

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047224**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.06.21

(21) Номер заявки
202291324

(22) Дата подачи заявки
2020.12.02

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(54) **ПРИМЕНЕНИЕ БЕСКЛЕТОЧНЫХ НУКЛЕОСОМ В КАЧЕСТВЕ БИОМАРКЕРОВ**

(31) **62/942,596; 63/088,408**

(32) **2019.12.02; 2020.10.06**

(33) **US**

(43) **2022.10.06**

(86) **PCT/EP2020/084328**

(87) **WO 2021/110776 2021.06.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БЕЛЬДЖИАН ВОЛИШН СРЛ (BE)

(72) Изобретатель:
Микаллеф Жакоб Винсен, Уилсон-Роблс Хезер, Экклстон Марк Эдвард, Эрцог Мариэльль Шанталь Андре, Террелл Джейсон Брэдли (BE)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В., Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)

(56) **WO-A1-2019169263**
WO-A1-2017068359
M. T. MCCABE ET AL.: "Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27)", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 8, 21 February 2012 (2012-02-21), pages 2989-2994, XP055075955, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1116418109, the whole document
BOHENG LI ET AL.: "EZH2 abnormalities in lymphoid malignancies: underlying mechanisms and therapeutic implications", JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY, vol. 12, no. 1, 21 November 2019 (2019-11-21), XP055769518, DOI: 10.1186/S13045-019-0814-6, the whole document

WO-A1-2016067029

STEFAN HOLDENRIEDER ET AL.: "Nucleosomes in serum of patients with benign and malignant diseases", INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, vol. 95, no. 2, 20 March 2001 (2001-03-20), pages 114-120, XP055566675, US ISSN: 0020-7136, DOI: 10.1002/1097-0215(20010320)95:2<114::AID-IJC1020>3.0.CO;2-Q, the whole document

STEFAN HOLDENRIEDER ET AL.: "Clinical Relevance of Circulating Nucleosomes in Cancer", ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 1137, no. 1, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 180-189, XP055046551, ISSN: 0077-8923, DOI: 10.1196/annals.1448.012, the whole document

WO-A2-2013030578

HEIDI SCHWARZENBACH ET AL.: "Cell-free nucleic acids as biomarkers in cancer patients", NATURE REVIEWS CANCER, vol. 11, no. 6, 12 May 2011 (2011-05-12), pages 426-437, XP055247315, London ISSN: 1474-175X, DOI: 10.1038/nrc3066, the whole document, abstract

US-A1-2013230858

HERRANZ MICHEL ET AL.: "DNA methylation and histone modifications in patients with cancer: potential prognostic and therapeutic targets", ANTIBODY-DRUG CONJUGATES; IN: METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745; VOL. 263; [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY; ISSN 1064-3745], HUMANA PRESS, US, vol. 361, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 25-62, XP009115201, ISBN: 978-1-62703-541-5, the whole document

WO-A1-2017001863

WO-A1-2017001864

US-A1-2014107039

WO-A2-2013084002

EP-A1-2282208

(57) Изобретение относится к бесклеточным нуклеосомам как биомаркерам в образцах плазмы крови при онкологических заболеваниях сосудистой системы или системы крови.

047224 B1

047224 B1

Область техники

Данное изобретение относится к бесклеточным нуклеосомам как биомаркерам в образцах плазмы крови при онкологических заболеваниях сосудистой системы или системы крови.

Уровень техники

Онкологические заболевания системы крови представляют собой онкологические заболевания, поражающие кровь, костный мозг и лимфатические узлы. К ним относятся лейкоз, лимфома и миелома, называемые так в зависимости от типа пораженных клеток. Лейкоз - это онкологическое заболевание клеток крови, которое, как правило, начинается в костном мозге и распространяется по кровотоку. При лейкозе костный мозг производит мутированные клетки и распространяет их в кровь, где они растут и вытесняют здоровые клетки крови. Лимфомы поражают клетки лимфатической системы. При лимфомах иммунокомпетентные клетки, называемые лимфоцитами, бесконтрольно растут и накапливаются в лимфатических узлах, селезенке, в других тканях лимфатической системы или в соседних органах. Миелома, также известная как множественная миелома, развивается в костном мозге и поражает плазматические клетки, которые вырабатывают антитела, атакующие инфекции и заболевания. Примеры онкологических заболеваний системы крови включают в себя острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ, англ. "ALL"), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ, англ. "AML"), лимфому Ходжкина (ЛХ, англ. "HL") и неходжкинскую лимфому (НХЛ, англ. "NHL").

Ссылки на "острый лейкоз" означают, что такое онкологическое заболевание прогрессирует быстро и агрессивно, и, как правило, требует немедленного лечения. ОЛЛ связан с образованием большого числа незрелых лимфоцитов, которые неспособны бороться с инфекцией. Это приводит к тому, что в кровотоке пациента становится меньше места для здоровых лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов. В результате этого пациент, как правило, страдает от ослабленной иммунной системы и симптомов анемии, таких как усталость, одышка и повышенный риск чрезмерного кровотечения. Риск развития ОЛЛ наиболее высок у детей в возрасте до 5 лет, и ОЛЛ является наиболее распространенным типом лейкоза, который поражает детей. Затем риск медленно снижается к возрасту около 25 лет и снова начинает медленно расти после возраста в 50 лет. В целом, около 4 из каждых 10 случаев ОЛЛ приходится на взрослых.

ОМЛ поражает миелобласты, что приводит к накоплению аномальных моноцитов и гранулоцитов в костном мозге. ОМЛ может также поражать стволовые миелоидные клетки, приводя к образованию аномальных эритроцитов или тромбоцитов. Как и при ОЛЛ, это приводит к тому, что у пациента снижаются уровни здоровых лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов в кровотоке. ОМЛ является одним из наиболее распространенных видов лейкоза у взрослых, и средний возраст на момент постановки диагноза составляет 68 лет.

ЛХ и НХЛ представляют собой два основных типа лимфомы. ЛХ имеет особенный вид под микроскопом и содержит клетки, называемые клетками Рид - Штернберга (тип В-лимфоцитов, которые стали злокачественными), в то время как НХЛ выглядит иначе под микроскопом и не содержит клеток Рид - Штернберга. Большинство лимфом относятся к НХЛ, и лишь около 1 из 5 представляет собой ЛХ. НХЛ представляет собой онкологическое заболевание, поражающее лимфоциты и обычно начинающееся в лимфатических узлах или лимфатической ткани. Это один из наиболее распространенных видов онкологических заболеваний у детей, подростков и молодых людей.

Современные способы диагностики лейкоза и миеломы включают в себя выполнение общего анализа крови (ОАК, англ. "CBC") для выявления аномальных уровней лейкоцитов по сравнению с эритроцитами и тромбоцитами. Тем не менее, повышенный уровень лейкоцитов не является специфичным для пациентов со злокачественными новообразованиями системы крови; он также может быть результатом продолжающейся реакции на инфекцию или другой воспалительный процесс. При лимфоме могут применяться рентгенография, компьютерная томография или ПЭТ-сканирование для выявления увеличенных лимфатических узлов, однако это также неспецифично.

Для подтверждения диагноза онкологического заболевания системы крови необходима биопсия костного мозга или лимфатических узлов. Поэтому гипердиагностика онкологических заболеваний системы крови на ранней стадии диагностического процесса может привести к необоснованным биопсиям, которые являются инвазивными, потенциально опасными и относительно дорогостоящими для медицинских учреждений. Для подтверждения диагноза онкологического заболевания системы крови могут также применяться цитогенетический анализ и/или иммунофенотипирование, однако выполнение данных анализов является дорогостоящим, и поэтому они обычно применяются только на поздней стадии диагностического процесса.

Ангиосаркома человека представляет собой редкое онкологическое заболевание сосудистой системы, поражающее эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды. Гемангиосаркома собак также представляет собой онкологическое заболевание, включающее в себя пролиферацию эндотелия сосудов или стенок кровеносных сосудов, и является распространенным онкологическим заболеванием собак, которое также трудно диагностировать. Онкологический заболевания у собак встречается чаще, чем у людей, как правило, как из-за генетических последствий инбридинга, так и вследствие того, что собаки имеют более короткую продолжительность жизни, чем люди, и обычно заболевают онкологическим заболеванием в возрасте 8 лет и старше. Выявление и диагностика онкологических заболеваний у

животных представляет дополнительные трудности по сравнению с диагностикой онкологических заболеваний у людей. Выявление онкологического заболевания у животных, не являющихся людьми, часто включает в себя сканирование, например, с помощью магнитно-резонансной томографии, или МРТ-сканирования, но животные не будут оставаться неподвижными в течение времени, необходимого для сканирования, и поэтому должны находиться под наркозом. Медицинская страховка для домашних животных встречается редко и может не покрывать диагностику или терапию онкологического заболевания, что делает указанные исследования финансово недоступными для многих владельцев домашних животных. В дополнение к этому, анализы крови человека на белки - маркеры онкологического заболевания обычно не выявляют белки животного происхождения, поэтому в ветеринарной онкологии доступно меньше анализов крови.

Ранее авторы работы Holdenrieder et al. (2001) Int J Cancer 95: 114-120 описали определение уровня нуклеосом в образцах сыворотки крови пациентов с доброкачественными и злокачественными заболеваниями. Однако результаты, представленные для образцов сыворотки крови, не подразумевали, что существует какое-либо различие между уровнем указанного биомаркера для онкологических заболеваний системы крови, таких как лимфома, по сравнению с другими видами онкологических заболеваний, исследованными в указанной работе. Эпигенетический состав циркулирующих бесклеточных нуклеосом с точки зрения таких их показателей, как модификация гистона, вариант гистона, модификация ДНК и содержание аддуктов, также был исследован в качестве биомаркеров на основе крови при онкологическом заболевании, см. WO 2005/019826, WO 2013/030577, WO 2013/030579 и WO 2013/084002.

В данной области техники сохраняется потребность в обеспечении простых, экономически эффективных способов диагностики онкологических заболеваний сосудистой системы или системы крови, особенно таких, которые способны различать пациентов с другими типами заболеваний или с онкологическими заболеваниями не сосудистой системы или не системы крови, но у которых могут проявляться сходные симптомы.

Краткое описание сущности изобретения

В соответствии с первым аспектом в данном изобретении представлено применение бесклеточной нуклеосомы в качестве биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлено применение бесклеточной нуклеосомы в качестве биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания системы крови.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлено применение бесклеточной нуклеосомы в качестве биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточной нуклеосомы; и

(ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом для диагностики у данного субъекта онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ определения прогноза для субъекта, имеющего онкологическое заболевание сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточной нуклеосомы; и

(ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом в качестве показателя прогноза указанного онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ мониторинга эффективности терапии у субъекта, имеющего, вероятно имеющего или предрасположенного к онкологическому заболеванию сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточной нуклеосомы; и

(ii) сравнение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом с более ранним образцом плазмы крови, полученным от указанного субъекта, для определения эффективности указанной терапии.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1: концентрация бесклеточных нуклеосом, содержащих НЗ. 1, в образцах плазмы крови, полученных от здоровых субъектов-людей и субъектов-людей с острым лимфоцитарным лейкозом (ОЛЛ), острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и неходжкинской лимфомой (НХЛ).

Фиг. 2: концентрация бесклеточных нуклеосом, содержащих НЗ. 1, в образцах плазмы крови, полученных от субъектов-людей с различными видами онкологических заболеваний.

Фиг. 3: показатели оптической плотности (ОП, англ. "OD") в твердофазном иммуоферментном

анализе (ТИФА, англ. "ELISA") бесклеточных нуклеосом, содержащих цитруллинирование H3 (H3cit), в образцах плазмы крови здоровых субъектов-людей по сравнению с: (А) показателями для всех видов онкологических заболеваний системы крови и (В) показателями для субъектов-людей с ОЛЛ, ОМЛ и НХЛ.

Фиг. 4: показатели ОП в ТИФА бесклеточных нуклеосом, содержащих H3K27Me3, в образцах плазмы крови здоровых субъектов-людей по сравнению с: (А) показателями для всех видов онкологических заболеваний системы крови и (В) показателями для субъектов-людей с ОЛЛ, ОМЛ и НХЛ.

Фиг. 5: данные ТИФА в относительных световых единицах (ОСЕ, англ. "RLU") для бесклеточных нуклеосом, содержащих пан-ацетилирование H4 (H4panAc), в образцах плазмы крови здоровых субъектов-людей по сравнению с: (А) показателями для всех видов онкологических заболеваний системы крови, и (В) показателями для субъектов-людей с ОЛЛ, ОМЛ и НХЛ.

Фиг. 6: (А) данные ТИФА (нг/мл) для бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, в образцах плазмы крови, полученных от здоровых субъектов-собак, по сравнению с собаками, у которых диагностирована лимфома, и (В) кривая ROC, показывающая выявление лимфомы у собак с использованием данных по H3.1.

Фиг. 7: (А) данные ТИФА (нг/мл) для бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, в образцах плазмы крови, полученных от здоровых субъектов-собак, по сравнению с собаками, у которых диагностирована гемангиосаркома, и (В) кривая ROC, показывающая выявление лимфомы у собак с использованием данных по H3.1.

Фиг. 8: данные ТИФА для бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1 (нг/мл), и для СРБ (мкг/мл) в образцах плазмы крови, полученных последовательно от 2 субъектов-собак, проходящих лечение гемангиосаркомы.

Фиг. 9: данные ТИФА для бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1 (нг/мл), и для СРБ (мкг/мл) в образцах плазмы крови, полученных последовательно от 2 субъектов-собак, проходящих лечение лимфомы.

Подробное описание сущности изобретения

В соответствии с первым аспектом в данном изобретении представлено применение бесклеточной нуклеосомы в качестве биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови. В частности, указанное онкологическое заболевание представляет собой онкологическое заболевание системы крови.

Нуклеосома представляет собой основную структурную единицу хроматина и состоит из белкового комплекса из восьми высококонсервативных коровых гистонов (состоящего из пары каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4). Вокруг данного комплекса обернуто примерно 146 пар оснований ДНК. Другой гистон, H1 или H5, действует как линкер и участвует в уплотнении хроматина. ДНК намотана вокруг последовательных нуклеосом в структуре, которую часто называют напоминающей "бусины на нитке", и данная структура образует основную структуру открытого хроматина, или эухроматина. В уплотненном хроматине, или гетерохроматине, данная нить свернута и перемотана в замкнутую и сложную структуру (Herranz and Esteller (2007) *Methods Mol. Biol.* 361: 25-62).

Ссылки на "нуклеосому" могут относиться к "бесклеточной нуклеосоме" при выявлении в образцах физиологических жидкостей. Следует понимать, что термин "бесклеточная нуклеосома" по всему тексту данного документа предназначен для включения в себя любого бесклеточного фрагмента хроматина, который включает в себя одну или более нуклеосом. Термины "эпигенетические признаки", "эпигенетические сигнальные признаки" или "эпигенетические сигнальные структуры" бесклеточной нуклеосомы при употреблении в данном документе могут включать в себя, но не ограничиваться ими, одну или более посттрансляционных модификаций гистонов, изоформ гистонов, модифицированных нуклеотидов и/или белков, связанных с нуклеосомой в нуклеосомно-белковом аддукте.

Следует понимать, что бесклеточная нуклеосома может быть выявлена путем связывания с ее компонентом. Термин "ее компонент" при употреблении в данном документе относится к части нуклеосомы, т. е. выявление всей нуклеосомы не требуется. Компонент бесклеточных нуклеосом может быть выбран из группы, состоящей из: гистонового белка (т. е. гистона H1, H2A, H2B, H3 или H4), посттрансляционной модификации гистона, варианта или изоформы гистона, белка, связанного с нуклеосомой (т. е. нуклеосомно-белкового аддукта), фрагмента ДНК, ассоциированного с нуклеосомой, и/или модифицированного нуклеотида, ассоциированного с нуклеосомой. Например, его компонентом может быть гистон (изоформа) H3.1 или гистон H1, или ДНК.

Способы и применения данного изобретения могут измерять уровень (бесклеточных) нуклеосом как таковых. Ссылки на "нуклеосомы как таковые" относятся к общему уровню или концентрации нуклеосом, присутствующих в образце, независимо от любых эпигенетических признаков, которые нуклеосомы могут включать или не включать в себя. Как правило, выявление общего уровня нуклеосом включает в себя выявление гистонового белка, общего для всех нуклеосом, такого как гистон H4. Следовательно, нуклеосомы как таковые могут быть измерены путем выявления корового гистонового белка, такого как гистон H4. Как описано в данном документе, гистоновые белки образуют структурные единицы, известные как нуклеосомы, которые служат для упаковки ДНК в эукариотических клетках. Как со-

общалось ранее в патентном документе WO 2016/067029 (который включен в данный документ посредством ссылки), конкретные варианты гистонов, такие как гистон H3.1, H3.2 или H3t, могут применяться для выделения бесклеточных нуклеосом, происходящих из опухолевых клеток. Следовательно, можно выявить общий уровень бесклеточных нуклеосом опухолевого происхождения.

Нормальный жизненный цикл клеток в организме взрослого человека включает в себя ежедневное возникновение около 10^{11} клеток путем клеточного деления и гибель аналогичного числа, главным образом путем апоптоза. В процессе апоптоза хроматин расщепляется на моонуклеосомы и олигонуклеосомы, которые высвобождаются из клеток. Сообщается, что в нормальных условиях уровни циркулирующих нуклеосом, обнаруживаемые у здоровых субъектов-людей, являются низкими. Повышенные уровни обнаруживаются у субъектов с различными патологическими состояниями, включая многие виды онкологических заболеваний, аутоиммунные заболевания, воспалительные состояния, инсульт и инфаркт миокарда (Holdenreider & Stieber (2009) *Crit Rev Clin Lab Sci*, 46 (1): 1-24).

Современные способы анализа нуклеосом методом ТИФА применяются главным образом в культуре клеток, как правило в качестве способа выявления апоптоза (Salgame et al. (1997) *Nucleic Acids Res*, 25 (3): 680-681; Holdenreider et al. (2001), см. выше; van Nieuwenhuijze et al. (2003) *Ann Rheum Dis*, 62: 10-14), но также применяются для измерения циркулирующих бесклеточных нуклеосом в сыворотке и плазме крови (Holdenreider et al. (2001)). Уровни бесклеточных нуклеосом в сыворотке и плазме крови, высвобождаемых в кровотоке умирающими клетками, были измерены методами ТИФА в исследованиях ряда различных видов онкологических заболеваний для оценки их применения в качестве потенциального биомаркера. Сообщается, что средние уровни циркулирующих нуклеосом являются высокими при большинстве, но не при всех исследованных видах онкологических заболеваний. Однако сообщается, что у пациентов со злокачественными опухолями концентрация нуклеосом в сыворотке крови значительно варьировала, а у некоторых пациентов с прогрессирующим опухолевым заболеванием обнаруживались низкие уровни циркулирующих нуклеосом - в пределах диапазона, измеренного для здоровых субъектов (Holdenreider et al. (2001)).

Бесклеточная нуклеосома может представлять собой моонуклеосому или олигонуклеосому, или их смесь.

Моонуклеосомы и олигонуклеосомы можно выявить с помощью ТИФА, и сообщалось о нескольких способах (например, Salgame et al. (1997); Holdenreider et al. (2001); van Nieuwenhuijze et al. (2003)). В указанных анализах обычно применяют антитело против гистона (например, антитело против H2B, антитело против H3 или антитело против H1, H2A, H2B, H3 и H4) в качестве захватывающего антитела и антитело против ДНК или антитело против комплекса H2A-H2B-ДНК в качестве выявляющего антитела.

Циркулирующие нуклеосомы не являются однородной группой комплексов белок-нуклеиновая кислота. Скорее, они представляют собой гетерогенную группу фрагментов хроматина, возникающих в результате расщепления хроматина при гибели клеток, и включают в себя огромное разнообразие эпигенетических структур, включая конкретные изоформы (или варианты) гистонов, посттрансляционные модификации гистонов, нуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, и белковые аддукты. Специалисты в данной области техники понимают, что повышение уровня нуклеосом связано с повышением некоторых подмножеств циркулирующих нуклеосом, содержащих конкретные эпигенетические сигналы, включая нуклеосомы, содержащие конкретные изоформы (или варианты) гистонов, содержащие конкретные посттрансляционные модификации гистонов, содержащие конкретные нуклеотиды или модифицированные нуклеотиды, и содержащие конкретные белковые аддукты. Анализы для указанных типов фрагментов хроматина известны в данной области техники (например, см. WO 2005/019826, WO 2013/030579, WO 2013/030578, WO 2013/084002, которые включены в данный документ посредством ссылки).

Биомаркером, применяемым в применениях и способах данного изобретения, может быть уровень бесклеточных нуклеосом как таковых и/или эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы. Следует понимать, что термины "эпигенетическая сигнальная структура" и "эпигенетический признак" употребляются в данном документе взаимозаменяемо. Они относятся к конкретным особенностям нуклеосомы, которые могут быть обнаружены. В одном варианте осуществления данного изобретения эпигенетический признак нуклеосомы выбран из группы, состоящей из: посттрансляционной модификации гистона, варианта гистона, конкретного нуклеотида и белкового аддукта.

В одном варианте осуществления данного изобретения эпигенетический признак нуклеосомы включает в себя один или более вариантов или изоформ гистонов. Эпигенетическим признаком бесклеточной нуклеосомы может быть изоформа гистона, такая как изоформа гистона коровой нуклеосомы, в частности изоформа гистона H3. Термины "вариант гистона" и "изоформа гистона" могут употребляться в данном документе взаимозаменяемо. Структура нуклеосомы также может изменяться путем включения альтернативных изоформ или вариантов гистонов, которые являются продуктами разных генов или продуктами сплайсинга и имеют разные аминокислотные последовательности. В данной области техники известно множество изоформ гистонов. Варианты гистонов можно разделить на несколько семейств, которые подразделяются на отдельные типы. Нуклеотидные последовательности большого числа вариантов гистонов известны и общедоступны, например, в базе данных гистонов Национального института

США по исследованию генома человека (NHGRI; Marino-Ramirez et al. The Histone Database: an integrated resource for histones and histone fold-containing proteins. Database Vol.2011; и <http://genome.nhgri.nih.gov/histones/complete.shtml>), в базе данных GenBank (генетическая последовательность NIH), в базе данных нуклеотидных последовательностей EMBL и банке данных ДНК Японии (DDBJ). Например, варианты гистона H2 включают в себя H2A1, H2A2, mH2A1, mH2A2, H2AX и H2AZ. В другом примере изоформы гистона H3 включают в себя H3.1, H3.2 и H3t.

В одном варианте осуществления данного изобретения изоформа гистона представляет собой H3.1. Как показано в представленных в данном документе примерах, H3.1 был эффективен при различении субъектов с онкологическим заболеванием сосудистой системы или системы крови и здоровых субъектов. H3.1 был особенно эффективен в выявлении пациентов с лимфомой, поскольку различили 84% пациентов с НХЛ и здоровых субъектов со специфичностью в 90% (см. табл. 1).

Структура нуклеосомы может изменяться в результате посттрансляционной модификации (ПТМ) гистоновых белков. Как правило, ПТМ гистоновых белков происходит на хвостах коровых гистонов, и распространенные модификации включают в себя ацетилирование, метилирование или убиквитинирование остатков лизина, а также метилирование остатков аргинина и фосфорилирование остатков серина, и многие другие. В данной области техники известно множество модификаций гистонов, и их число увеличивается по мере выявления новых модификаций (Zhao and Garcia, 2015 Cold Spring Harb Perspect Biol, 7: a025064). Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы может представлять собой посттрансляционную модификацию (ПТМ) гистона. ПТМ гистона может представлять собой ПТМ гистона коровой нуклеосомы, например, H3 H2A, H2B или H4, в частности H3, H2A или H2B. В частности, ПТМ гистона представляет собой ПТМ гистона H3. Примеры таких ПТМ описаны в WO 2005/019826.

Например, посттрансляционная модификация может включать в себя ацетилирование, метилирование, которое может быть моно-, ди- или триметилированием, фосфорилирование, рибозилирование, цитруллирование, убиквитинирование, гидроксилирование, гликозилирование, нитрозилирование, глутаминирование и/или изомеризацию (см. Ausio (2001) Biochem Cell Bio 79: 693). В одном варианте осуществления данного изобретения ПТМ гистона выбрана из метилирования или цитруллирования. В другом варианте осуществления данного изобретения ПТМ гистона представляет собой H3K27me3 или H3-цитруллин (H3cit). В еще одном варианте осуществления данного изобретения ПТМ гистона представляет собой H3cit. Как показано в представленных в данном документе примерах, H3cit был наиболее эффективным ПТМ гистона для различения субъектов с онкологическим заболеванием сосудистой системы или системы крови и здоровых субъектов.

Также может быть выявлена группа или класс связанных посттрансляционных модификаций гистонов (а не одну модификацию). Иллюстративный пример, без ограничения, включает в себя 2-направленный иммуноанализ с использованием одного антитела или другого селективного связывающего агента, направленного на связывание с нуклеосомами, и одного антитела или другого селективного связывающего агента, направленного на связывание расматриваемой группы модификаций гистонов. Примеры таких антител, направленных на связывание с группой модификаций гистонов, включают в себя, для иллюстративных целей, без ограничения, антитела против пан-ацетилирования (например, антитело против пан-ацетил H4 [H4panAc]), антитела против цитруллирования или антитела против убиквитина.

В одном варианте осуществления данного изобретения эпигенетический признак нуклеосомы включает в себя одну или более модификаций ДНК. В дополнение к эпигенетической передаче сигналов, опосредованной изоформой гистона нуклеосомы и составом ПТМ, нуклеосомы также различаются по своему нуклеотидному и модифицированному нуклеотидному составу. Глобальное гипометилирование ДНК является отличительным признаком раковых клеток, и некоторые нуклеосомы могут содержать больше остатков 5-метилцитозина (или остатков 5-гидроксиметилцитозина, или других нуклеотидов, или модифицированных нуклеотидов), чем другие нуклеосомы. В одном варианте осуществления данного изобретения модификация ДНК выбрана из 5-метилцитозина или 5-гидроксиметилцитозина.

В одном варианте осуществления данного изобретения эпигенетический признак нуклеосомы включает в себя один или более белково-нуклеосомных аддуктов или комплексов. Другим типом множества циркулирующих нуклеосом являются белково-нуклеосомные аддукты. Уже много лет известно, что хроматин содержит большое количество негистоновых белков, связанных с составляющими его ДНК и/или гистонами. Эти ассоциированные с хроматином белки имеют множество типов и выполняют множество функций, включая факторы транскрипции, факторы усиления транскрипции, факторы подавления транскрипции, ферменты, модифицирующие гистоны, белки для восстановления поврежденных ДНК и многие другие. Эти фрагменты хроматина, включающие в себя нуклеосомы и другие негистоновые белки хроматина или ДНК, и другие негистоновые белки хроматина описаны в данной области техники.

В одном варианте осуществления данного изобретения белок, присоединенный к нуклеосоме с формированием аддукта (и который, следовательно, может применяться в качестве биомаркера), выбран из: фактора транскрипции, белка группы высокой подвижности или фермента, модифицирующего хро-

матин. Ссылки на "фактор транскрипции" относятся к белкам, которые связываются с ДНК и регулируют экспрессию генов путем стимулирования (т.е. активаторам) или подавления (т.е. репрессорам) транскрипции. Факторы транскрипции содержат один или более ДНК-связывающих доменов (ДСД, англ. "DBD"), которые присоединяются к специфическим последовательностям ДНК, смежным с генами, которые они регулируют. Все циркулирующие нуклеосомы и нуклеосомные фрагменты, типы или подгруппы, описанные в данном документе, могут быть полезны в данном изобретении.

Следует понимать, что способы и применения данного изобретения могут выявлять больше чем один эпигенетический признак бесклеточных нуклеосом. Множество биомаркеров могут применяться в качестве комбинированного биомаркера. Следовательно, в одном варианте осуществления данного изобретения применение включает в себя больше чем один эпигенетический признак бесклеточных нуклеосом в качестве комбинированного биомаркера. Эпигенетические признаки могут быть одного и того же типа (например, ПТМ, изоформы гистонов, нуклеотиды или белковые аддукты) или различных типов (например, ПТМ в сочетании с изоформой гистона). Например, можно выявлять посттрансляционную модификацию гистона и вариант гистона (т. е. выявлять больше чем один тип эпигенетических признаков). В качестве альтернативы или дополнения, выявляют больше чем один тип посттрансляционной модификации гистона, или выявляют больше чем один тип изоформы гистона. В одном аспекте данного изобретения применение включает в себя посттрансляционную модификацию гистона и изоформу гистона в качестве комбинированного биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови. В одном варианте осуществления данного изобретения комбинированный биомаркер представляет собой НЗ.1 и НЗсit. В альтернативном варианте осуществления данного изобретения комбинированный биомаркер представляет собой НЗ.1 и НЗК27Ме3.

Термин "биомаркер" означает отличительный биологический или полученный биологическим путем индикатор процесса, события или состояния. Биомаркеры могут применяться в способах диагностики, например, клиническом скрининге и оценке прогноза, а также в мониторинге результатов терапии, выявлении пациентов с наибольшей вероятностью клинического ответа на конкретное терапевтическое лечение, скрининге и разработке лекарственных средств. Биомаркеры и способы их применения имеют высокую ценность для выявления новых способов лечения и для выявления новых мишеней для медикаментозного лечения.

Способы и применения, описанные в данном документе, можно протестировать в образцах физиологических жидкостей, в частности в образцах крови, сыворотки крови или плазмы крови. Предпочтительно, используют образцы плазмы крови. Образцы плазмы крови можно собирать в пробирки, содержащие один или более антикоагулянтов, таких как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), гепарин или цитрат натрия, в частности ЭДТА.

Онкологические заболевания системы крови.

Онкологические заболевания системы крови затрагивают систему крови, поэтому их можно также называть "гематологическими видами онкологических заболеваний". Существует 3 основных типа онкологических заболеваний системы крови: лейкозы, которые вызываются быстрым образованием аномальных лейкоцитов; лимфомы, которые вызываются аномальными клетками лимфомы; и миеломы, которые представляют собой онкологическое заболевание плазматических клеток.

В одном варианте осуществления данного изобретения онкологическое заболевание системы крови выбрано из лимфомы, лейкоза, миеломы, хронического миелопролиферативного заболевания, моноклональной гаммапатии неопределенной значимости, миелодиспластического синдрома и амилоидоза. В другом варианте осуществления данного изобретения онкологическое заболевание системы крови выбрано из лейкоза и лимфомы.

Лейкозы поражают лейкоциты и могут быть классифицированы по типу поражаемых лейкоцитов (миелоидные или лимфатические), а также по характеру прогрессирования заболевания (острые или хронические). Идентифицировано несколько типов лейкоза, включая, но не ограничиваясь ими: острый лимфобластный лейкоз (ОЛЛ; альтернативное название - острый лимфоцитарный лейкоз), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ, англ. "AMKL"), острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ, англ. "APL"), детский острый миелоидный лейкоз (Д-ОМЛ, англ. "С-AML"), детский острый лимфоцитарный лейкоз (Д-ОЛЛ, англ. "С-ALL"), хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ, англ. "CEL"), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ, англ. "CLL"), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ, англ. "СML"), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ, англ. "СМML"), хронический нейтрофильный лейкоз, волосатоклеточный лейкоз, ювенильный миеломоноцитарный лейкоз (ЮММЛ, англ. "JМML"), лейкоз больших гранулярных лейкоцитов (ЛБГЛ, англ. "LGLL"), Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз и пролимфоцитарный лейкоз.

В одном варианте осуществления данного изобретения лейкоз представляет собой острый лейкоз, такой как острый лимфоцитарный лейкоз (ОЛЛ), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), острый мегакариобластный лейкоз (ОМКЛ) или острый промиелоцитарный лейкоз (ОПЛ). В другом варианте осуществления данного изобретения лейкоз выбран из острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ). В качестве альтернативы, в одном варианте осуществления данного изобретения

лейкоз представляет собой хронический лейкоз, такой как хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический миеломоноцитарный лейкоз (ХММЛ) или хронический нейтрофильный лейкоз.

И лимфома Ходжкина (ЛХ), и неходжкинская лимфома (НХЛ) являются лимфомами. Большинство пациентов с НХЛ на момент постановки диагноза имеют возраст старше 55 лет, в то время как медианный возраст для постановки диагноза лимфомы Ходжкина составляет 39 лет. В одном варианте осуществления данного изобретения лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ). НХЛ может возникать в лимфатических узлах в любой части тела, в то время как ЛХ, как правило, начинается в верхней части тела, такой как шея, грудь или подмышечные впадины.

Лимфому Ходжкина часто диагностируют на ранней стадии, и поэтому она считается одним из наиболее поддающихся лечению видов онкологических заболеваний. Неходжкинскую лимфому, как правило, не диагностируют до тех пор, пока она не достигнет более поздней стадии, поэтому способы согласно данному изобретению находят особое применение в диагностике НХЛ, где существует необходимость выявления пациентов на ранней стадии заболевания для улучшения результатов лечения. Другие онкологические заболевания, связанные с системой крови

Ангиосаркома и гемангиосаркома представляют собой онкологические заболевания мягких тканей, включающие в себя пролиферацию клеток, выстилающих сосудистую систему, поэтому их можно называть "онкологическими заболеваниями сосудистой системы". Подобно онкологическим заболеваниям системы крови, они тесно связаны с сосудистой сетью, и пораженные клетки находятся в непосредственном контакте с циркулирующим жидким компонентом крови. Авторы данного изобретения показали, что данные виды онкологических заболеваний системы крови связаны с очень высокими уровнями циркулирующих нуклеосом, которые аналогичны уровням, наблюдаемым при лимфоме.

Способы выявления и диагностики.

В данном изобретении представлены способы, которые можно применять при выявлении или диагностике пациентов с онкологическими заболеваниями сосудистой системы или системы крови. Следовательно, в соответствии с другим аспектом, в данном изобретении представлен способ диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом; и
- (ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом для диагностики у данного субъекта онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ диагностики или выявления онкологического заболевания системы крови, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом; и
- (ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом для диагностики у данного субъекта онкологического заболевания системы крови.

В качестве альтернативы, в соответствии с другим аспектом, в данном изобретении представлен способ диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом; и
- (ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом для диагностики у данного субъекта онкологического заболевания сосудистой системы.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ определения прогноза для субъекта, имеющего онкологическое заболевание сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом; и
- (ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом в качестве показателя прогноза указанного онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

Если субъект определен как не имеющий онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, данное изобретение по-прежнему может применяться в целях мониторинга прогрессирования заболевания. Например, если указанное применение включает в себя образец от субъекта, определенного как не имеющий онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, измерения уровня биомаркера можно повторить в другой момент времени, чтобы установить, изменился ли уровень данного биомаркера.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ мониторинга эффективности терапии у субъекта, имеющего, вероятно имеющего или предрасположенного к онкологическому заболеванию сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

- (i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом

для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом; и

(ii) сравнение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом с более ранним образцом плазмы крови, полученным от указанного субъекта, для определения эффективности указанной терапии.

Выявление и/или количественное определение можно выполнять напрямую в очищенном или обогащенном образце нуклеосомы, или косвенно - в его экстракте или в его разбавленном образце. Количественная оценка количества биомаркера, присутствующего в образце, может включать в себя определение концентрации биомаркера, присутствующего в образце. Применения и способы выявления, мониторинга и диагностики в соответствии с описанным в данном документе изобретением полезны для подтверждения наличия заболевания, для мониторинга развития заболевания путем оценки начала и прогрессирования, или для оценки улучшения или регрессии заболевания. Применения и способы выявления, мониторинга и диагностики также полезны в способах оценки клинического скрининга, прогноза, выбора терапии, оценки терапевтической пользы, т. е. для скрининга и разработки лекарственных препаратов.

Выявление или измерение может включать в себя иммуноанализ, иммунохимический, масс-спектроскопический, хроматографический метод, иммунопреципитацию хроматина или биосенсорный метод. В частности, выявление и/или измерение могут включать в себя метод 2-направленного иммуноанализа фрагментов нуклеосом. Такой способ предпочтителен для измерения нуклеосом или встроенных в нуклеосомы эпигенетических признаков *in situ* с использованием двух связывающих агентов, направленных на нуклеосомы, или связывающего агента, направленного на нуклеосомы, в комбинации со связывающим агентом, направленным на модификацию гистона или на вариант гистона, или на модификацию ДНК, или на белковый аддукт. Кроме того, выявление и/или измерение могут включать в себя 2-направленный иммуноанализ с использованием выявляющего меченого связывающего агента, направленного на нуклеосомы, в комбинации с иммобилизованным связывающим агентом, направленным на модификацию гистона или на вариант гистона, или на модификацию ДНК, или на белковый аддукт.

Выявление или измерение уровня биомаркера (-ов) можно выполнять с использованием одного или большего числа реагентов, таких как подходящий связывающий агент. Например, указанные один или более связывающих агентов могут содержать лиганд или связывающий агент, специфичные в отношении желательного биомаркера, например, в отношении нуклеосомы или ее составной части, эпигенетического признака нуклеосомы, структурного/пространственного миметика нуклеосомы или ее составной части, необязательно в комбинации с одним или большим числом интерлейкинов.

Специалисты в данной области техники понимают, что термины "антитело", "связывающий агент" или "лиганд", употребляемые в данном документе, не являются ограничивающими, и предназначены для включения в себя любого связывающего агента, способного связываться с конкретными молекулами или объектами, и что в способе согласно данному изобретению может применяться любой подходящий связывающий агент. Также подразумевается, что термин "нуклеосомы" предназначен для включения в себя мононуклеосом, олигонуклеосом и любых фрагментов хроматина белок - ДНК, которые можно проанализировать в жидких средах.

Способы выявления биомаркеров известны в данной области техники. Реагенты могут включать в себя один или более лигандов или связывающих агентов, например, встречающиеся в природе или химически синтезированные соединения, способные к специфическому связыванию с желательной мишенью. Лиганд или связывающий агент может включать в себя пептид, антитело или его фрагмент, или синтетический лиганд, такой как пластиковое антитело, аптамер или олигонуклеотид, способные к специфическому связыванию с желательной мишенью. Антитело может представлять собой моноклональное антитело или его фрагмент. Следует понимать, что если применяется фрагмент антитела, то он сохраняет способность связывать биомаркер, так что биомаркер можно выявить (в соответствии с данным изобретением). К лиганду/связывающему агенту можно присоединить метку - обнаруживаемый маркер, такой как люминесцентный, флуоресцентный, ферментный или радиоактивный маркер; в качестве альтернативы или дополнения, к лиганду согласно данному изобретению можно присоединить аффинную метку, например, биотиновую, авидиновую, стрептавидиновую или гистидиновую (например, гексагистидиновую) метку. В качестве альтернативы, связывание лиганда можно выявить с помощью технологии, не использующей метки, например, технологии ForteBio Inc.

Термин "выявление" или "диагностика", употребляемый в данном документе, охватывает идентификацию, подтверждение и/или характеристику патологического состояния. Способы выявления, мониторинга и диагностики согласно данному изобретению полезны для подтверждения наличия заболевания, для мониторинга развития заболевания путем оценки начала и прогрессирования, или для оценки улучшения или регрессии заболевания. Способы выявления, мониторинга и диагностики также полезны в способах оценки клинического скрининга, прогноза, выбора терапии, оценки терапевтической пользы, т.е. для скрининга и разработки лекарственных препаратов.

В одном варианте осуществления описанный в данном документе способ повторяют многократно. Указанный вариант осуществления обеспечивает преимущество, заключающееся в том, что результаты выявления можно отслеживать в течение некоторого периода времени. Такая схема обеспечивает преимущество мониторинга или оценки эффективности лечения патологического состояния. Такие способы

мониторинга согласно данному изобретению могут применяться для мониторинга начала, прогрессирования, стабилизации, улучшения, рецидива и/или ремиссии.

В способах мониторинга исследуемые образцы можно собирать дважды или более раз. Указанный способ может дополнительно включать в себя сравнение уровня биомаркера (-ов), присутствующего (-их) в исследуемом образце, с одним или большим числом контрольных образцов и/или с одним или большим числом предшествующих исследуемых образцов, полученных ранее от того же исследуемого субъекта, например, до начала терапии, и/или от того же исследуемого субъекта на более ранней стадии терапии.

Указанный способ может включать в себя выявление изменения природы или количества биомаркера (-ов) в исследуемых образцах, полученных в различные моменты времени.

Изменение уровня биомаркера в исследуемом образце относительно уровня в предшествующем исследуемом образце, полученном ранее от того же исследуемого субъекта, может указывать на благоприятный эффект, например, стабилизацию или улучшение, от указанной терапии в отношении данного нарушения или подозреваемого нарушения. Кроме того, после завершения лечения способ согласно данному изобретению можно периодически повторять для мониторинга рецидива заболевания.

Способы мониторинга эффективности терапии можно применять для мониторинга терапевтической эффективности существующих способов терапии и новых способов терапии у субъектов-людей и субъектов-животных, не являющихся людьми (например, на животных моделях). Указанные способы мониторинга можно включать в скрининг новых лекарственных соединений и комбинаций соединений.

В другом варианте осуществления мониторинг более быстрых изменений вследствие быстросействующих способов терапии можно проводить с более короткими интервалами, составляющими часы или сутки.

Для выполнения способов согласно данному изобретению представлены диагностические или контрольные наборы (или панели). Такие наборы удобным образом содержат один или более лигандов для выявления и/или количественного определения биомаркера согласно данному изобретению, и/или биосенсор, и/или матрицу, как описано в данном документе, необязательно вместе с инструкциями по применению указанного набора.

Другим аспектом данного изобретения является набор для выявления наличия патологического состояния, содержащий биосенсор, способный выявлять и/или количественно определять один или более биомаркеров, как определено в данном документе. При употреблении в данном документе термин "биосенсор" означает что-либо, способное выявлять присутствие биомаркера. Примеры биосенсоров описаны в данном документе. Биосенсоры могут включать в себя связывающий агент-лиганд или лиганды, как описано в данном документе, способные к специфическому связыванию с биомаркером. Такие биосенсоры полезны для выявления и/или количественного определения биомаркера согласно данному изобретению.

Соответственно, биосенсоры для выявления одного или большего числа биомаркеров объединяют в себе распознавание биомолекул с соответствующей возможностью выявления присутствия или количественного определения биомаркера в образце в виде выявляемого сигнала. Биосенсоры можно адаптировать для диагностического тестирования "где угодно", например, в палате, отделении учреждения здравоохранения, в операционной, дома, в полевых условиях и на рабочем месте. Биосенсоры для выявления одного или большего числа биомаркеров согласно данному изобретению включают в себя акустические, плазмонно-резонансные, голографические, биослойно-интерферометрические (БСИ, англ. "BLI") и микросконструированные сенсоры. В биосенсорах для выявления одного или большего числа биомаркеров можно применять напечатанные элементы распознавания, технологию тонкопленочных транзисторов, устройства с магнитно-акустическими резонаторами и другие новые акустоэлектрические системы.

Биомаркеры для выявления наличия заболевания являются важным направлением для выявления новых мишеней и молекул лекарственных препаратов, которые замедляют или останавливают прогрессирование заболевания. Поскольку уровень биомаркера указывает на нарушение и реакцию на лекарственный препарат, биомаркер полезен для идентификации новых терапевтических соединений в анализах *in vitro* и/или *in vivo*. Биомаркеры, описанные в данном документе, можно применять в способах скрининга в отношении соединений, которые модулируют активность данного биомаркера.

Следовательно, в дополнительном аспекте данного изобретения представлено применение связывающего агента или лиганда, как описано, которые могут представлять собой пептид, или антитело или его фрагмент, или аптамер, или олигонуклеотид, направленные на биомаркер согласно данному изобретению; или применение биосенсора, или матрицы, или набора согласно данному изобретению для идентификации вещества, способного стимулировать и/или подавлять выработку данного биомаркера.

Иммуноанализы, описанные в данном документе, включают в себя любой способ, в котором применяются одно или более антител или других специфических связывающих агентов, направленных на связывание с биомаркерами, определенными в данном документе. Иммуноанализы включают в себя 2-направленные иммуноанализы или иммунометрические анализы с использованием ферментативных способов выявления (например, ТИФА), иммунометрические анализы с флуоресцентной меткой, иммунометрические анализы с флуоресцентной меткой с временным разрешением, хемилуминесцентные имму-

нометрические анализы, иммунотурбидиметрические анализы, иммунометрические анализы с меченой частицей и иммунорадиометрические анализы, а также однонаправленные иммуноанализы, иммуноанализы с ограниченным количеством реагента, способы конкурентного иммуноанализа, включающие в себя меченый антиген и меченое антитело, способы иммуноанализа с одним антителом с различными типами меток, включая радиоактивные, ферментативные, флуоресцентные метки, флуоресцентные метки с временным разрешением и меченые частицы. Все указанные способы иммуноанализа хорошо известны в данной области техники; см., например, Salgame et al. (1997) и van Nieuwenhuijze et al. (2003).

Идентификацию, выявление и/или количественное определение можно выполнять любым способом, подходящим для идентификации присутствия и/или количества специфического белка в биологическом образце от субъекта или в очищенном биологическом образце, или в экстрагированном биологическом образце, или в их разбавленном образце. В частности, количественное определение можно выполнять путем измерения концентрации мишени в образце или образцах. Биологические образцы, которые можно исследовать в способе согласно данному изобретению, включают в себя те, что были определены ранее в данном документе. Образцы можно подготавливать, например, при необходимости, разбавлять или концентрировать, и сохранять обычным способом. Данное изобретение находит особое применение с образцами плазмы крови, которые можно получить от субъекта.

Идентификацию, выявление и/или количественное определение биомаркеров можно выполнять путем выявления биомаркера или его фрагмента, например, фрагмента с С-концевым усечением или с N-концевым усечением. Подходящие фрагменты имеют длину больше чем в 4 аминокислоты, например, длину в 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот. В частности, отмечается, что пептиды с той же последовательностью, что и у хвостов гистонов, или с родственной последовательностью, являются особенно подходящими фрагментами гистоновых белков.

Например, выявление и/или количественное определение может быть выполнено одним или большим числом способов, выбранных из группы, состоящей из следующего: SELDI (-TOF), MALDI (-TOF), 1-D анализ на основе геля, 2-D анализ на основе геля, масс-спектрометрия (МС), обращенно-фазовая (ОФ) жидкостная хроматография (ЖХ), фильтрация на основе размеров (гель-фильтрация), ионообменная хроматография, аффинная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), сверхэффективная жидкостная хроматография (СЭЖХ) и другие методики на основе ЖХ или ЖХ-МС. Подходящие методики на основе ЖХ-МС включают в себя ICAT® (Applied Biosystems, Калифорния, США) или iTRAQ® (Applied Biosystems, Калифорния, США). Также можно применять жидкостную хроматографию (например, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) или жидкостную хроматографию низкого давления (ЖХНД)), тонкослойную хроматографию, ЯМР-спектроскопию (спектроскопию ядерного магнитного резонанса).

Способы, включающие в себя выявление и/или количественное определение одного или большего числа биомаркеров согласно данному изобретению, можно выполнять на настольных приборах, или их можно инкорпорировать в одноразовые диагностические или мониторинговые платформы, которые можно применять в нелабораторных условиях, например, в кабинете врача или у постели пациента. Подходящие биосенсоры для осуществления способов согласно данному изобретению включают в себя "кредитные" карты с оптическими или акустическими считывателями. Биосенсоры можно сконфигурировать так, чтобы собранные данные передавались врачу в электронном виде для интерпретации и, таким образом, они могут стать основой для электронной медицины.

Идентификация биомаркеров патологического состояния позволяет интегрировать диагностические процедуры и схемы лечения. Биомаркеры обеспечивают возможность определения терапевтического ответа, отсутствия ответа, неблагоприятного профиля побочных эффектов, степени соблюдения схемы приема лекарственных препаратов и достижения необходимых уровней лекарственных препаратов в сыворотке крови. Биомаркеры можно применять для предупреждения о неблагоприятной реакции на лекарственный препарат. Биомаркеры полезны при разработке персонализированных терапевтических средств, поскольку оценку клинического ответа можно применять для точного подбора доз, минимизации числа назначаемых лекарственных препаратов, сокращения времени достижения эффективной терапии и предотвращения неблагоприятных реакций на лекарственные препараты. Следовательно, путем мониторинга биомаркера согласно данному изобретению можно точно адаптировать лечение к потребностям, определяемым данным нарушением и фармакогеномным профилем данного субъекта и, следовательно, указанный биомаркер можно применять для подбора оптимальной дозы, прогнозирования положительного терапевтического ответа и выявления субъектов с высоким риском серьезных побочных эффектов.

Основанные на биомаркерах анализы обеспечивают первичную оценку "новых" субъектов и обеспечивают объективные показатели для точной и быстрой диагностики, что недостижимо при использовании текущих показателей.

Способы мониторинга биомаркера, биосенсоры и наборы также жизненно важны в качестве инструментов мониторинга субъекта, позволяющих врачу определить, вызван ли рецидив обострением заболевания. Если фармакологическое лечение оценивается как недостаточное, то можно возобновить или

усилить другой вид терапии; при необходимости можно назначить смену терапии. Поскольку биомаркеры чувствительны к степени нарушения, они дают представление о воздействии медикаментозной терапии.

Ссылки на "субъекта" или "пациента" употребляются в данном документе взаимозаменяемо. Субъект может представлять собой человека или млекопитающее. В одном варианте осуществления данного изобретения субъект представляет собой человека. В другом варианте осуществления данного изобретения субъект представляет собой животное (отличное от человека). В одном варианте осуществления данного изобретения субъект представляет собой млекопитающее, отличное от человека, такое как собака, мышь, крыса или лошадь, в частности собака. Применение, панели и способы, описанные в данном документе, можно выполнять *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

В одном варианте осуществления данного изобретения у субъекта подозревается рецидив онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови. Минимальным остаточным заболеванием (МОЗ, англ. "MRD") называют присутствие небольшого числа лейкозных клеток (раковых клеток костного мозга), которые остаются у субъекта во время лечения или после лечения, когда данный пациент находится в стадии ремиссии (т. е. у данного пациента отсутствуют симптомы или признаки заболевания). Тем не менее, МОЗ является основной причиной рецидивов онкологических заболеваний, в частности лейкозов. Следовательно, способы согласно данному изобретению полезны при мониторинге пациентов, у которых подозревается рецидив заболевания, особенно применительно к пациентам в состоянии ремиссии онкологического заболевания.

Субъект, прошедший исследование с использованием описанных в данном документе способов, может иметь симптомы, указывающие на онкологическое заболевание системы крови, например, анемию, лейкоцитоз и/или увеличение лимфатических узлов. В одном варианте осуществления указанный субъект имеет высокую степень лейкоцитоза. Данный показатель также можно назвать "высоким уровнем лейкоцитов в крови". Онкологические заболевания системы крови, как правило, вызывают повышенную пролиферацию аномальных лейкоцитов или эритроцитов, что приводит к высокому уровню лейкоцитов в крови. Однако лейкоцитоза не достаточно для диагностики у пациента онкологического заболевания системы крови (в частности, лейкоза), поскольку данный показатель часто является признаком воспалительной реакции, чаще всего вследствие инфекции. Следовательно, способы согласно данному изобретению способны обеспечить более специфический способ выявления пациентов, которые потенциально могут иметь онкологическое заболевание системы крови.

Результат выявления и/или количественную оценку можно сравнить с предельным уровнем. Предельные значения можно предопределить путем анализа результатов для множества пациентов и контролей, и путем определения подходящего значения для определения субъекта как имеющего или не имеющего данное заболевание. Например, для заболеваний, при которых уровень биомаркера выше у пациентов, имеющих данное заболевание: если выявленный уровень выше порогового значения, пациента определяют как имеющего данное заболевание. В качестве альтернативы, для заболеваний, при которых уровень биомаркера ниже у пациентов, имеющих данное заболевание: если выявленный уровень ниже порогового значения, пациента определяют как имеющего данное заболевание. Преимущества применения простых предельных значений включают в себя легкость понимания данного анализа врачами и устранение любой необходимости в программном обеспечении или других вспомогательных средствах для интерпретации результатов данного анализа. Предельные уровни можно определить с помощью способов, известных в данной области техники.

Результат выявления и/или количественную оценку можно также сравнить с контролем. Специалисты в данной области техники понимают, что контрольных субъектов можно выбрать на основании различных критериев, которые могут включать в себя, например, знание о том, что данные субъекты не имеют данного заболевания или имеют другое заболевание (например, для осуществления дифференциальной диагностики). "Контроль" может включать в себя здорового субъекта, субъекта без заболевания и/или субъекта без онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови. Сравнение с контролем хорошо известно в области диагностики.

Следовательно, в одном варианте осуществления указанный способ дополнительно включает в себя сравнение уровня указанных бесклеточных нуклеосом в указанном образце плазмы крови с одним или большим числом контролей. Например, указанный способ может включать в себя сравнение уровня бесклеточных нуклеосом, присутствующих в образце плазмы крови, полученном от данного субъекта, с уровнем бесклеточных нуклеосом, присутствующих в образце плазмы крови, полученном от здорового субъекта. Контролем может быть здоровый субъект. В качестве альтернативы, контролем может быть субъект с заболеванием, такой как субъект с инфекцией.

В качестве альтернативы, контролем является субъект с онкологическим заболеванием, отличным от онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, т.е. контрольный субъект имеет онкологическое заболевание, поражающее другой орган в организме. Представленные в данном документе данные показывают, что биомаркеры согласно данному изобретению были значительно повышены у пациентов с онкологическими заболеваниями сосудистой системы или системы крови по сравнению с пациентами с другими формами онкологических заболеваний, поэтому указанные биомаркеры можно

применять для дифференциальной диагностики пациентов с онкологическими заболеваниями сосудистой системы или системы крови по сравнению с пациентами с другими формами онкологических заболеваний. Следовательно, в одном аспекте диагностика включает в себя дифференциальную диагностику онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови по сравнению с онкологическим заболеванием, отличным от онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови. "Онкологическое заболевание, отличное от онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови" представляет собой онкологическое заболевание, которое не является онкологическим заболеванием сосудистой системы или системы крови и не включает в себя пролиферацию клеток сосудов или клеток крови, такое как рак мочевого пузыря, рак костей, рак головного мозга, рак пищевода, рак органов головы и шеи, рак кожи (такой как меланома), рак щитовидной железы, рак языка, рак матки и/или рак шейки матки.

Контролем может быть субъект с высокой степенью лейкоцитоза. Как обсуждается в данном документе, лейкоцитоз не является симптомом, характерным только для лейкоза. Следовательно, способы согласно данному изобретению можно применять для сравнения с контролем, имеющим высокую степень лейкоцитоза, не являющегося результатом онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, таким как контрольный субъект с воспалением, инфекцией и/или принимающий медицинский препарат.

В одном варианте осуществления данного изобретения уровень бесклеточных нуклеосом повышен по сравнению с контролем.

Следует понимать, что нет необходимости измерять уровни у контрольных субъектов для сравнительных целей в каждом случае. Например, для здоровых контролей / контролей без заболевания: после установления "нормального диапазона" его можно использовать в качестве эталона для сравнения всех последующих тестов. Нормальный диапазон можно установить путем получения образцов от нескольких контрольных субъектов, не имеющих онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, и исследования уровня биомаркера в указанных образцах. Результаты (т.е. уровни биомаркеров) для субъектов, у которых подозревается наличие онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, затем можно анализировать с целью определения того, находятся они в пределах или за пределами соответствующего нормального диапазона. Применение "нормального диапазона" является стандартной практикой для выявления заболевания.

В одном варианте осуществления указанный способ дополнительно включает в себя определение по меньшей мере одного клинического параметра для пациента. Указанный параметр можно применять при интерпретации результатов. Клинические параметры могут включать в себя любую соответствующую клиническую информацию, например, без ограничений, пол, вес, индекс массы тела (ИМТ), статус курения и диетические привычки. Следовательно, в одном варианте осуществления клинический параметр выбран из группы, состоящей из: возраста, пола и индекса массы тела (ИМТ).

В одном варианте осуществления способ согласно данному изобретению выполняют для выявления субъекта с высоким риском развития онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, который, следовательно, нуждается в дальнейшем обследовании (т.е. дальнейших исследованиях онкологического заболевания). Дальнейшее обследование может включать в себя одно или более из следующего: биопсию (например, биопсию костного мозга или биопсию лимфатических узлов), цитогенетическое исследование, иммунофенотипирование, компьютерную томографию, рентгенографию (в частности, рентгенографию грудной клетки для выявления увеличенных лимфатических узлов) и/или люмбарную пункцию.

Способы и биомаркеры, описанные в данном документе, можно применять для определения того, нуждается ли пациент в биопсии, в частности в биопсии костного мозга или лимфатических узлов. Следовательно, в соответствии с первым аспектом в данном изобретении представлен способ выявления пациента, нуждающегося в биопсии, включающий в себя получение образца плазмы крови от указанного пациента, выявление уровня бесклеточных нуклеосом в указанном образце плазмы крови и применение результатов, полученных в результате панельного анализа, для определения того, нуждается ли указанный пациент в биопсии.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ выявления пациента, нуждающегося в биопсии, включающий в себя получение образца плазмы крови от указанного пациента, применение к указанному образцу панельного анализа, как определено в данном документе, и применение результатов, полученных в результате указанного панельного анализа, для определения того, нуждается ли указанный пациент в биопсии.

Дополнительные биомаркеры.

Уровень бесклеточных нуклеосом можно выявлять или измерять в качестве одного из панельных анализов. Панель анализов может включать в себя различные эпигенетические признаки нуклеосомы, как описано выше (например, изоформу гистонов и ПТМ). В одном варианте осуществления данного изобретения указанная панель анализов включает в себя один или более цитокинов, например, один или более интерлейкинов.

Интерлейкины (ИЛ) представляют собой группу цитокинов, как правило, секретируемых лейкоци-

тами, которые функционируют как сигнальные молекулы. Они играют ключевую роль в стимулировании иммунных реакций и воспаления. Впервые их идентифицировали в 1970-х годах, и с тех пор обозначали численно по мере открытия новых типов интерлейкинов. Примеры интерлейкинов включают в себя следующие, но не ограничиваются ими: ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-11, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-14 и ИЛ-15.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанные один или более интерлейкинов выбраны из группы, состоящей из: интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β).

Указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-6. Интерлейкин-6 (ИЛ-6) представляет собой цитокин с широким спектром биологических функций. Это мощный индуктор лихорадки и реакции острой фазы. Последовательность ИЛ-6 человека известна в данной области техники и описана в базе данных UniProt под номером P05231. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-6, и панель анализов может включать в себя измерение изоформы гистона H3.1 и ИЛ-6.

В качестве альтернативы или дополнения, указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-10. Интерлейкин-10 (ИЛ-10) представляет собой противовоспалительный цитокин с широким спектром биологических функций. Последовательность ИЛ-10 человека известна в данной области техники и описана в базе данных UniProt под номером P22301. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-10, и панель анализов может включать в себя измерение посттрансляционной модификации гистона H3cit и ИЛ-10.

В качестве альтернативы или дополнения, указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-1 β . Интерлейкин-1 β (ИЛ-1 β) представляет собой провоспалительный цитокин и участвует в различных клеточных функциях, включая клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения указанный интерлейкин может представлять собой ИЛ-1 β , и панель анализов может включать в себя измерение изоформы гистона H3.1 и ИЛ-1 β . Более конкретно, указанная панель может включать в себя измерение изоформы гистона H3.1 и ИЛ-1 β , при этом указанное онкологическое заболевание сосудистой системы или системы крови представляет собой лимфому, например, НХЛ.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанная панель включает в себя эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы и интерлейкин. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная панель включает в себя эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы и два интерлейкина. Например, измерение бесклеточных нуклеосом можно объединить с измерением больше чем одного интерлейкина, например, ИЛ-6 и ИЛ-1 β , или ИЛ-10 и ИЛ-1 β , или ИЛ-6 и ИЛ-10. В другом варианте осуществления данного изобретения указанный эпигенетический признак бесклеточной нуклеосомы выбран из изоформы гистонов, такой как H3.1, и посттрансляционно-модифицированного гистона, такого как H3cit. В другом варианте осуществления данного изобретения указанная панель анализов представляет собой H3.1, ИЛ-6 и ИЛ-1 β . В альтернативном варианте осуществления данного изобретения указанная панель анализов представляет собой H3cit, ИЛ-10 и ИЛ-1 β .

Модели можно получить с применением биомаркеров, раскрытых в данном документе. Способы получения моделей или алгоритмов, подобных приведенным в примерах в табл. 5 и 6, хорошо известны в данной области техники, и доступны соответствующие пакеты программного обеспечения. Иллюстративные программные средства для данной цели включают в себя SPSS (Статистический пакет для социальных наук) и "R". Указанные программные пакеты обеспечивают линейное и нелинейное моделирование клинических данных.

Специалисты в данной области техники понимают, что любую комбинацию биомаркеров, раскрытых в данном документе, можно применять в панелях анализов и алгоритмах для выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, и что можно добавлять дополнительные маркеры к панели анализов, включающей в себя указанные маркеры.

В соответствии с одним аспектом в данном изобретении представлено применение панельного анализа для выявления пациента с онкологическим заболеванием сосудистой системы или системы крови, при этом указанный панельный анализ включает в себя реагенты для определения измерений нуклеосом или их компонента и одного или большего числа интерлейкинов в образце плазмы крови, полученном от пациента.

Способы лечения.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ лечения онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови у субъекта, включающий в себя следующие этапы:

(i) выявление или измерение уровня бесклеточных нуклеосом в образце плазмы крови, полученном от субъекта;

(ii) применение уровня, измеренного на этапе (i), в качестве показателя наличия указанного онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови у указанного субъекта; и

(iii) лечение хирургическим путем или введение терапевтического агента, если у указанного субъекта на этапе (ii) определено наличие указанного онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

В соответствии с другим аспектом представлен способ лечения онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови у субъекта, нуждающегося в этом, включающий в себя этап лечения хирургическим путем или введения терапевтического агента субъекту, в образце плазмы крови которого выявлены различные уровни бесклеточных нуклеосом, при сравнении с уровнем бесклеточных нуклеосом в образце плазмы крови, полученном от контрольного субъекта.

В одном варианте осуществления данного изобретения указанное лечение выбрано из одного или большего числа из следующего: химиотерапии, иммунотерапии, гормональной терапии, биологической терапии, лучевой терапии, лейкофереза и трансплантации стволовых клеток.

Указанные способы могут включать в себя:

(i) измерение уровня бесклеточных нуклеосом (необязательно в сочетании с уровнем одного или большего числа интерлейкинов) в образце плазмы крови, полученном от субъекта;

(ii) идентификацию субъекта как имеющего онкологическое заболевание сосудистой системы или системы крови на основе более высокого уровня бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем; и

(iii) применение лечения к указанному субъекту.

В соответствии с другим аспектом в данном изобретении представлен способ лечения онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, включающий в себя идентификацию пациента, нуждающегося в лечении онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, с применением панельного анализа и обеспечение указанного лечения, при этом указанный панельный анализ включает в себя реагенты для определения измерений нуклеосом или их компонента и одного или большего числа интерлейкинов. Ожидается, что пациент с онкологическим заболеванием сосудистой системы или системы крови имеет более высокий уровень бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем.

Следует понимать, что варианты осуществления, описанные в данном документе, можно применять ко всем аспектам данного изобретения, т. е. вариант осуществления, описанный для конкретных применений, можно в равной степени применять к заявленным способам и так далее.

Далее данное изобретение будет проиллюстрировано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Примеры

Пример 1.

Образцы плазмы крови получали от когорты из 116 субъектов-людей. У каждого субъекта брали образец цельной крови в вакуумную пробирку с ЭДТА и осторожно переворачивали пробирку 10 раз. Цельную кровь центрифугировали в течение 15 минут при 1500g в пределах 2 часов после взятия крови. Плазму переносили в криопробирку и немедленно замораживали. В данной когорте было 62 здоровых субъекта, 25 субъектов с неходжкинской лимфомой (НХЛ), 22 субъекта с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и 7 субъектов с острым лимфобластным лейкозом (ОЛЛ). Субъекты с лейкозом или лимфомой могут быть дополнительно классифицированы как пациенты с онкологическим заболеванием на момент постановки диагноза (всего 31 субъект; 16 субъектов с НХЛ на момент постановки диагноза, 15 субъектов с лейкозом на момент постановки диагноза) или пациенты с рецидивом онкологического заболевания (всего 15 субъектов; 6 субъектов с рецидивом НХЛ, 9 субъектов с рецидивом лейкоза).

Образцы анализировали на наличие нуклеосом, содержащих НЗ.1, способом ТИФА. Кратко, измерения нуклеосом, содержащих изоформу гистона НЗ.1, проводили следующим образом: 80 мкл буфера для анализа и 20 мкл образца плазмы крови или стандартного препарата нуклеосом добавляли в лунку микротитровального планшета, покрытую антителом, направленным на связывание с гистонами НЗ.1. Микротитровальный планшет накрывали и инкубировали при легком встряхивании в течение 2,5 часов при комнатной температуре. Содержимое лунок микротитровального планшета удаляли. Лунки трижды промывали с помощью 200 мкл промывочного раствора и добавляли 100 мкл биотинилированного антитела против нуклеосом. Микротитровальный планшет снова накрывали и инкубировали при легком встряхивании в течение 1,5 часов при комнатной температуре. Содержимое лунок микротитровального планшета удаляли. Лунки трижды промывали с помощью 200 мкл промывочного раствора и добавляли 100 мкл раствора стрептавидина - пероксидазы хрена (ПХ). Микротитровальный планшет снова накрывали и инкубировали при легком встряхивании в течение 0,5 часов при комнатной температуре. Содержимое лунок микротитровального планшета удаляли. Лунки трижды промывали с помощью 200 мкл промывочного раствора и добавляли 100 мкл раствора субстрата ПХ. Микротитровальный планшет снова накрывали и инкубировали при легком встряхивании в течение 20 минут в темноте при комнатной температуре. Уровень абсорбции (ОП) лунок измеряли при 405 нм. Уровни ОП либо применяли непосредственно, либо интерполировали уровень нуклеосом, содержащих гистон НЗ.1, в плазме крови по стандартной кривой.

Показатели ОП наносили на график в виде кривой ROC (т. н. "рабочая характеристика приемника"). Результаты группировали для всех пациентов с онкологическим заболеванием по сравнению со здоро-

выми субъектами, а также для всех пациентов с лимфомой по сравнению со здоровыми субъектами и для всех пациентов с лейкозом (т. е. включая ОЛЛ и ОМЛ) по сравнению со здоровыми субъектами. Результаты измерения площади под кривой (AUC) приведены в табл. 1-3.

Таблица 1

Кривые ROC для ОП НЗ.1 в плазме крови - все субъекты

Параметры	С онкологическим заболеванием (ОЗ) по сравн. со здоровыми	НХЛ по сравн. со здоровыми	Лейкоз по сравн. со здоровыми
Размер выборки	54 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	25 с НХЛ по сравн. с 62 здоровыми	29 с лейкозом по сравн. с 62 здоровыми
AUC	0,911	0,943	0,885
Чувствит. для 80% специфичн.	81,5%	88%	75,9%
Чувствит. для 90% специфичн.	75,9%	84%	69%
Чувствит. для 95% специфичн.	74,1%	80%	69%
Чувствит. для 100% специфичн.	66,7%	72%	62,1%
R ²	66,6%	72,9%	62,2%

Таблица 2

Кривые ROC для ОП НЗ.1 в плазме крови - пациенты на момент постановки диагноза

Параметры	С ОЗ на момент диагноза по сравн. со здоровыми	С НХЛ на момент диагноза по сравн. со здоровыми	С лейкозом на момент диагноза по сравн. со здоровыми
Размер выборки	31 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	16 с НХЛ по сравн. с 62 здоровыми	15 с лейкозом по сравн. с 62 здоровыми
AUC	0,925	0,932	0,918
Чувствит. для 80% специфичн.	83,9%	87,5%	80%
Чувствит. для 90% специфичн.	80,6%	81,3%	80%
Чувствит. для 95% специфичн.	80,6%	81,3%	80%
Чувствит. для 100% специфичн.	74,2%	75%	73,3%
R ²	71,1%	70%	70,1%

Таблица 3

Кривые ROC для ОП НЗ.1 в плазме крови - пациенты с рецидивом

Параметры	С рецидивом ОЗ по сравн. со здоровыми	С рецидивом НХЛ по сравн. со здоровыми	С рецидивом лейкоза по сравн. со здоровыми
Размер выборки	15 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	6 с НХЛ по сравн. с 62 здоровыми	9 с лейкозом по сравн. с 62 здоровыми
AUC	0,878	0,954	0,828
Чувствит. для 80% специфичн.	80%	83,3%	77,8%
Чувствит. для 90% специфичн.	73,3%	83,3%	66,7%
Чувствит. для 95% специфичн.	73,3%	83,3%	66,7%
Чувствит. для 100% специфичн.	66,7%	66,7%	66,7%
R ²	62,2%	69,4%	54,1%

На основе уровней бесклеточных нуклеосом, содержащих НЗ.1, различили больше чем 75% пациентов с онкологическим заболеванием системы крови и здоровых доноров со специфичностью в 90%, как показано в табл. 1. Данный показатель удалось увеличить до больше чем 80% при 90% специфичности для пациентов с онкологическим заболеванием на момент постановки диагноза, как показано в таблице 2. Данные результаты также показали, что указанный биомаркер особенно эффективен при выявлении пациентов с лимфомой, поскольку различили 84% пациентов с НХЛ и здоровых субъектов с 90% специфичностью (см. табл. 1).

Концентрации НЗ.1, полученные из значений ОП с использованием стандартной кривой для интерполяции, в образцах плазмы крови для всех пациентов с ОМЛ, ОЛЛ и НХЛ по сравнению с уровнем у здоровых субъектов представлены на фиг. 1. Наблюдается явное повышение уровней НЗ.1 у пациентов с онкологическими заболеваниями системы крови по сравнению со здоровыми субъектами.

Полученные результаты показывают, что уровни нуклеосом, в особенности нуклеосом, содержащих НЗ.1, можно применять для выявления онкологических заболеваний системы крови.

Пример 2.

Уровень бесклеточных нуклеосом, содержащих НЗ.1, в образцах плазмы крови человека, исследованных в примере 1, дополнительно сравнивали с уровнями НЗ.1 в образцах плазмы крови, полученных от пациентов с другими формами онкологических заболеваний, которые получали так, как описано в примере 1.

Результаты представлены на фиг. 2. Удивительно, но было обнаружено, что уровень НЗ.1 можно применять для проведения различия между субъектами с онкологическими заболеваниями системы крови и пациентами с другими формами онкологических заболеваний. Уровни НЗ.1 были значительно повышены у пациентов с каждым типом онкологических заболеваний системы крови (ОЛЛ, ОМЛ и НХЛ) по сравнению с уровнями НЗ.1 в образцах плазмы крови пациентов, имеющих рак мочевого пузыря, костей, головного мозга, пищевода, органов головы и шеи, кожи, щитовидной железы, языка, матки, шейки матки и меланому.

Пример 3.

Уровни бесклеточных нуклеосом с посттрансляционными модификациями исследовали в образцах плазмы крови человека, описанных в примере 1. Способы ТИФА осуществляли аналогично методу ТИФА для НЗ.1, как описано в примере 1, за исключением того, что антитело, направленное на связывание с гистоном НЗ.1, заменили антителом, направленным на посттрансляционную модификацию гистонов, выбранную из НЗcit, НЗK27Me3 и Н4panAc. Результаты обобщены в табл. 4. Данные результаты также представлены в графическом виде для всех онкологических заболеваний системы крови и для каждого вида онкологических заболеваний системы крови (см. фиг. 3-5).

Таблица 4

Кривые ROC для ПТМ нуклеосом в плазме крови - все ОЗ системы крови

Биомаркеры	AUC	Чувствительность при 80% специфичности	Чувствительность при 90% специфичности	Размер выборки	R ²
ОП для H3cit	0,913	85,2%	77,8%	54 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	66%
ОП для H3K27Me3	0,822	72,2%	50%	54 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	36,8%
RLU для H4rapAc	0,847	77,8%	68,5%	54 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми	55,8%

Все протестированные посттрансляционные модификации нуклеосом значительно повышены у пациентов с онкологическими заболеваниями системы крови по сравнению со здоровыми контрольными субъектами. Даже если онкологические заболевания системы крови разделить по их видам (ОЛЛ, ОМЛ, НХЛ), наблюдается значительное повышение уровней бесклеточных нуклеосом H3cit, H3K27Me3 и H4rapAc в образцах плазмы крови по сравнению со здоровыми контрольными субъектами (см. фиг. 3В, 4В и 5В). Уровни посттрансляционно-модифицированных нуклеосом были повышены в большинстве образцов плазмы крови, полученных от пациентов с ОЛЛ.

Пример 4.

Два наилучших бесклеточных нуклеосомных маркера (H3.1 и H3cit) объединили вместе или в комбинации с измерениями различных интерлейкинов. Уровни бесклеточных нуклеосом измеряли так, как описано ранее, и уровни интерлейкинов в плазме крови измеряли с использованием коммерчески доступных способов ТИФА.

Результаты анализа моделировали с помощью логистического регрессионного анализа для обучения модели или алгоритма с наивысшей AUC для сравнения пациентов-людей с онкологическим заболеванием системы крови и здоровых доноров. Результаты обобщены в табл. 5.

Таблица 5

Кривые ROC для комбинированной панели биомаркеров плазмы крови - все ОЗ системы крови[‡]

Модели биомаркеров	AUC	Чувствительность при 80% специфичности	Чувствительность при 90% специфичности	R ²
Модель 01: LnY = H3cit	0,913	85,2%	77,8%	66%
Модель 02: LnY = H3.1	0,911	81,5%	75,9%	66,6%
Модель 03: LnY = H3.1 + H3cit	0,921	88,9%	81,5%	68,1%
Модель 04: LnY = H3cit + H3K27me3	0,923	85,2%	81,5%	68,3%
Модель 05: LnY = H3.1 + ИЛ-6 человека	0,935	87%	75,9%	69,4%
Модель 06: LnY = H3cit + ИЛ-10 человека	0,930	87%	79,6%	69,6%
Модель 07: LnY = H3cit + ИЛ-1β человека + ИЛ- 10 человека	0,935	90,7%	85,2%	73,2%
Модель 08: LnY = H3.1 + ИЛ-1β человека + ИЛ- 6 человека	0,936	92,6%	75,9%	71%

* Размер когорты: 54 с ОЗ по сравн. с 62 здоровыми субъектами.

Все модели смогли различить больше чем 75% пациентов с онкологическими заболеваниями системы крови и здоровых доноров со специфичностью в 90%, как показано в табл. 5. Данные результаты показывают, что уровни нуклеосом можно комбинировать с уровнями интерлейкина в качестве эффективной панели анализов с соответствующим алгоритмом для выявления онкологических заболеваний системы крови.

Пример 5.

Показатели плазмы крови пациентов-людей только с НХЛ моделировали с помощью логистического регрессионного анализа как описано в примере 4. Результаты обобщены в табл. 6.

Таблица 6

Кривые ROC для комбинированной панели биомаркеров плазмы крови - НХЛ[‡]

Модели биомаркеров	AUC	Чувствительность	Чувствительность	R ²
		при 80% специфичности	при 90% специфичности	
Модель 01: LnY = H3cit	0,919	84%	80%	65,3%
Модель 02: LnY = H3.1	0,943	88%	84%	72,9%
Модель 03: LnY = H3.1 + ИЛ-1β человека	0,979	100%	92%	83,6%

* Размер когорты: 25 с НХЛ по сравн. с 62 здоровыми субъектами

Все модели смогли различить 80% или больше пациентов с НХЛ и здоровых доноров со специфичностью в 90%, как показано в таблице 6. В частности, при комбинировании H3.1 и ИЛ-1β различили 100% пациентов с НХЛ со специфичностью в 80%. Полученные результаты показывают, что уровни нуклеосом и интерлейкинов можно применять в качестве эффективной панели анализов с соответствующим алгоритмом для выявления НХЛ.

Пример 6.

Образцы плазмы крови получали у 73 собак с диагностированной гемангиосаркомой собак, у 127 собак с диагностированной лимфомой собак и у 134 контрольных собак без онкологического заболевания. Образцы анализировали на наличие нуклеосом, содержащих H3.1, способом ТИФА.

Было обнаружено, что у здоровых собак наблюдалась равномерно низкая концентрация циркулирующих нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, составляющая меньше чем 67,4 нг/мл (среднее значение составляло 32 нг/мл, медиана -31 нг/мл).

У собак с диагностированной лимфомой были выявлены очень высокие уровни циркулирующих нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1 (среднее значение составляло 570 нг/мл, медиана - 211 нг/мл). Точечный график и кривая ROC для результатов, полученных касательно лимфомы собак, представлены в графическом виде на фиг. 6А и фиг. 6В, соответственно. AUC для выявления лимфомы составила 87%. При использовании порогового значения в 67,4 нг/мл специфичность анализа составила 100% при чувствительности в 74%. При использовании нижнего порогового значения в 48,1 нг/мл чувствительность составила 81% при специфичности в 90%.

У собак с диагностированной гемангиосаркомой также были выявлены очень высокие уровни циркулирующих нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1 (среднее значение составляло 513 нг/мл, медиана - 361 нг/мл). Точечный график и кривая ROC для результатов, полученных касательно гемангиосаркомы собак, представлены в графическом виде на фиг. 7А и фиг. 7В, соответственно. AUC для выявления гемангиосаркомы составила 97,6%. При использовании порогового значения в 67,4 нг/мл специфичность анализа составила 100% при чувствительности в 89%. При использовании нижнего порогового значения в 48,1 нг/мл чувствительность составила 95% при специфичности в 90%.

Как было обнаружено и в исследовании соответствующих заболеваний человека, уровень циркулирующих нуклеосом, наблюдаемый у собак с диагностированной лимфомой или гемангиосаркомой, также был намного более высоким, чем для других исследованных опухолей собак.

Большинство анализов белков человека невозможно перенести на других животных. Однако структура нуклеосом является высококонсервативной у разных видов и даже типов. Авторы данного изобретения показали, что это означает, что указанный анализ нуклеосом H3.1 человека можно перенести на другие виды, включая собак и лошадей. Более того, результаты, полученные авторами данного изобретения касательно онкологических заболеваний сосудистой системы и системы крови у собак, удивительно похожи на результаты, наблюдаемые у людей. Авторы данного изобретения пришли к выводу, что способы согласно данному изобретению являются высокоэффективными способами для выявления онкологических заболеваний сосудистой системы и системы крови как у человека, так и у животных.

Пример 7.

Серийные образцы плазмы крови получали у 2 собак, проходящих лечение гемангиосаркомы, и у 2 собак, проходящих лечение лимфомы. Все образцы от указанных 4 собак получали и позже анализирова-

ли на предмет нуклеосом, содержащих изоформу гистонов H3.1, после последних суток лечения, как представлено на фиг. 8, так что полученная информация не повлияла на клинические решения о лечении, которые принимали на клинических основаниях.

C-реактивный белок (СРБ) является хорошо исследованным биомаркером воспаления, и его также измеряли в указанных образцах в качестве контроля с целью определения того, отражают уровни нуклеосом просто воспалительную реакцию или предоставляют дополнительную информацию о статусе субъекта, прогнозе и ответе на лечение.

У собаки 1 (фиг. 8А) была диагностирована гемангиосаркома, которую лечили с помощью схемы химиотерапии из 4 препаратов, известной как СНОР (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон), начиная с 1-х по 129-е сутки. Лечение было успешным, и на 160-е сутки у собаки 1 установили ремиссию на клинических основаниях.

Успех лечения СНОР отражается в тенденции к снижению уровня нуклеосом в течение курса лечения, и ремиссию заболевания предсказали по уровню нуклеосом, близкому к нормальному, к 122-м суткам. Полученные результаты демонстрируют, что уровни нуклеосом полезны в качестве прогностического показателя и их можно применять для регулирования схем лечения и мониторинга субъектов, находящихся на стадии ремиссии, на предмет рецидива заболевания. Анализ СРБ не был полезен для клинических целей.

У собаки 2 (фиг. 8В) впервые диагностировали гемангиосаркому в 2017 году, и ее лечили доксорубином и иммуномодулирующим агентом. Регулярный мониторинг данной собаки осуществляли с помощью компьютерной томографии всего тела каждые 2-3 месяца. Через 2 года у данной собаки произошел рецидив, и это нашло отражение в высоком уровне циркулирующих нуклеосом. Рецидив успешно вылечили доксорубином, дакарбазином и иммуномодулирующим агентом, а также облучением всего легкого и стереотаксической лучевой терапией тела (SBRT), и у собаки 2 определили ремиссию на основании компьютерной томографии всего тела. Успех различных способов лечения отражался в уровнях нуклеосом, приближенных к нормальным, измеренных в январе 2020 года. В феврале 2020 года на основании визуализации у собаки 2 диагностировали полный клинический ответ, но представляет интерес то, что измеренные уровни нуклеосом начали повышаться в феврале, прежде чем визуализация смогла обнаружить прогрессирующее заболевание при последующем сканировании в апреле 2020 года. Уровни нуклеосом оставались высокими, когда в апреле определили прогрессирующее заболевание. Если бы уровни нуклеосом были известны во время лечения, в феврале за данным субъектом был бы установлен более интенсивный мониторинг. Полученные результаты демонстрируют, что уровни нуклеосом можно применять для регулирования схем лечения и мониторинга субъектов, находящихся на стадии ремиссии, на предмет рецидива заболевания. Анализ СРБ не был полезен для клинических целей.

У собаки 3 (фиг. 9А) впервые диагностировали и успешно вылечили лимфому в 2018 году, но затем данная собака вышла из периода ремиссии, и это отразилось на измеренных уровнях нуклеосом. В 1-е сутки данную собаку лечили винкристином от прогрессирующего заболевания (ПЗ) в рамках схемы химиотерапии СНОР. Лечение винкристином привело к улучшению клинического состояния до стабильного заболевания (СЗ), что отразилось на снижении уровня нуклеосом, о чем свидетельствуют результаты, представленные на фиг. 9А. Однако лечение по схеме СНОР прекратили, как по причинам ее токсичности, так и из-за отсутствия стабильного наблюдаемого клинического ответа. На 22-е сутки начали лечение ломустином в сочетании с L-аспарагиназой (L-spar), с дальнейшим лечением ломустином на 34-е, 79-е и 113-е сутки. На 34-е и 79-е сутки клинические показатели улучшились до частичной ремиссии, что определили с помощью измерений опухоли, а затем - до полного ответа (ПО) на лечение на 113-е и 145-е сутки; к этому времени у собаки 3 наступила ремиссия, и дальнейшую химиотерапию не проводили. Уровни нуклеосом повышались между 22-34 сутками, а затем последовательно снижались с 34-х суток и далее, предсказывая успех лечения ломустином, который позже клинически наблюдался как полный ответ на 113-е и 145-е сутки. Более того, на 145-е сутки уровни нуклеосом снизились до диапазона, наблюдаемого у здоровых собак, что соответствовало клинической картине. Уровни СРБ всегда находились в пределах нормы и не были полезны для клинических целей.

У собаки 4 (фиг. 9В) диагностировали внутрибрюшную гиперкальциемическую лимфому стадии Vb. Данной собаке проводили курс химиотерапии СНОР с винкристином и доксорубином с 1-х по 93-е сутки, и реакцию на лечение мониторировали на основе уровней циркулирующего кальция. На основе клинической оценки ветеринары определили слабый ответ на винкристин, но ответ на доксорубин отсутствовал. Затем лечение сменили со схемы СНОР на ломустин в комбинации с L-аспарагиназой 108-164-е сутки, на которые данная собака также не реагировала. Поскольку была замечена реакция на винкристин, на 164-е сутки начали лечение по схеме СОР (СНОР без применения доксорубина) с использованием винкрестина (образец крови невозможно было получить на 167-е сутки). Собака 4 ответила на терапию по схеме СОР, и клинический ответ сохранялся на момент написания данного документа. Измеренные уровни нуклеосом отражают наблюдаемые клинические результаты (фиг. 9В). Наблюдалось снижение уровня нуклеосом в большинстве моментов времени после лечения винкристином, отражающее ответ на данный вид лечения, и увеличение уровня нуклеосом после каждой дозы доксорубина, отражающее отсутствие ответа на данный вид лечения. Клиническим путем также обнаружили, что у

собаки 4 наблюдался частичный ответ на циклофосфамид, что также нашло отражение в снижении концентрации нуклеосом. Тем не менее, уровни нуклеосом оставались выше нормальных уровней, указывая на сохраняющуюся необходимость дальнейшего лечения. Измерения нуклеосом явным образом коррелируют с клиническими данными и могут применяться для мониторинга ремиссии заболевания и для обеспечения информированного выбора вида лечения. Например, уровни нуклеосом предсказывали отсутствие ответа на терапию доксорубицином, которую можно было прекратить раньше, если бы были доступны данные об уровнях нуклеосом. Анализ СРБ не выявил каких-либо существенных различий и не был полезен для клинических целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение изоформы гистона НЗ.1 бесклеточной нуклеосомы в качестве биомаркера в образце плазмы крови для диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови.

2. Применение по п.1, в котором указанное онкологическое заболевание системы крови выбрано из лейкоза, лимфомы или миеломы.

3. Применение по п.2, в котором указанный лейкоз выбран из острого лимфоцитарного лейкоза (ОЛЛ) и острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), или в котором указанная лимфома представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ).

4. Применение по любому из пп.1-3, в котором указанное онкологическое заболевание сосудистой системы выбрано из ангиосаркомы или гемангиосаркомы.

5. Способ диагностики или выявления онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, который включает в себя следующие этапы:

(i) приведение образца плазмы крови, полученного от субъекта, в контакт со связывающим агентом для выявления или измерения бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистона НЗ.1; и

(ii) применение уровня выявленных бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистона НЗ.1, для диагностики у данного субъекта онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, включающее в себя сравнение уровня указанных бесклеточных нуклеосом, содержащих изоформу гистона НЗ.1, в указанном образце плазмы крови с одним или более контролями, и идентификацию субъекта как имеющего онкологическое заболевание сосудистой системы или системы крови на основе более высокого уровня указанных бесклеточных нуклеосом по сравнению с контролем.

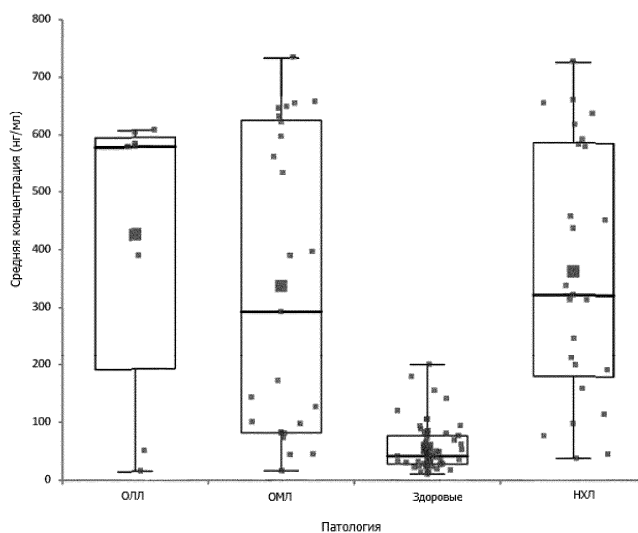
6. Способ по п.5, в котором указанное выявление или измерение включает в себя иммуноанализ, иммунохимический, масс-спектрометрический, хроматографический метод, иммунопреципитацию хроматина или биосенсорный метод.

7. Способ по п.5 или 6, в котором указанное выявление или измерение включает в себя 2-направленный иммуноанализ с использованием выявляющего меченого связывающего агента, направленного на нуклеосомы, в комбинации с иммобилизованным связывающим агентом, направленным на гистон НЗ.1.

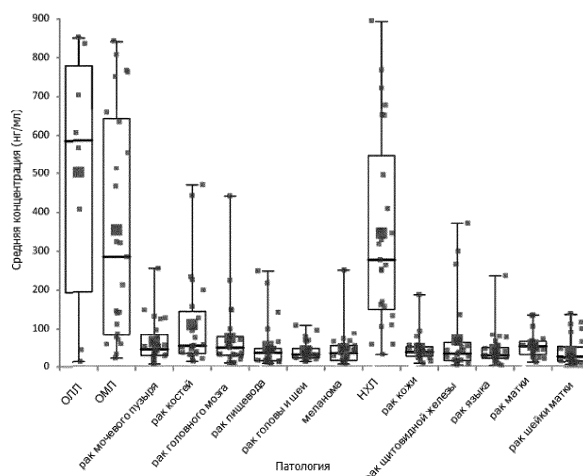
8. Способ по любому из пп.5-7, в котором указанный субъект представляет собой человека или животное.

9. Способ по любому из пп.5-8, в котором у указанного субъекта подозревается рецидив онкологического заболевания сосудистой системы или системы крови, или в котором указанный субъект имеет высокую степень лейкоцитоза / высокий уровень лейкоцитов в крови.

10. Способ по любому из пп.5-9, в котором указанный уровень бесклеточных нуклеосом выявляют или измеряют как один из показателей панели анализов.

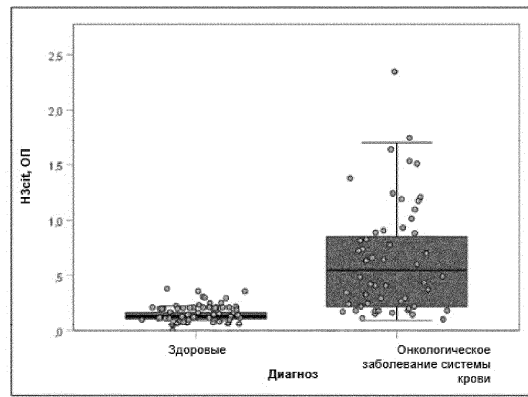


Фиг. 1

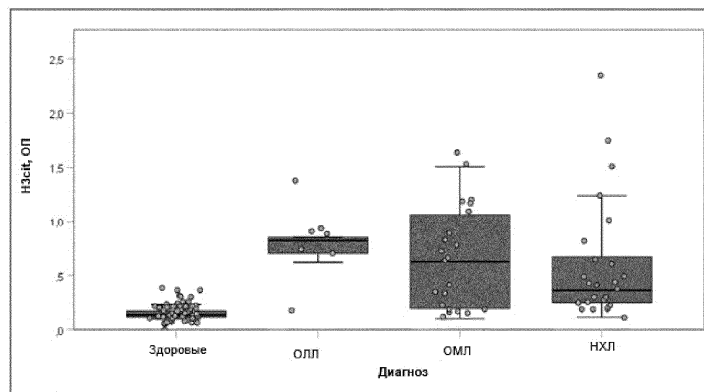


Фиг. 2

A

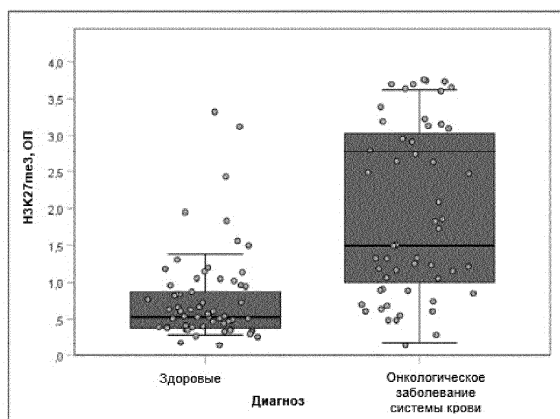


B

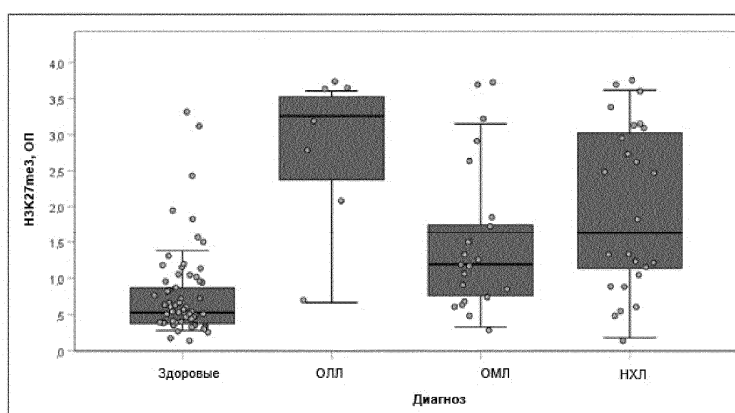


Фиг. 3

A

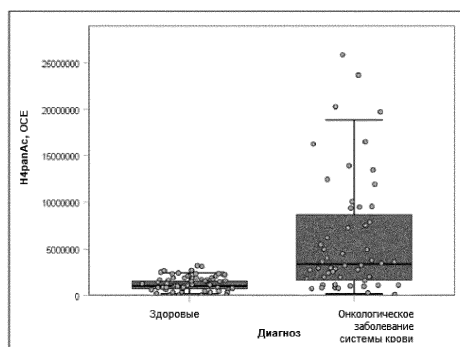


B

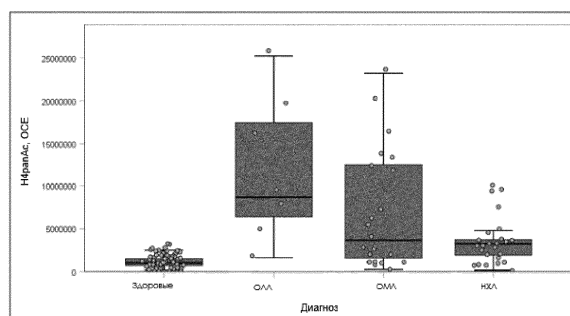


Фиг. 4

A

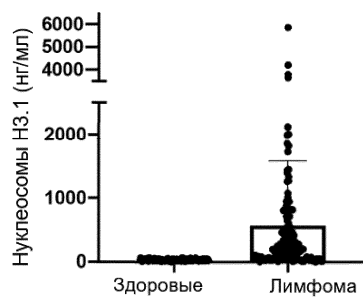


B

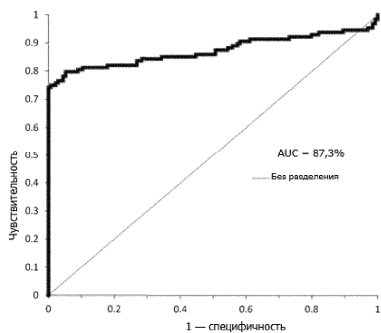


Фиг. 5

A

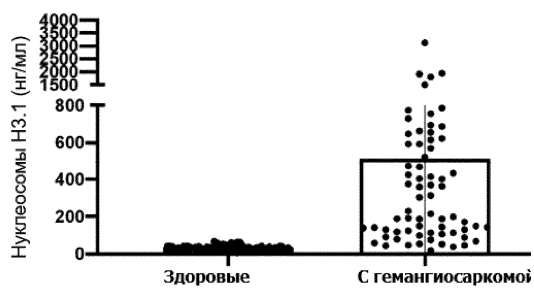


B

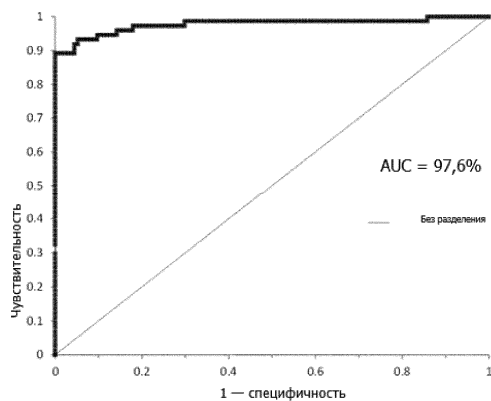


Фиг. 6

A

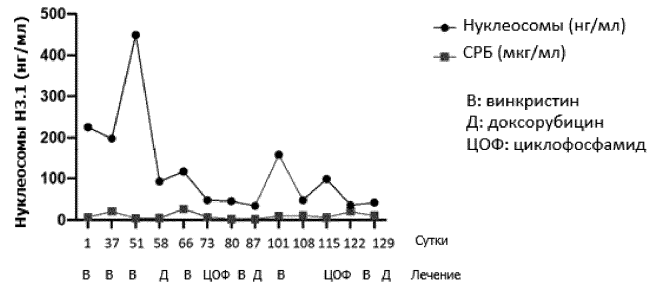


B

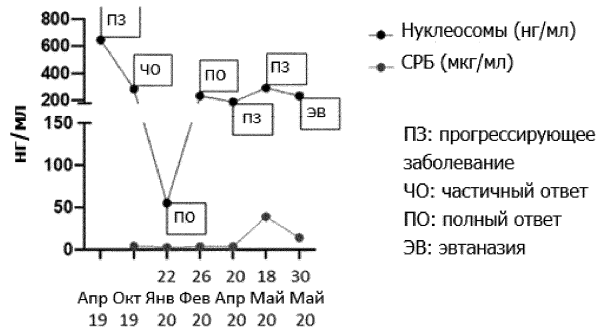


Фиг. 7

А Собака 1

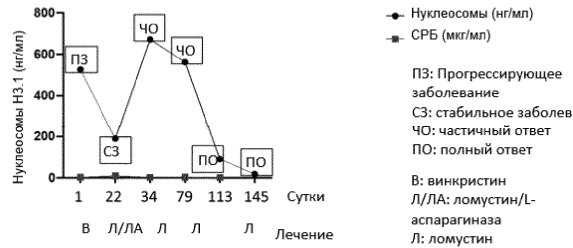


В Собака 2

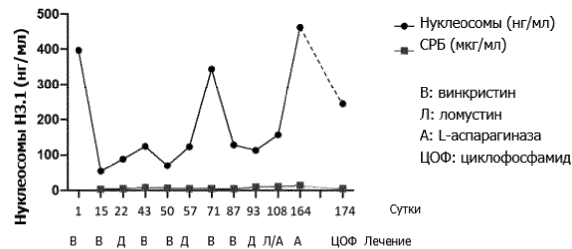


Фиг. 8

А Собака 3



В Собака 4



Фиг. 9



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2