飾ヌクレオチドを含むヌクレオチド、(iv) 無細胞クロマチン断片中に包含され、又は該断片に付加される非ヒストンタンパク質から選択される。さらなる実施態様において、後成的エピトープは、ヌクレオソームそれ自体の中に存在する共通エピトープであり、2つの免疫アッセイは、腫瘍ヌクレオソームそれ自体の存在の指標を提供する。

【0042】

本発明のこの態様の好ましい実施態様において、疾患を起源とする特定の後成的エピトープを含む無細胞ヌクレオソームの量又は比率を対象における疾患の存在についてのバイオマーカーとして使用し、又は対象を疾患状態又は治療レジメンへの適性について評価するために使用することができる。

【0043】

本発明者らは先に記載の通り、及び実施例15において、非ヒストンタンパク質ヌクレオソーム付加物を2つの免疫アッセイによって測定し、[非ヒストンタンパク質を含むヌクレオソームそれ自体]：[ヒストンH1及び非ヒストンタンパク質を含むヌクレオソーム]の比を導く分析手順の開発に成功した。従って、導かれる比は、[全てのヌクレオソームタンパク質付加物]：[非腫瘍ヌクレオソームタンパク質付加物]の指標である。従って、対象から取得される血液、血清、又は血漿試料について、試料に関し導かれる比が大きいほど、ヌクレオソームの一部が腫瘍を起源に有する可能性が高くなる。29名の健常対象において、実測された平均免疫アッセイ出力（光学密度）比は、8.7であった。結腸直腸癌と診

10

20

30

40

50

断された29名の対象において、平均の比は15.9であった。膵癌と診断された11名の対象において、平均の比は17.1であった。このことは、比が高まることが実に癌を起源とするヌクレオソームと関連付けられることを実証する。

【 0 0 4 4 】

さらに、カットオフレベルを高めた各対象についての個別の結果を癌のバイオマーカーとして使用した。カットオフを12とすると；比は膵癌と診断された対象の73%（11名中8名）、臨床的特異度79%で結腸直腸癌と診断された対象の41%（29名中12名）に対し陽性の結果を与えた（29名の健常対象のうち、6名が偽陽性の結果）。カットオフを22とすると；比は膵癌と診断された対象の36%（11名中4名）、及び臨床的特異度93%で結腸直腸癌と診断された対象の34%（29名中10名）に対し陽性の結果を与えた（29名の健常対象のうち、2名が偽陽性の結果）。これらの結果は、本明細書に記載の比を癌疾患のバイオマーカーとして使用することができることを実証する。

10

【 0 0 4 5 】

本明細書における「ヒストンH1結合剤」（例えば、ネガティブ選択法において）への言及は、一般に任意のヒストンH1バリエーション、アイソフォーム、又はそれらの修飾を含むヒストンH1タンパク質と結合する結合剤を指すことが理解されよう。従って、一実施態様において、ヒストンH1結合剤は：ヒストンH1タンパク質、バリエーション、アイソフォーム、又はそれらの修飾と結合する結合剤から選択される。

【 0 0 4 6 】

先の実施態様において、疾患を起源とする濃縮された無細胞ヌクレオソームそれ自体の存在若しくはレベル、検出された修飾ヌクレオチド、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、若しくはヌクレオソームタンパク質付加物を含む疾患を起源とする濃縮された無細胞ヌクレオソームの存在又はレベルを、疾患状態、疾患予後、疾患モニタリング、治療モニタリング、又は特定の治療に対する疾患感受性の指標として、又は他の臨床適用について使用することができる。

20

【 0 0 4 7 】

本発明者らは、過去、WO2005/019826、WO2013/030577、WO2013/030578、WO2013/030579、WO2013/084002に記載の方法を含む、本発明における使用に好適なヌクレオソーム免疫アッセイ法を報告した。限定されることなく、これらの方法のいずれかを、本発明において利用することができる。

30

【 0 0 4 8 】

さらに、本発明者らは腫瘍を起源とするヌクレオソームがH1と会合している場合、ヌクレオソームと会合しているH1がさらなる修飾に付され、かつ/又は健常細胞を起源とするヌクレオソーム中に存在するものとは異なるH1バリエーション若しくはH1アイソフォームを含み得ることを突き止めた。

【 0 0 4 9 】

主なヒストンH1バリエーション又はアイソフォームには、限定されることなく、増殖する体細胞及び休止する体細胞において発現するH1.0、H1.10、及びH1X、並びに分裂細胞において高レベルで発現するH1バリエーション、H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、及びH1.6がある。さらに、主に精巣に発現するH1.8及び主に卵母細胞に発現するH1.7を含む、生殖系列特異的バリエーションが存在する。クロマチンのヒストンバリエーション組成は癌細胞において変化し、共通のH1アイソフォームのうち、ヒストンH1.0アイソフォームの発現が癌細胞において下方調節される一方、ヒストンアイソフォームH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、及びH1.5が癌細胞において高レベルで発現することが報告されている（Scaffidiの文献、2015）。

40

【 0 0 5 0 】

ヒストンH1は、N及びC末端尾部に位置するアミノ酸残基並びにタンパク質の球形ドメイン内に翻訳後修飾を受ける場合があり、これらの修飾は癌と関連付けることができる（Izozo及びSchneiderの文献、2015）。本明細書における「ヒストンH1の修飾」への言及が、アセチル化、モノ、ジ、又はトリメチル化であり得るメチル化、リン酸化、ユビキチン化、ADPリボシル化、シトルリン化、ヒドロキシル化、グリコシル化、ニトロシル化、グル

50

タミン化、及び/又は異性化を含み得るH1翻訳後修飾（PTM）を指すことは、理解されよう。修飾を有するヒストンアミノ酸残基は、ヒストンアミノ酸配列内の任意のSer、Lys、Arg、His、Glu、Pro、又はThr残基であり得る。

【0051】

例えば、コアヒストン配列内のリシン残基は、モノ、ジ、若しくはトリメチル化され、アセチル化され、又はユビキチン化され得、コアヒストン配列内部のアルギニン残基はモノメチル化され、対称的に、若しくは非対称的にジメチル化され、又はシトルリンに変換され得、コアヒストン配列内のセリン又はスレオニン残基は、リン酸化され得、かつ/又はコア配列内のプロリン残基は異性化され得る。

【0052】

当業者には、特定のヒストン修飾を記載するのに使用される表記法が、どのヒストンが修飾されたか、修飾された特定のアミノ酸（複数可）、及び生じた修飾の種類を示すことが理解されよう。例えば、H1K64(Ac)はヒストンH1のリシン64でのアセチル化を示す。

【0053】

一実施態様において、本発明で使用される結合子（複数可）は、無細胞ヌクレオソームに関連するヒストンH1の修飾と結合するように方向づけられる。さらなる実施態様において、ヒストンH1の修飾は、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化、及び/又はホルミル化から選択される。H1の修飾には：部位：S2、T4、T11、S/T18、S27、T31、S36、S37、T39、S41、S44、S107、T138、T142、T146、T147、T154、T155、T165、S172、S173、T180、S/T187、S189でのリン酸化；部位：S2、K17、K26、K34、K46、K49、K52、K63、K64、K85、K88、K90、K93、K97、K109、K168、K169、K192、K209でのアセチル化；部位：K26、K27、K34、K52、K64、K97、K106、K119、K148、K168、K169、K187でのメチル化；部位：K17、K21、K34、K46、K47、K64、K65、K75、K76、K85、K86、K90、K91、K97、K98、K106、K107でのユビキチン化；部位：K17、K34、K46、K63、K64、K67、K75、K85、K88、K90、K97、K110、K140、K141、K160でのホルミル化を含み得る。従って、一実施態様において、無細胞ヌクレオソームに会合しているヒストンH1の修飾は、本明細書に列記された少なくとも1つのヒストンH1の修飾を含む。

【0054】

一実施態様において、本発明で使用される結合子（複数可）は、無細胞ヌクレオソームと会合しているヒストンH1バリエーション又はアイソフォームと結合するように方向づけられる。H1バリエーション及びアイソフォームは、有糸分裂中に発現すると考えられるH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6、及び休止体細胞に発現するH1.0、H1.10、及びH1Xを含み得る。また、追加のH1バリエーションは特定の組織において、例えばバリエーションH1t、H1T2、H1LSは精巣において同定され、並びに特定の細胞種において、例えばバリエーションH1.0は末期的に分化した細胞において同定された。従って、一実施態様において、無細胞ヌクレオソームと会合しているヒストンH1バリエーション又はアイソフォームは、本明細書に列記されたヒストンH1バリエーション又はアイソフォームの少なくとも1つを含む。

【0055】

当業者には、ヒト又は動物対象患者から採取した生体試料の、その定量的なH1の会合又はその定性的なH1アイソフォーム及び/又はH1 PTM修飾の組成に基づく腫瘍を起源とするヌクレオソームについての濃縮により、ヌクレオソーム又はDNAバイオマーカーを用いた差次的診断の識別力が向上する可能性が高いであろうことが明らかであろう。従って、一実施態様において、健康起源又は腫瘍起源のヌクレオソームの免疫分離では、無細胞ヌクレオソームに会合している少なくとも1つのヒストンH1修飾、及び/又はバリエーション、及び/又はアイソフォームと結合するように方向づけられた結合子を利用する。

【0056】

一実施態様において、生体液試料を対象から採取し、試料中の無細胞ヌクレオソームをヌクレオソームのヒストンH1組成に基づいて腫瘍を起源とするヌクレオソームを濃縮する。体液試料は限定されることなく、脳脊髄液（CSF）、全血、血液、血清、血漿、月経血、子宮内膜液、尿、唾液、又は他の体液（糞便、涙液、滑液、喀痰）、呼気、例えば、濃

10

20

30

40

50

縮呼吸 (condensed breath)、又はそれらからの抽出物若しくは精製物、又はそれらの希釈物を含む対象から採取される任意の生体液試料とすることができる。また、生体試料は生きた対象からの、又は死後採取された標本を含む。試料を調製し、例えば適切な場合、通常の方法で希釈し、又は濃縮し、かつ保存することができる。

【0057】

一実施態様において、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームは：乳癌、膀胱癌、結腸直腸癌、皮膚癌（例えば、黒色腫）、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、腸癌、肝癌、子宮内膜癌、リンパ腫、口腔癌、頭頸部癌、白血病、及び骨肉腫から選択される癌を起源とする。

【0058】

一実施態様において、ヌクレオソームは、無細胞単一ヌクレオソーム又は無細胞オリゴヌクレオソームである。

【0059】

(方法)

(ネガティブ選択)

当業者には、腫瘍細胞を起源とするヌクレオソーム及び健常細胞を起源とするヌクレオソームを含む血液試料中の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームの、ヒストンH1アイソフォーム又はヒストンH1翻訳後修飾パターンに基づくアフィニティー結合によるポジティブ選択は、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームがH1タンパク質成分を保持し、かつ含む場合にのみ可能であることが明らかであろう。しかしながら、腫瘍を起源とする循環無細胞ヌクレオソームの大半は、H1成分を含まない。この理由から、ネガティブ選択が、腫瘍を起源とする循環無細胞ヌクレオソームを濃縮するのに好ましい方法である。

【0060】

本発明の第1の態様によると、生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームを、アフィニティー精製によって単離し/分析するための方法であって：

(i) 試料からヒストンH1（任意のヒストンH1バリエーション、アイソフォーム、又はそれらの修飾を含む）結合剤と接触させる工程；

(ii) 試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；並びに

(iii) 単離ヌクレオソーム及び/又は会合DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0061】

本発明のこの態様に従って、ヒストンH1タンパク質、又は1以上の特定のヒストンH1バリエーション、又は1以上の特定のヒストンH1修飾を含む無細胞ヌクレオソームのネガティブ選択により、腫瘍を起源とするヌクレオソームについて生体試料を濃縮するための方法が提供される。一実施態様において、ヒストンH1又はヒストンH1バリエーションH1.0、H1.10、又はH1Xと結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子（又はこれらの任意の組合わせに方向づけられた任意の結合子）は、H1バリエーションを含むヌクレオソームを選択及び単離するのに使用され、従って健常細胞を起源とするヌクレオソームと結合する。従ってこの方法により試料から健常細胞を起源とするヌクレオソームが除去され、そのため、該試料は腫瘍を起源とするヌクレオソームについて濃縮される。好ましい実施態様において、結合子は健常起源を有するヌクレオソームの免疫抽出のための固相上に固定化された抗体である。液相に残存するヌクレオソーム及び/又は会合DNAを遺伝学的配列、後成的シグナル構造、又は他の特徴について分析することができる。

【0062】

従って、本発明の態様によると、生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製により単離し/分析するための方法であって：

(i) 試料をヒストンH1タンパク質それ自体又はH1.0、H1.10、又はH1.Xから選択されるヒストンH1バリエーションと結合するヒストンH1結合剤と接触させる工程；

(ii) 試料から結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合ヌクレオソーム

)を単離する工程；並びに

(iii) 単離ヌクレオソーム及び/又は会合DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0063】

一実施態様において、単離ヌクレオソームを免疫アッセイ又は質量分析により分析する。存在する腫瘍を起源とするヌクレオソームのレベル又は量及び/又は腫瘍を起源とするヌクレオソームの任意の分子遺伝学的又は後成的特徴を使用して、対象における癌を検出し、又は任意の臨床目的のために対象の癌を評価することができる。さらなる実施態様において、単離ヌクレオソームを後成的特徴を含むかどうかについて免疫アッセイ又は質量分析により分析する。なおさらなる実施態様において、後成的特徴は、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、修飾ヌクレオチド、又は付加非ヒストンタンパク質を含む。さらなる実施態様において、単離ヌクレオソームのDNA成分を、DNA塩基配列について分析する。

10

【0064】

本明細書に記載のネガティブ選択法における「ヒストンH1タンパク質」への言及は、ネイティブの又は野生型ヒストンH1タンパク質を含む。先の説明の通り、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームは健常細胞を起源とするヌクレオソームよりも少ない頻度でヒストンH1を含むため、本実施態様により、ネイティブ/野生型ヒストンH1タンパク質の存在又は不存在を検出することで、腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームを単離することが可能となる。

20

【0065】

(ポジティブ選択)

本発明において、ポジティブ選択法は、翻訳後修飾されたヒストンH1タンパク質分子又は先に記載の分裂細胞又は増殖細胞に関連するH1タンパク質アイソフォームと結合するように方向づけられたアフィニティー結合剤の使用に基づいている。特に、ポジティブ選択における使用のための翻訳後修飾されたヒストンH1タンパク質結合標的には、先に列記されたものから任意に選択されるものがある。ポジティブ選択における使用のためのH1アイソフォームには、H1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6から選択されるヒストンH1アイソフォーム又はバリエーションがある。

【0066】

本発明の一実施態様に従って、生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製により単離し/分析するための方法であって：

(i) 試料を癌を起源とするヌクレオソームにおいて優勢なヒストンH1バリエーション、アイソフォーム、又はそれらの修飾への結合剤と接触させる工程；

(ii) 試料からヒストンH1結合剤と結合するヌクレオソームを単離する工程；及び

(iii) 単離ヌクレオソーム及び/又は会合DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0067】

本発明のこの態様に従って、ヒストンH1タンパク質、又は癌を起源とするヌクレオソームにおいて優勢な1以上の特定のヒストンH1バリエーション、又は1以上の特定のヒストンH1修飾を含む、無細胞ヌクレオソームのポジティブ選択によって腫瘍を起源とするヌクレオソームについて生体試料を濃縮するための方法が提供される。好ましい実施態様において、H1バリエーションH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6と結合するように方向づけられた抗体又は結合子（又はこれらの任意の組み合わせと結合するように方向づけられた任意の結合子）がH1バリエーションを含むヌクレオソームを選択し、かつ単離するために使用され、それによって腫瘍を起源とするヌクレオソームが濃縮される一方、健常細胞を起源とする多くのヌクレオソームは未結合のままとなり、かつこれらを分離することができる。別の好ましい実施態様において、H1の修飾と結合するように方向づけられた抗体又は他の結合子（又は修飾の組み合わせと結合するように方向づけられた任意の結合子）がH1の修飾を含むヌクレオソームを選択し、単離するために使用され、それによって腫瘍を起源とするヌク

30

40

50

レオソームが濃縮される一方、健常細胞を起源とする多くのヌクレオソームが未結合のままとなり、かつこれらを分離することができる。好ましい実施態様において、結合子は腫瘍を起源とするヌクレオソームの免疫抽出のための固相上に固定化された抗体である。固相に結合したヌクレオソーム及び/又は会合DNAを遺伝学的配列、後成的シグナル構造、又は他の特徴について分析することができる。

【0068】

従って、本発明の態様によると、生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製により単離し/分析するための方法であって：

(i) 試料をH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、若しくはH1.6から選択されるヒストンH1バリエーション、又はヒストンH1の修飾と結合する結合剤と接触させる工程；

(ii) 試料から結合剤と結合したヌクレオソームを単離する工程；並びに

(iii) 単離ヌクレオソーム及び/又は会合DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0069】

一実施態様において、単離ヌクレオソームは免疫アッセイ又は質量分析によって分析される。さらなる実施態様において、単離ヌクレオソームを免疫アッセイ又は質量分析によって後成的特徴を含むかどうかについて分析する。なおさらなる実施態様において、後成的特徴は、ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、修飾ヌクレオチド、又は付加非ヒストンタンパク質を含む。さらなる実施態様において、単離ヌクレオソームのDNA成分を、DNA塩基配列について分析する。

【0070】

腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームは、様々な起源を有するヌクレオソームの混合物の一部として生体液中に存在し、存在する無細胞ヌクレオソームの一部のみを構成する。驚くべきことに、腫瘍を起源とするヌクレオソームの濃縮又は単離を、本明細書に記載されたアフィニティー精製単離法を用いたポジティブ選択又はネガティブ選択によって実施することができることが見出された。

【0071】

循環ヌクレオソームレベルは外傷、卒中、又は細胞傷害性薬物、若しくは放射線療法による処置を含む任意の数の本質的に異なる原因によって生じる細胞死の突然の増加の後2～5日で顕著に急上昇し得る。その後レベルは2～3日の期間で下落する（Holdenriederらの文献、2001）。この効果は細胞死の誘導とそれに続く循環からの排出によるものである（Holdenrieder及びStieberの文献、2009）。

【0072】

腫瘍疾患を有さない患者の循環中に放出されるヌクレオソーム（例えば、外科手術外傷によるものを含む）が腫瘍を起源に有し得ないことは明らかである。これらのヌクレオソームはcfDNAに寄与するが、ctDNAを含まない。

【0073】

本明細書で使用される用語「ヌクレオソーム」は、単一ヌクレオソーム及びオリゴヌクレオソーム、並びに流体媒体中で分析することができるような任意のクロマチン断片を含むことが意図されることは明らかである。さらなる実施態様において、無細胞ヌクレオソームは単一ヌクレオソーム、オリゴヌクレオソーム、又は他の染色体断片である。

【0074】

当業者には、存在するヌクレオソームの一部として単離された腫瘍ヌクレオソームのレベルが、試料中の腫瘍DNAを含むDNAの比率の尺度として使用され得ることが明らかであろう。さらに、逆のレベルは試料中の健常起源を有するDNAの比率である。従って、本明細書に記載の方法を使用して、試料中のctDNAのレベル/比率を検出することができる。そのような尺度はctDNA中の癌関連変異の対立遺伝子頻度尺度に類似しており、腫瘍負荷及び治療への反応の尺度として使用することができる。

【0075】

本発明の一実施態様において、完全に又は部分的に精製された腫瘍ヌクレオソーム調製

10

20

30

40

50

物が、生体液試料から単離される。一実施態様において、精製法は、該後成的エピトープと結合する結合子を利用することによる、健常組織に特徴的なヒストン又はDNAの後成的シグナルエピトープを含む無細胞ヌクレオソームのアフィニティー単離を伴う。従って、溶出物は腫瘍ヌクレオソーム調製物及び/又はその会合ctDNAを含み、これらを続いて分析することができる。

【0076】

本明細書で要求される試料由来のヌクレオソームを接触させ、かつ単離する方法は当技術分野で周知されており、任意の好適な分離法を使用することができる。例えば、分離法には、アフィニティークロマトグラフィー又は磁気抗体ビーズを挙げることができる。例えば、アフィニティークラムクロマトグラフィー設定を使用する場合、試料をH1結合剤を含むアフィニティークラムを通過させることができることは理解されよう。固相に結合したヌクレオソーム又はフロースルー（すなわち、未結合のヌクレオソーム）のいずれかを本明細書に記載のポジティブ選択法又はネガティブ選択法が利用されたかどうかに応じてctDNAの分析用に収集することができる。

【0077】

好ましい実施態様において、腫瘍ヌクレオソーム及びctDNAの単離は、ヒストンH1への結合子を利用する免疫学的アフィニティー精製法によって実施される。当業者には、ヒストンH1に特異的に結合することができる任意の結合剤を本発明のアフィニティー精製法に使用することができることが明らかであろう。そのような結合剤としては、限定されることなく、抗体、アプタマー、又は結合タンパク質（例えば；ヌクレオソーム結合タンパク質）を挙げることができる。

【0078】

抗体は、免疫化及びファージディスプレイなどのライブラリー法を含む当技術分野で公知の様々な方法により生産することができる。免疫反応を対象の成分又は抗原に対して誘導することができ、又はライブラリーを、対象の成分又は抗原と結合するように選択することができる。ヒストンH1に結合するよう方向づけられた抗体を、任意にヒストンの翻訳後修飾を含むことができる完全H1タンパク質アミノ酸配列を含む様々なそのような成分に対して生産することができる。タンパク質は、生細胞から精製するか、合成的に生産してもよい。あるいは、H1アミノ酸配列の一部であるペプチド配列を使用することができ、これは任意にヒストンの翻訳後修飾を含むこともできる。ヒストンH1を含むヌクレオソーム又は他のクロマチンフラクションを使用することもできる。

【0079】

当業者には、ヒストンH1の任意の部分又は全てと結合するように方向づけられた結合剤を、本発明の方法において利用することができることが明らかであろう。

【0080】

腫瘍を起源とする単離ヌクレオソームの分析は、多くの分析が当技術分野で公知である任意の好適な方法を伴い得る。これらの方法には、限定されることなく、dsDNAなどの共通のヌクレオソームエピトープに対する、又はヒストン修飾、ヒストンバリエーション、DNA修飾、又はヌクレオソームに付加された別の分子を含む、対象の後成的構造に対する第2の抗体若しくは他の結合子を使用する免疫アッセイによる分析がある。これらの方法は、WO 2005/019826、WO 2013/030577、WO 2013/030579、及びWO 2013/084002に記載された全ての方法を参照により本明細書に含み、ここでヒストンH1結合子は一般的な抗ヌクレオソームエピトープ結合子の代わりに利用される。また、これらの方法は腫瘍を起源とする循環ヌクレオソーム中に存在する複数のエピトープの分析のための多重方法を含む。

【0081】

また、本発明の方法により単離される腫瘍を起源とするヌクレオソームの分析は、限定されることなく、電気泳動法、クロマトグラフィー法、並びにクロマトグラフィー及び質量分析及び/又は安定同位体標識された質量分析を伴う方法、及び/又は質量分析による同定及び/又は定量化のためのペプチドを作製するタンパク質消化を伴う方法を含む質量分析法、又は任意の他の方法による任意の組合わせ質量分析法を伴う任意の方法を含む当技

術分野で公知の任意のプロテオミクス法を伴い得る。

【0082】

本発明の好ましい実施態様において、腫瘍を起源とするヌクレオソームについて濃縮された循環ヌクレオソーム調製物を癌患者から採取した血液、血清、又は血漿試料中の循環ヌクレオソームのアフィニティー精製によって調製し、ヌクレオソーム調製物の後成的組成を質量分析を伴う方法により調査する。従って、一実施態様において、方法は：

- (i) 試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 遊離又はヒストンH1結合剤と結合されたヌクレオソームフラクションを分離し、フラクションの1つを単離する工程；並びに
- (iii) 工程(ii)で単離されたヌクレオソームを質量分析を含む方法を用いて分析する工程、を含む。

【0083】

当業者であれば、本明細書に記載のポジティブ選択法が使用されているか、又はネガティブ選択法が使用されているかに応じて、どのヌクレオソームフラクションを単離するかが決定される（すなわち、ポジティブ選択法については結合フラクション、又はネガティブ選択法については遊離/溶出フラクション）ことを理解するだろう。

【0084】

本発明のさらなる態様に従って、生体試料から精製腫瘍DNAを単離するための方法であって：

- (i) 試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 工程(ii)において単離したヌクレオソーム試料からDNAを抽出する工程；及び
- (iv) 抽出DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0085】

本発明のさらなる態様に従って、生体試料から精製腫瘍DNAを単離するための方法であって：

- (i) 試料をH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、若しくはH1.6から選択されるヒストンH1バリエーション、又はヒストンH1の修飾と結合する結合剤と接触させる工程；
- (ii) 結合剤と結合したヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 工程(ii)において単離されたヌクレオソーム試料からDNAを抽出する工程；及び
- (iv) 抽出DNAを分析する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0086】

精製又は単離腫瘍DNAの調査は、限定されることなく、DNA配列のメチル化、点変異、転座、遺伝子コピー数、マイクロサテライト異常、及びDNA鎖の完全性を含む後成的分析を含む任意の又は全ての種類の癌関連DNA異常の分析を伴い得る。さらに、限定することなく、DNA配列決定法、メチル化DNA配列決定分析、PCR、BEAMing、NGS（標的型又は全ゲノム型）、デジタルPCR、cold PCR（低変性温度のPCRによる共増幅）、MAP（MIDI活性化加ピロリン酸分解）、PARE（個人化された再配列末端の分析）、及び質量分析を含む任意のDNA分析法を利用することができる。

【0087】

本発明の方法の一実施態様において、生体試料は、全血、血液、血清、血漿、脳脊髄液、尿、糞便、喀痰、唾液、若しくは他の体液、又は呼気、濃縮呼気、又はそれらからの抽出物若しくは精製物、又はそれらの希釈物である。さらなる実施態様において、生体試料は血液、血清又は血漿である。なおさらなる実施態様において、生体試料は血清である。

【0088】

生体試料の収集法は、当技術分野で周知されており、任意のそのような収集法は、本明細書に記載の方法による使用に好適であることが理解されよう。

【0089】

（さらなる後成的マーカー）

いったん腫瘍起源について濃縮されたヌクレオソームが単離されたら、それらをさらな

る後成的マーカー（「後成的エピトープ」）について分析し、又はさらなる濃縮法に付することができる。

【0090】

従って、本発明の一態様によると、生体試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープを検出するための免疫アッセイ法であって：

(i) 試料をヒストンH1又はH1.0、H1.10、若しくはH1.Xから選択されるヒストンH1バリエーションと結合する第1の結合剤と接触させる工程；

(ii) 第1の結合剤と結合しないヌクレオソーム（すなわち、未結合のヌクレオソーム）を単離する工程；

(iii) 工程(ii)において取得したヌクレオソームを該エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；

(iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び

(v) 試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの特定のエピトープの存在の尺度として、そのような結合の存在又は程度を使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0091】

本発明の別の態様に従って、生体試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープを検出するための免疫アッセイ法であって：

(i) 試料をH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6から選択されるヒストンH1バリエーション、又はヒストンH1の修飾と結合する第1の結合剤と接触させる工程；

(ii) 第1の結合剤と結合したヌクレオソームを単離する工程；

(iii) 工程(ii)において取得したヌクレオソームを該エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；

(iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び

(v) 試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの特定のエピトープの存在の尺度として、そのような結合の存在又は程度を使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0092】

一実施態様において、エピトープはヒストン修飾、修飾ヌクレオチド、ヒストンバリエーション若しくはアイソフォーム、又はヌクレオソーム付加物又はこれらのバリエーションから選択される。さらなる実施態様において、エピトープは、ヒストン修飾を含む。なおさらなる実施態様において、ヒストン修飾はH3K27Ac及び/又は5-メチルシトシンを含む。

【0093】

様々な後成的に修飾されたヌクレオチドが文献に記載されており、DNA及び/又はDNAヌクレオチド残基の後成的修飾パターンは癌において変化することが公知である。これらのうちで最もよく記載されたものにはシトシン5位のメチル化がある。5-メチルシトシンを含むDNAは、「メチル化DNA」と呼ばれることが多い。癌細胞におけるDNAのメチル化は、健常細胞のDNAと比較しておよそ50%低下していると推定される（Guerrero-Prestonらの文献、2007；Soaresらの文献、1999）。しかしながら、循環ヌクレオソームのレベルの癌に関連する増加は、平均で970%であり（Holdenriederらの文献、2001）かつcfDNAの増加は約600%である（Schwarzenbachらの文献、2011）と報告されている。

【0094】

さらなる後成的エピトープについてのアッセイは、単離において、又はアッセイパネルの一部として実施することができる。

【0095】

一実施態様において、本明細書に記載の方法から取得した単離ヌクレオソーム試料をさらなる濃縮工程に付する。従って、一実施態様において、本発明の方法は、単離ヌクレオソームをヒストンH3.1及び/又はH3.2及び/又はH3t結合剤と接触させることをさらに含む。ヒストン3バリエーションH3.1、H3.2、及びH3tが、ctDNAの濃縮に使用され得ることが過去に示されている。

【0096】

本実施態様において、方法工程は：

- (i) 試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) 遊離又はヒストンH1結合剤と結合したヌクレオソームフラクションを分離し、かつフラクションの1つを単離する工程；
- (iii) 単離したフラクションをヒストンH3.1及び/又はH3.2及び/又はH3tの結合剤と接触させる工程；
- (iv) 結合したヌクレオソームを試料から単離する工程；並びに
- (v) 単離ヌクレオソーム及び/又は会合DNAを分析する工程、を含み得る。

【0097】

上記の方法のいずれかを独立型方法として又は既存の検査と組合わせて使用することができることが認識されよう。

【0098】

(診断方法)

本明細書に記載の方法は診断方法と組合わせて使用することができる。例えば、試料を腫瘍を起源とするDNA又は無細胞ヌクレオソームを単離するために、本明細書に記載の方法を用いて濃縮することができ、続いて濃縮した試料を疾患と関連付けられるさらなる後成的マーカーを検出することにより診断方法において使用することができる。

【0099】

従って、本発明のさらなる態様によると、動物又はヒト対象における癌の診断又は検出方法であって：

- (i) 生体試料を対象から取得する工程；
- (ii) 試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (iii) 遊離又はヒストンH1結合剤と結合したヌクレオソームフラクションを分離し、かつフラクションの1つを単離する工程；
- (iv) 工程(iii)において取得された単離ヌクレオソームを腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；
- (v) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び
- (vi) 測定されたバイオマーカー（複数可）のレベルを、対象における該疾患の存在を示すものとして使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0100】

検出及び/又は定量化は、精製又は濃縮ヌクレオソーム試料に対し直接、又は該試料由来の抽出物若しくは該試料の希釈物に対し間接的に実施することができる。試料中に存在するバイオマーカーの量の定量化は、試料中に存在するバイオマーカーの濃度を決定することを含み得る。本明細書に記載の発明による使用並びに検出、モニタリング、及び診断の方法は、疾患の存在を確認し、発病及び進行を評価することにより疾患の発症をモニタリングし、又は疾患の改善若しくは軽減を評価するのに有用である。また、使用並びに検出、モニタリング、及び診断の方法は、臨床スクリーニングの評価、予後、治療法選択、治療的利益の評価、すなわち、薬物スクリーニング及び創薬のための方法において有用である。

【0101】

本明細書に記載の診断方法は、1以上の対照の生体試料中に存在する第2の結合剤のレベルを比較することをさらに含み得る。一実施態様において、1以上の対照由来の生体試料を健常（すなわち「正常な」）患者（複数可）及び/又は関連する良性疾患を有する患者（複数可）から採取する。さらなる実施態様において、1以上の対照由来の生体試料を健常患者（複数可）から採取する。

【0102】

本明細書に記載のように、本発明の方法では、2つの免疫アッセイの使用を組合わせることができる。従って、本発明のさらなる態様によると、動物又はヒト対象において癌を診断し、又は検出するための方法であって：

(i) 対象から生体試料を取得する工程；

(ii) 後成的特徴を含み、またヒストンH1をも含む無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は特定の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH1と結合するように方向づけられる、前記工程；

(iii) 該特定の後成的特徴を含み、ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方であり得る無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって、試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は該後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方は任意のヒストンH2、H3、若しくはH4エピトープ、任意のDNAエピトープ、又はヒストンH1エピトープ以外のクロマチン断片に存在する任意の他のエピトープを含む、共通のコアヌクレオソームエピトープと結合するように方向づけられる、前記工程；並びに

(iv) 工程(ii)及び(iii)で得られた免疫アッセイの結果の組合わせを該対象における該癌の存在を示す組合わせバイオマーカーとして使用する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0103】

(治療方法)

本発明のさらなる態様に従って、動物又はヒト対象における癌の治療方法であって：

(i) 対象から取得された生体試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；

(ii) 遊離又はヒストンH1結合剤と結合したヌクレオソームフラクションを分離し、かつフラクションの1つを単離する工程；

(iii) 工程(ii)において取得された単離ヌクレオソームを腫瘍由来ヌクレオソームのエピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；

(iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合のレベルを検出し、かつ/又は測定する工程；

(v) 工程(iv)において測定されたバイオマーカー（複数可）のレベルを、対象における該疾患の存在を示すものとして使用する工程；及び

(vi) 工程(v)において患者が該疾患を有するものとして診断された対象に外科的処置を行い、又は治療薬を投与する工程、を含む、前記工程が提供される。

【0104】

本明細書に記載のように、使用されるヒストンH1結合剤に応じてどのフラクションが単離されるか、及びネガティブ又はポジティブ選択法が要求されるかどうか、明らかとなる。

【0105】

本明細書に記載のように、本発明の方法では、2つの免疫アッセイの使用を組み合わせることができる。従って、本発明のさらなる態様によると、動物又はヒト対象における癌の治療方法であって：

(i) 対象から生体試料を取得する工程；

(ii) 後成的特徴を含み、またヒストンH1をも含む無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は特定の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH1と結合するように方向づけられる、前記工程；

(iii) 特定の後成的特徴を含み、ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方であり得る無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって、試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方は任意のヒストンH2、H3、若しくはH4エピトープ、任意のDNAエピトープ、又はヒストンH1エピトープ以外のクロマチン断片に存在する任意の他のエピトープを含む、共通のコアヌクレオソームエピトープと結合するように方向づけられる、前記工程；

(iv) 工程(ii)及び(iii)におけるバイオマーカー（複数可）の測定レベルを対象におけ

る該癌の存在を示すものとして使用する工程；並びに

(v) 工程(iv)において患者が該癌を有するものとして診断された対象に外科的処置を行い、又は治療薬を投与する工程、を含む、前記方法が提供される。

【0106】

本明細書に記載の方法は、1以上の対照の生体試料中に存在するバイオマーカー（複数可）のレベルを比較することをさらに含み得る。一実施態様において、1以上の対照由来の生体試料を健常（すなわち、「正常な」）患者（複数可）及び/又は関連する良性疾患を有する患者（複数可）から採取する。さらなる実施態様において、1以上の対照由来の生体試料を健常患者（複数可）から採取する。

【0107】

従って、本発明のさらなる態様によると、その必要がある個体において癌を治療する方法であって、対照対象から取得した生体試料中の該バイオマーカー（複数可）のレベルと比較したときに、生体試料中の本明細書に記載のバイオマーカー（複数可）が異なるレベルを有するものとして特定された患者に治療薬を投与する工程を含む、前記方法が提供される。

【0108】

一実施態様において、癌は：乳癌、膀胱癌、結腸直腸癌、皮膚癌（例えば、黒色腫）、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、腸癌、肝癌、子宮内膜癌、リンパ腫、口腔癌、頭頸部癌、白血病、及び骨肉腫から選択される。

【0109】

該疾患を治療するために使用される治療薬及び外科手術法は、当業者に周知である。癌の治療方法には、これらに限定はされないが、外科手術、化学療法、放射線療法、又は他の治療薬（例えば、薬物又は生物学的治療、例えばモノクローナル抗体）がある。

【0110】

（使用）

本発明のさらなる態様に従って、生体試料から腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームを検出し、単離し、かつ/又は精製するためのヒストンH1結合剤の使用が提供される。あるいは、本発明のさらなる態様に従って、生体試料由来の健常組織から無細胞ヌクレオソームを検出し、単離し、かつ/又は精製するためのヒストンH1結合剤の使用が提供される。本明細書に記載のように、ヒストンH1の存在若しくは不存在、又は特定のヒストンH1バリエーション及び修飾の存在は、腫瘍又は健常組織を起源とする無細胞ヌクレオソームと関連付けられており、従ってヒストンH1結合剤は該ヌクレオソームを検出するためのバイオマーカーとして使用することができる。

【0111】

一実施態様において、無細胞ヌクレオソームを単離し、かつ/又は精製する。

【0112】

（キット）

本発明のさらなる態様に従って、本明細書に記載の方法のいずれかにおけるヒストンH1結合剤を含むキットの使用が提供される。

【0113】

本明細書に記載の実施態様が、本発明の全ての態様に適用され得ることが理解されよう。さらに、本明細書で引用される特許及び特許出願を含むがこれらに限定はされない全ての刊行物は、完全に記載されているかのように参照により本明細書に組み込まれている。

【実施例】

【0114】

ここで、本発明を以下の非限定的な実施例を参照して例示する。

【0115】

（実施例1）

ヒストンH1バリエーションH1.0、H1.10、又はH1.Xと特異的に結合するように方向づけられた抗体を、製造業者の推奨する方法によってビオチン化し、ストレプトアビジンでコーテ

10

20

30

40

50

ィングされた磁気ビーズ (DynaI) 上に固定化する。ビーズを磁気分離システムを使用して、ローディング緩衝液で数回洗浄する。癌患者から採取された血清又は血漿をローディング緩衝液中で希釈し、ビーズに加える。ヒストンH1バリエーションを含む健常細胞を起源とするヌクレオソームをビーズに吸着させる。腫瘍を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1バリエーションを含まない) は溶液中に残る。磁気分離によってビーズを除去して、腫瘍を起源とするヌクレオソームの溶液を残す。ヌクレオソームに会合しているctDNAをフェノール/クロロホルム法又は他の標準的抽出法によって抽出する。抽出されたDNAは癌の遺伝学的又は後成的特徴について分析することができる。

【0116】

(実施例2)

ヒストンH1バリエーションH1.0、H1.10、又はH1.Xと特異的に結合するように方向づけられた抗体を、固相の製造業者の推奨する方法によって固体支持体上に固定化し、アフィニティー精製クロマトグラフィーカラムを作製する。癌患者から採取した血清又は血漿をローディング緩衝液で希釈し、カラムに加える。ヒストンH1バリエーションを含む健常細胞を起源とするヌクレオソームをカラムに吸着させる。腫瘍を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1バリエーションを含まない) は溶液中に残り、カラムを通過して溶出液として収集される。ヌクレオソームに会合しているctDNAをフェノール/クロロホルム法又は他の標準的抽出法によって抽出する。抽出されたDNAは癌の遺伝学的又は後成的特徴について分析することができる。

【0117】

(実施例3)

腫瘍を起源とするヌクレオソーム溶液を、実施例1又は実施例2におけるように固相に固定化された抗H1バリエーション抗体を使用して単離する。溶液中に存在する単離ヌクレオソームを免疫アッセイ又は質量分析を含むプロテオミクス法によって分析する。

【0118】

(実施例4)

ヒストンH1バリエーションH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6と特異的に結合するように方向づけられた抗体を、製造業者の推奨する方法によってビオチン化し、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ (DynaI) 上に固定化する。ビーズを磁気分離システムを使用して、ローディング緩衝液で数回洗浄する。癌患者から採取された血清又は血漿をローディング緩衝液中で希釈し、ビーズに加える。ヒストンH1バリエーションを含む腫瘍を起源とするヌクレオソームをビーズに吸着させる。磁気分離によってビーズを溶液から単離する。ヌクレオソームに会合しているctDNAをフェノール/クロロホルム法又は他の標準的抽出法によって固相ビーズから抽出する。抽出されたDNAは癌の遺伝学的又は後成的特徴について分析することができる。

【0119】

(実施例5)

ヒストンH1バリエーションH1.1、H1.2、H1.3、H1.4、H1.5、又はH1.6と特異的に結合するように方向づけられた抗体を、固相の製造業者の推奨する方法によって固体支持体上に固定化し、アフィニティー精製クロマトグラフィーカラムを作製する。癌患者から採取した血清又は血漿をローディング緩衝液で希釈し、カラムに加える。ヒストンH1バリエーションを含む腫瘍を起源とするヌクレオソームをカラムに吸着させる。健常細胞を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1バリエーションを含まない) は溶液中に残り、カラムを通過する。カラムを洗浄し、ヌクレオソームに会合しているctDNAをフェノール/クロロホルム法又は他の標準的抽出法によって抽出する。抽出されたDNAは癌の遺伝学的又は後成的特徴について分析することができる。

【0120】

(実施例6)

固相に結合した腫瘍を起源とするヌクレオソーム調製物を、実施例4又は実施例5におけるように固相の抗H1バリエーション抗体を使用して単離する。単離ヌクレオソームを免疫アッセイ

10

20

30

40

50

又は質量分析を含むプロテオミクス法によって分析する。

【0121】

(実施例7)

ヒストンH1それ自体と特異的に結合するように方向づけられた抗体を、製造業者の推奨する方法によってビオチン化し、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ (Dyna1) 上に固定化する。ビーズを磁気分離システムを使用して、ローディング緩衝液中で希釈し、ビーズに加える。ヒストンH1を含むヌクレオソームをビーズに吸着させる。腫瘍を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1を含まない) は溶液中に残る。磁気分離によってビーズを溶液から単離する。いったんビーズを除去したら、溶液中に存在する単離ヌクレオソームを免疫アッセイ又は質量分析を含むプロテオミクス法によって分析する。

10

【0122】

(実施例8)

ヒストンH1それ自体と特異的に結合するように方向づけられた抗体を、固相の製造業者の推奨する方法によって固体支持体上に固定化し、アフィニティー精製クロマトグラフィーカラムを作製する。癌患者から採取した血清又は血漿をローディング緩衝液中で希釈し、カラムに加える。ヒストンH1を含むヌクレオソームをカラムに吸着させる。腫瘍を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1を含まない) は溶液中に残り、カラムを通過する。腫瘍を起源とするヌクレオソームの溶液を溶出液として収集する。溶液中に存在する単離ヌクレオソームをELISA又は質量分析を含むプロテオミクス法によって分析する。

20

【0123】

(実施例9)

腫瘍を起源とするヌクレオソームの溶液を実施例7又は実施例8におけるように調製する。ヌクレオソームに会合しているctDNAをフェノール/クロロホルム法又は他の標準的な抽出法によって溶液から抽出する。抽出DNAを癌の遺伝学的又は後成的特徴について分析することができる。

【0124】

(実施例10)

対象から採取された体液試料中の腫瘍を起源とするヌクレオソームは、実施例1~9のいずれかの実施例におけるように、固相に固定化された抗H1抗体を使用して単離する。溶液中に存在する単離ヌクレオソーム及び/又は会合しているDNAを当技術分野で公知の方法により分析する。

30

【0125】

(実施例11)

ヒストンH1それ自体、又はヒストンH1バリエーションと特異的に結合するように方向づけられた抗体を、製造業者の推奨する方法によってビオチン化し、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズ (Dyna1) 上に固定化する。ビーズを磁気分離システムを使用して、ローディング緩衝液中で数回洗浄する。癌患者から採取された血清又は血漿をローディング緩衝液中で希釈し、ビーズに加える。ヒストンH1バリエーションを含む健常細胞を起源とするヌクレオソームをビーズに吸着させる。腫瘍を起源とするヌクレオソーム (ヒストンH1バリエーションを含まない) は溶液中に残る。磁気分離によってビーズを除去して、主に腫瘍を起源とするものであるヌクレオソームの溶液を残す。続いて、腫瘍ヌクレオソームの溶液をメチル化DNAについて、固相の抗ヒストンH2、H3、及び/又はH4エピトープ又はインタクトなヌクレオソームと結合する抗ヌクレオソーム捕捉抗体並びにビオチン化モノクローナル抗5-メチルシトシン検出抗体を使用する、ヌクレオソームに関連するヌクレオチド5-メチルシトシンに対するELISA法を使用して、以下のようにアッセイする：抗ヒストンH2、H3、又はH4抗体の0.1 Mリン酸緩衝液 pH7.4中の溶液をマイクロタイターウェル (100 µL/ウェル) に加え、4 °Cで一晩インキュベートし、ウェルを捕捉抗体でコーティングする。余分な抗ヒストン抗体をデカントで捨てる。ウシ血清アルブミンの溶液 (20 g/L) をウェルに加え (200 µL/ウェル)、室温で30分間インキュベートしてウェル上の余分な

40

50

タンパク質結合部位をブロッキングする。余分なウシ血清アルブミン溶液をデカントで捨て、ウェルを洗浄緩衝液で3回洗浄した（200 μ L/ウェル、1% Tween 20を含む0.05 M トリス/HCl緩衝液 pH 7.5）。試料（10 μ L/ウェル）及びアッセイ緩衝液（50 μ L/ウェル、0.9% NaCl、0.05% デオキシコール酸ナトリウム、及び1% Nonidet P40代替品を含む0.05M トリス/HCl pH 7.5）をウェルに加え、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートする。試料及びアッセイ緩衝液の混合物をデカントで捨て、ウェルを洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄する。ビオチン化抗5-メチルシトシン検出抗体の溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートする。余分な検出抗体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄する。ストレプトアビジン-セイヨウサビペルオキシダーゼ複合体を含む溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートする。余分な複合体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄する。発色基質溶液（100 μ L/ウェル、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩）を加え、穏やかに攪拌しながら室温で20分間インキュベートする。ウェルの405 nmの波長での光学密度（OD）を標準的なマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。ヌクレオソーム関連抗5-メチルシトシンの濃度の増加に伴い色が増加する用量反応曲線が観察され、5-メチルシトシンの非存在下（ウシ胎仔血清）では低いバックグラウンドシグナルが観察される。ELISAシグナルが陽性であることは、(i) ヒストンH1を含むヌクレオソームがアフィニティー精製によって除去され、(ii) 捕捉抗体が試料中のヒストンH2、H3、及び/又はH4エピトープと結合し、かつ(iii) 検出抗体がDNAの5-メチルシトシン成分と結合する場合に、ELISAによって検出された5-メチルシトシンが、ヒストンタンパク質（ただし、ヒストンH1ではない）及びDNAの両方を含むインタクトなヌクレオソーム内に取り込まれていることを示唆している。

【0126】

（実施例12）

対象から採取された体液試料中の腫瘍を起源とするヌクレオソームを、実施例11におけるように固相に固定化した抗H1抗体を使用して単離する。単離ヌクレオソームを実施例11に記載のELISA法によって分析する。ただし、ビオチン化モノクローナル抗修飾ヒストン検出抗体；例えば、H3K9(Me)₃と結合するように方向づけられた抗体を使用する。

【0127】

（実施例13）

対象から採取された体液試料中の腫瘍を起源とするヌクレオソームを、実施例11におけるように固相に固定化した抗H1抗体を使用して単離する。単離ヌクレオソームを実施例11に記載のELISA法によって分析する。ただし、ビオチン化モノクローナル抗ヒストンアイソフォーム検出抗体；例えば、H2AZと結合するように方向づけられた抗体を使用する。

【0128】

（実施例14）

対象から採取された体液試料中の腫瘍を起源とするヌクレオソームを、実施例11におけるように固相に固定化した抗H1抗体を使用して単離する。単離ヌクレオソームを実施例11に記載のELISA法によって分析する。ただし、単離循環無細胞ヌクレオソームに付加する非ヒストンタンパク質と結合するように方向づけられたビオチン化モノクローナル；例えば、アンドロゲン受容体と結合するように方向づけられた抗体を使用する。その結果は、関心のあるタンパク質に付加した腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームが、対象の血液循環（又は、他の体液）中に存在することを示す。

【0129】

（実施例15）

血清試料を29名の健常対象、29名の結腸直腸癌と診断された対象、及び11名の膵癌と診断された対象から取得した。

【0130】

プラスチックのマイクロタイターウェルを非ヒストンクロマチンタンパク質と結合する

10

20

30

40

50

ように方向づけられた抗体でコーティングし、標準的な手順に従いブロッッキングした。ヒストンH1それ自体と結合するように方向づけられた抗体及び全ての又は大部分のヌクレオソームに存在する共通のコアヒストンと結合するように方向づけられた抗体をビオチン化により標識した。2つの免疫アッセイを各試料に対し実施した。

【0131】

第1の免疫アッセイでは；試料（10 μ L/ウェル）及びアッセイ緩衝液（50 μ L/ウェル、0.9% NaCl、0.05% デオキシコール酸ナトリウム、及び1% Nonidet P40代替品を含む0.05M トリス/HCl pH 7.5）をウェルに加え、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートした。試料及びアッセイ緩衝液の混合物をデカントで捨て、ウェルを洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。ビオチン化抗ヒストンH1検出抗体の溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートした。余分な検出抗体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。ストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体を含む溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。余分な複合体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。発色基質溶液（100 μ L/ウェル、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩）を加え、穏やかに攪拌しながら室温で20分間インキュベートした。ウェルの405 nmの波長での免疫アッセイ光学密度1（OD1）を標準的なマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。全ての測定を2連で実施し、結果の平均を使用した。

【0132】

第2の免疫アッセイでは；試料（10 μ L/ウェル）及びアッセイ緩衝液（50 μ L/ウェル、0.9% NaCl、0.05% デオキシコール酸ナトリウム、及び1% Nonidet P40代替品を含む0.05M トリス/HCl pH 7.5）をウェルに加え、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートした。試料及びアッセイ緩衝液の混合物をデカントで捨て、ウェルを洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。ビオチン化抗コアヌクレオソーム検出抗体の溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で90分間インキュベートした。余分な検出抗体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。ストレプトアビジン-セイヨウワサビペルオキシダーゼ複合体を含む溶液を加え（50 μ L/ウェル）、穏やかに攪拌しながら室温で30分間インキュベートした。余分な複合体をデカントで捨て、ウェルを再度洗浄緩衝液（200 μ L/ウェル）で3回洗浄した。発色基質溶液（100 μ L/ウェル、2,2'-アジノビス[3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸]-ジアンモニウム塩）を加え、穏やかに攪拌しながら室温で20分間インキュベートした。ウェルの405 nmの波長での免疫アッセイ光学密度2（OD2）を標準的なマイクロタイタープレートリーダーを使用して測定した。全ての測定を2連で実施し、結果の平均を使用した。

【0133】

各試料に対し比OD2：OD1を計算した。69名全ての対象についてのOD2：OD1比の結果を図1に示す。29名の健常対象について、認められた免疫アッセイ比の平均は8.7であった。29名の結腸直腸癌と診断された対象について、比の平均は15.9であった。11名の膵癌と診断された対象について、比の平均は17.1であった。このことは、比の増加が癌を起源とするヌクレオソームと関連付けられたことを実証する。

【0134】

さらに、カットオフレベルを上げながら、各対象についての個別の結果を癌のバイオマーカーとして使用した。カットオフを12とすると；比は膵癌と診断された対象の73%（11名中8名）、及び臨床的特異度79%で結腸直腸癌と診断された対象の41%（29名中12名）に対し陽性の結果を与えた（29名の健常対象のうち、6名が偽陽性の結果）。カットオフを22とすると；比は膵癌と診断された対象の36%（11名中4名）、及び臨床的特異度93%で結腸直腸癌と診断された対象の34%（29名中10名）に対し陽性の結果を与えた（29名の健常対象のうち、2名が偽陽性の結果）。図1の結果は、本明細書に記載の方法が癌を検出するために使用できることを示している。これらの結果はまた、本明細書に記載の組合わせた免疫アッセイの結果を、癌疾患の組合わせバイオマーカーとして使用することができ

ることを実証する。

【 0 1 3 5 】

(参考文献)

【 化 1 】

Crowley *et al*, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 472-484, 2013.

Fong *et al*, Clinical Chemistry 55(3), 587-589, 2009.

Grutzmann *et al*, PLoS ONE 3(11): e3759. doi:10.1371/journal.pone.0003759, 2008.

Guerrero-Preston *et al*, Epigenetics 2(4), 223-226, 2007.

Holdenrieder *et al*, Int J Cancer 95, 114-120, 2001.

10

Holdenrieder and Stieber, Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences; 46(1): 1-24, 2009.

Izzo and Schneider, (2015) Biochimica et Biophysica Acta S1874-9399 (15) 189-3

Jung *et al*, Clinica Chimica Acta, 411, 1611-1624, 2010.

Karczarski *et al*, Clinical Proteomics, 11:24, 2014.

Newman *et al*, Nature Medicine 20(5), 548-554, 2014.

Scaffidi, (2015) BBA – Gene Reg. Mechanisms: doi: 10.1016/j.bbagr.2015.09.008

Schwarzenbach *et al*, Nature Reviews Cancer, 11(6), 426-437, 2011.

20

Soares *et al*, Cancer 85(1), 112-118, 1999.

Zhou *et al*, Seminars in Oncology, 39(4), 440-448, 2012.

本件出願は、以下の構成の発明を提供する。

(構成 1)

生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームをアフィニティー精製によって分析する方法であって：

(i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；

(ii) 該試料からヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；及び

(iii) 免疫アッセイ又は質量分析により単離ヌクレオソームを分析する工程、を含む、前記方法。

30

(構成 2)

前記ヒストンH1結合剤が：ヒストンH1タンパク質、バリエント、アイソフォーム、又はそれらの修飾と結合する結合剤から選択される、構成1記載の方法。

(構成 3)

前記ヒストンH1結合剤が：ヒストンH1タンパク質又はH1.0、H1.10、若しくはH1.Xから選択されるヒストンH1バリエントと結合する結合剤から選択される、構成1又は2記載の方法。

(構成 4)

前記単離ヌクレオソームを：ヒストンの翻訳後修飾、ヒストンアイソフォーム、修飾ヌクレオチド、又は付加非ヒストンタンパク質から選択される後成的特徴を含むかどうかについて免疫アッセイ又は質量分析により分析する、構成1～3のいずれか1項記載の方法。

40

(構成 5)

前記単離ヌクレオソームを分析する工程が、免疫アッセイを含む、構成1～4のいずれか1項記載の方法。

(構成 6)

前記単離ヌクレオソームを分析する工程が、質量分析を含む、構成1～4のいずれか1項記載の方法。

(構成 7)

生体試料から精製腫瘍DNAを単離するための方法であって：

50

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤と接触させる工程；
- (ii) ヒストンH1結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 工程(ii)において単離されたヌクレオソーム試料からDNAを抽出する工程；及び
- (iv) 抽出されたDNAを分析する工程、を含む、前記方法。

(構成8)

前記抽出されたDNAを分析する工程が：DNA配列決定法、メチル化DNA配列決定分析、PCR、BEAMing、NGS（標的型又は全ゲノム型）、デジタルPCR、cold PCR（低変性温度のPCRによる共増幅）、MAP（MIDI活性化加ピロリン酸分解）、PARE（個人化された再配列末端の分析）、又は質量分析を含む、構成7記載の方法。

(構成9)

前記単離ヌクレオソームをヒストンH3.1及び/又はH3.2及び/又はH3t結合剤と接触させることをさらに含む、構成1～8のいずれか1項記載の方法。

(構成10)

生体試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの後成的エピトープを検出するための免疫アッセイ法であって：

- (i) 該試料をヒストンH1結合剤を含む第1の結合剤と接触させる工程；
- (ii) 該第1の結合剤と結合しないヌクレオソームを単離する工程；
- (iii) 該ヌクレオソームを該エピトープと結合する第2の結合剤と接触させる工程；
- (iv) 該第2の結合剤の該エピトープとの結合を検出し、かつ/又は定量化する工程；及び

(v) 該試料中の腫瘍由来ヌクレオソームの特定のエピトープの存在の尺度として、そのような結合の存在又は程度を使用する工程、を含む、前記方法。

(構成11)

前記エピトープがヒストン修飾を含む、構成10記載の方法。

(構成12)

前記ヒストン修飾がH3K27Ac及び/又は5-メチルシトシンを含む、構成11記載の方法。

(構成13)

前記エピトープが修飾ヌクレオチドを含む、構成10記載の方法。

(構成14)

前記エピトープがヒストンH2A、H2B、H3、又はH4バリエーション又はアイソフォームを含む、構成10記載の方法。

(構成15)

前記エピトープがヌクレオソーム付加物又はそのバリエーションを含む、構成10記載の方法。

(構成16)

前記生体試料が、血液、血清、血漿、月経血、脳脊髄液（CSF）、子宮内膜液、尿、唾液、若しくは他の体液（糞便、涙液、滑液、喀痰）、呼気、例えば濃縮呼気、又はそれらからの抽出物若しくは精製物、又はそれらの希釈物を含む、構成1～15のいずれか1項記載の方法。

(構成17)

前記生体試料が血液、血清、又は血漿試料を含む、構成16記載の方法。

(構成18)

動物又はヒト対象における癌を検出するための方法であって：

- (v) 該対象から生体試料を取得する工程；
- (vi) 後成的特徴を含み、またヒストンH1をも含む無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイによって該試料を分析する工程であって、該結合剤のうちの一方は特定の後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方はヒストンH1と結合するように方向づけられる、前記工程；
- (vii) 該特定の後成的特徴を含み、ヒストンH1を含むもの及び含んでいないものの両方であり得る循環無細胞ヌクレオソームについて、2つの結合剤を使用する免疫アッセイに

10

20

30

40

50

よって、該試料を分析する工程であって、該結合剤のうち的一方は該後成的特徴と結合するように方向づけられ、他方は任意のヒストンH2、H3、若しくはH4エピトープ、任意のDNAエピトープ、又はクロマチン断片に存在するヒストンH1エピトープ以外の任意の他のエピトープを含む、共通のコアヌクレオソームエピトープと結合するように方向づけられる、前記工程；並びに

(viii) 工程(ii)及び(iii)で得られた免疫アッセイの結果の組合わせを該対象における該癌の存在を示す組合わせバイオマーカーとして使用する工程、を含む、前記方法。

(構成19)

前記癌が：乳癌、膀胱癌、結腸直腸癌、皮膚癌（例えば、黒色腫）、卵巣癌、前立腺癌、肺癌、膵癌、腸癌、肝癌、子宮内膜癌、リンパ腫、口腔癌、頭頸部癌、白血病、及び骨肉腫から選択される、構成18記載の方法。

(構成20)

生体試料由来の腫瘍を起源とする無細胞ヌクレオソームを検出し、単離し、かつ/又は精製するためのヒストンH1結合剤の使用。

(構成21)

構成1～19のいずれか1項記載の方法における、ヒストンH1結合剤を含むキットの使用。

10

【図1】

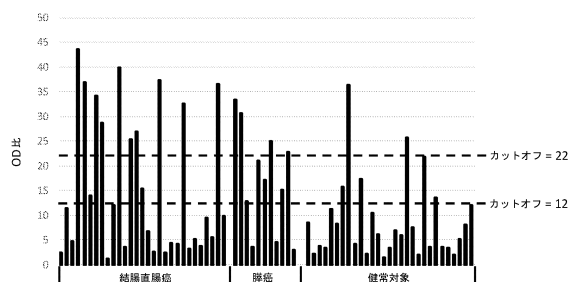


図1

フロントページの続き

(72)発明者 マーク エドワード エックレストン
ベルギー ビーイー 5032 イスネス ルエ プホカス レジュネ 22 シー/オー ベル
ジアン ポリション エスピーアールエル

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特表2015-500478(JP,A)
特表2014-531573(JP,A)
特表2014-529405(JP,A)
米国特許出願公開第2013/0230858(US,A1)
国際公開第2005/019826(WO,A1)
国際公開第2013/030578(WO,A2)
Jun Sakamoto, Immunoprecipitation of nucleosomal DNA is a novel procedure to improve the sensitivity of serum screening for the p16 hypermethylation associated with colon cancer, Cancer Epidemiology, 2010年, Vol.34, Page.194-199
Hye Ryung Jung, Quantitative Mass Spectrometry of Histones H3.2 and H3.3 in Suz12-deficient Mouse Embryonic Stem Cells Reveals Distinct, Dynamic Post-translational Modifications at Lys-27 and Lys-36, Molecular & Cellular Proteomics, 2010年 5月 1日, Vol.9 No.5, Page.838-850
Jakub Karczmarski, Histone H3 lysine 27 acetylation is altered in colon cancer, Clinical Proteomics, 2014年, Page.11:24
Andreas Lennartsson, Histone modification patterns and epigenetic codes, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2009年 9月, Vol.1790 No.9, Page.863-868

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/574

C12N 15/10

G01N 27/62

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/BIOSIS(STN)