



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108026578 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680052685.1

(22)申请日 2016.09.22

(30)优先权数据

1516972.5 2015.09.25 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.03.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/072579 2016.09.22

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/050916 EN 2017.03.30

(71)申请人 艾皮恩蒂斯有限公司

地址 德国柏林

(72)发明人 斯文·欧莱克

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6881(2018.01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表3页 附图2页

(54)发明名称

LRP5作为用于鉴定免疫细胞特别是B细胞的  
表观遗传标志物

(57)摘要

本发明涉及用于鉴定B细胞的方法,特别是体外方法,其包括分析哺乳动物低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5)的基因区中至少一个CpG位置的甲基化状态,其中当与非B细胞相比时,所述基因区的去甲基化或缺乏甲基化指示B细胞。本发明的分析可在表观遗传水平上鉴定B细胞,并在复杂样品(例如其他血液细胞或免疫细胞)中将其与所有其他细胞区分。此外,本发明提供了特别是在复杂样品中定量B细胞的改进的方法。可在没有纯化和/或富集细胞的步骤情况下,优选在全血和/或未经胰蛋白酶消化的组织中实施所述方法。还要求保护试剂盒以及用于鉴定甲基化的特异性引物和探针。

1. 鉴定样品中B细胞的方法,其包括分析哺乳动物低密度脂蛋白受体相关蛋白5 (LRP5)的基因区中至少一个CpG位置的甲基化状态,其中优选地,所分析的所述基因区根据SEQ ID No.1来定位,其中当与非B细胞相比时,所述基因区的去甲基化指示B细胞。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述至少一个CpG位置存在于所分析的所述基因区的转录起始处上游的5'区、启动子区、5'或3'非翻译区、外显子、内含子、外显子/内含子边界和/或转录终止处下游的3'区中。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中所述至少一个CpG位置选自以下CpG:其选自SEQ ID No.1的扩增子中的CpG位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23和24,并且优选地选自根据SEQ ID No.2或3的亚硫酸氢盐转化的序列的扩增子No.2249的片段中的CpG位置3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16和17。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述亚硫酸氢盐可转化性分析包括:选自甲基化特异性酶消化、亚硫酸氢盐测序的方法,选自启动子甲基化、CpG岛甲基化、MSP、HeavyMethyl、MethylLight、Ms-SNuPE的分析,以及依靠检测扩增的DNA的其他方法。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其还包括基于将所分析的所述基因区中的所述甲基化频率的相对量与对照基因如GAPDH中的甲基化频率的相对量进行比较,来定量B细胞的相对量。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述样品选自:哺乳动物体液,包括人血液样品,或者组织、器官或细胞类型的血液样品,血液淋巴细胞或其部分的样品。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其还包括将所述B细胞与选自以下的全部或至少一种细胞类型区分:滤泡辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、单核细胞、NK细胞和T辅助细胞。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中在没有纯化和/或富集待鉴定的所述细胞的步骤情况下,优选使用全血和/或未经胰蛋白酶消化的组织实施所述方法。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的方法,其还包括基于所鉴定的所述B细胞来推断所述哺乳动物的免疫状态的步骤。

10. 监测哺乳动物中B细胞水平的方法,其包括实施权利要求5至9中任一项所述的方法,以及此外将所鉴定的所述细胞的相对量与早期或平行取自相同哺乳动物的样品和/或与对照样品进行比较。

11. 如权利要求1至10中任一项所述的方法,其还包括测量和/或监测响应于提供给所述哺乳动物的化学和/或生物物质的所述B细胞的量。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物患有或可能患有自身免疫疾病、移植排斥、感染性疾病、癌症和/或过敏症。

13. 试剂盒,其用于基于对LRP5基因区中的CpG位置的亚硫酸氢盐可及性的分析来鉴定、定量和/或监测哺乳动物中的B细胞,所述试剂盒包含用于实施权利要求1至12中任一项所述的方法的组分,特别地,所述试剂盒包含:a) 亚硫酸氢盐试剂,和b) 用于分析CpG位置的甲基化状态的材料,所述CpG位置选自SEQ ID NO.1所示区中的CpG位置,如选自SEQ ID NO.4-11所示序列的寡聚物中的CpG位置。

14. SEQ ID No.4-11中任一项所示的寡聚物,或者SEQ ID No.1、2或3所示的扩增子。

15. 权利要求13所述的试剂盒或者权利要求14所述的寡聚物或扩增子在鉴定、定量和/

或监测哺乳动物中的B细胞中的用途。

## LRP5作为用于鉴定免疫细胞特别是B细胞的表现遗传标志物

[0001] 本发明涉及用于鉴定B细胞的方法,特别是体外方法,其包括分析哺乳动物低密度脂蛋白受体相关蛋白5 (LRP5) 的基因区中至少一个CpG位置的甲基化状态,其中当与非B细胞相比时,所述基因区的去甲基化或缺乏甲基化指示B细胞。本发明的分析可在表观遗传水平上鉴定B细胞,并在复杂样品(例如其他血液细胞或免疫细胞)中将其与所有其他细胞区分。此外,本发明提供了特别是在复杂样品中定量B细胞的改进的方法。可在没有纯化和/或富集细胞的步骤情况下,优选在全血和/或未经胰蛋白酶消化的组织中实施所述方法。

[0002] 此外,本发明涉及用于实施上述方法的试剂盒及其相应的用途。本发明一个目的是提供一种定量检测和测量哺乳动物的任何实体器官或组织或任何体液内的血液B细胞的新的、更稳健的手段。

[0003] 发明背景

[0004] B细胞或B淋巴细胞是适应性免疫系统的体液免疫中的一种类型的淋巴细胞。通过B细胞外表面上被称为B细胞受体(BCR)的蛋白的存在,可将B细胞与其他淋巴细胞,如T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)区分开来。这个专门的受体蛋白使得B细胞结合到特定抗原。在哺乳动物中,在骨髓中形成未成熟的B细胞。

[0005] B细胞的主要功能是产生响应于抗原的抗体,以进行抗原呈递细胞(APC)的作用,并在通过抗原相互作用激活后发育成记忆B细胞。B细胞也释放细胞因子(蛋白),其被用于免疫调节功能的信号转导。

[0006] 尽管个体中几乎所有的细胞都含有完全相同的DNA编码的互补物,但是高等生物必须在不同类型的组织中施加并保持不同的基因表达模式。大多数基因调控是瞬时的,这取决于细胞的当前状态和外部刺激的变化。另一方面,持续性调控是表观遗传学的主要作用一不改变DNA的基本遗传编码的可遗传的调控模式。DNA甲基化是表观遗传调控的典型形式;它作为细胞的稳定记忆,在维持各种细胞类型的长期身份中发挥着至关重要的作用。最近发现了其他形式的表观遗传调控。除了“第五个碱基”5-甲基胞嘧啶(mC),可发现第六个(5-羟甲基胞嘧啶,hmC)、第七个(5-甲酰基胞嘧啶,fC)和第八个(5-羧基胞嘧啶,cC)碱基(Michael J.Booth et al.Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18May 2012, Vol.336no.6083pp.934-937)。

[0007] 所提到的DNA修饰的主要靶标是两个核苷酸的序列胞嘧啶鸟嘌呤(“CpG位点”);在此情况下,胞嘧啶(C)可经简单的化学修饰以变成甲酰化的、甲基化的、羟甲基化的或羧化的。在人类基因组中,除了在被称为“CpG岛”的某些相对密集簇之外,CG序列比预期更罕见,。CpG岛通常与基因启动子相关,估计超过一半的人类基因具有CpG岛(Antequera and Bird,Proc Natl Acad Sci USA 90:11995-9,1993)。

[0008] DNA的异常甲基化通常与从健康到癌细胞的转化相关。观察到的效应包括全基因组低甲基化、肿瘤抑制基因的甲基化增加和许多致癌基因的低甲基化(综述于,例如,Jones and Laird,Nature Genetics 21:163-167,1999;Esteller,Oncogene 21:5427-5440,2002;以及Laird,Nature Reviews/Cancer 3:253-266,2003)。甲基化特征已经被认为是肿

瘤特异的(即,特定基因或者甚至单个CpG的甲基化模式的改变是特定肿瘤类型的诊断),并且现在有大量的用于膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃癌、肝癌、肺癌和前列腺癌的诊断标志物(总结于,例如,Laird,Nature Reviews/Cancer 3:253-266,2003)。

[0009] 对于最近描述的一种胞嘧啶修饰(5-羟甲基化),显示了氧化亚硫酸氢盐测序对定位和定量CpG岛上5hmC的效用(Michael J.Booth et al.Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 18May 2012,Vol.336no.6083pp.934-937)。在与转录调控因子相关的CpG岛和长散在核元件中发现高水平的5hmC。这表明这些区域可能在胚胎干细胞中进行表观遗传重编程。

[0010] W02012/162660描述了提供使用DNA甲基化阵列的方法,用于鉴定细胞或细胞混合物,用于定量血液或组织中细胞分布的改变,以及用于诊断、预测和治疗疾病状况,特别是癌症。这些方法使用新鲜的存档样本。

[0011] Dai等人(于Dai et al.Systematic CpG islands methylation profiling of genes in the wnt pathway in epithelial ovarian cancer identifies biomarkers of progression-free survival.Clin Cancer Res.2011Jun 15;17(12):4052-62.Epub 2011Apr 1.中)公开了在卵巢肿瘤的Wnt途径基因的启动子CpG岛(CGI)的DNA甲基化,以及鉴定患者无进展生存期(PFS)的生物标志物。DNA甲基化与独立于临床参数的LRP5基因的PFS相关(调整的 $P < 0.05$ )。在与疾病进展危险增加相关的基因座上的甲基化增加。然而,仅在NKD1和DVL1的甲基化被最终确定为PFS的独立预测因子。

[0012] Accomando等人(于Accomando et al.Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation.Genome Biol.2014Mar 5;15(3)中)公开了细胞谱系特异性DNA甲基化模式区分正常的人类白细胞子集,并且可用于在外周血中检测和定量这些子集。它们使用DNA甲基化同时定量多种白细胞子集,并鉴定区分人T细胞、B细胞、NK细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和嗜中性粒细胞的细胞谱系特异性DNA甲基化标记。LRP5未被提及。

[0013] 鉴于以上所述,本发明的一个目的是提供一种基于DNA甲基化分析的改进的以及特别是稳健的方法作为优越的工具,以更方便且可靠地检测、鉴定、鉴别和定量B细胞。

[0014] 本发明通过提供用于鉴定样品中的B细胞的方法实现了上述目的,所述方法包括分析哺乳动物(例如人)的低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5)基因区中至少一个CpG位置的甲基化状态(亚硫酸氢盐可转化性),其中优选所分析的所述基因区基于/根据SEQ ID No.1来定位,其中当与非B细胞相比时,所述基因区的去甲基化指示B细胞。

[0015] 蛋白质低密度脂蛋白受体相关蛋白5(LRP5或BMND1、EVR1、EVR4、HBM、LR3、LRP7、OPPG、OPS、OPTA1、VBCH2)是在受体介导的内吞作用过程中结合并内化配体的跨膜低密度脂蛋白受体。这种蛋白也可作为与卷曲蛋白家族成员的共受体用于通过Wnt蛋白转导信号,以及基于其与人类1型糖尿病的关联最初克隆这种蛋白。人类LRP5基因存在于11号染色体上,68,312,609-68,449,275正向链,Ensembl-ID:ENSG00000162337。

[0016] 在本发明的背景下,基因区应包含与LRP5有关并编码LRP5的全部基因组区。因此,包括属于LRP5的增强子区、启动子区、内含子、外显子和非编码区(5'-和/或3'-区)。因此,优选根据本发明的方法,其中至少一个CpG位置存在于所分析的基因的转录起始处上游的5'区、启动子区、5'或3'非翻译区、外显子、内含子、外显子/内含子边界和/或转录终止处下

游的3'区。

[0017] 本发明进一步地基于本申请的发明人将LRP5基因区令人惊讶地鉴定为特异性表观遗传标志物,以允许鉴定B细胞以及所述分析的临床常规应用。

[0018] 在本发明的背景下,LRP5的基因组区,特别是根据SEQ ID No.1的基因组区,允许鉴定B细胞。令人惊讶地,针对B细胞,亚硫酸氢盐可转化和不可转化的胞嘧啶的差别性模式特别地并且甚至仅限于根据SEQ ID No.1的基因组区,如使用根据SEQ ID No.1的扩增子所示,特别是在根据SEQ ID No.2和/或3的亚硫酸氢盐转化的序列中。

[0019] 本申请的发明人可以证明,在B细胞中,所公开的CpG基序几乎完全去甲基化(即超过70%,优选80%,优选超过90%,最优选超过95%),而相同的基序在所有其他免疫细胞中则完全甲基化。

[0020] 上述区域内CpG基序的差异甲基化是鉴定B细胞的有价值的工具,如在自身免疫疾病、移植排斥、癌症、过敏症以及原发性和继发性免疫缺陷中,例如在任何可设想的诊断背景下HIV感染和AIDS、移植物抗宿主(GvH)、血液恶性肿瘤、类风湿性关节炎、多发性硬化症或细胞毒性T细胞相关的免疫状态中,用于鉴定和定量所述细胞所需的/或至少一些价值。该测定允许在不进行纯化或任何染色步骤的情况下测量B细胞。

[0021] 此外,根据本发明方法的另一个优选的方面还包括基于将所分析的区域中所述甲基化频率的相对量与对照基因(例如GAPDH)中甲基化频率的相对量进行比较,来对B细胞的相对量进行定量。因此,所述定量基于本文所述和分析的LRP5(例如SEQ ID No.1)的基因区中亚硫酸氢盐可转化的DNA与不可转化的DNA的比率来实现。最优选的是,基于(优选平行或同时)分析LRP5的细胞特异性区域的亚硫酸氢盐可转化的DNA的相对量,以及细胞非特异性基因(优选指定“对照基因”或“对照区”,例如GAPDH的基因)的亚硫酸氢盐可转化的DNA的相对量,来定量B细胞的相对量。

[0022] 在根据本发明方法的另一优选实施方案中,所述亚硫酸氢盐可转化性的分析包括用合适的引物对中的至少一个引物进行扩增,所述合适的引物对可基于SEQ ID No.1,优选根据SEQ ID No.2-4中任一项所示的寡聚物,进行适当设计。

[0023] 与FACS和mRNA测量相比,使用根据本发明的方法,可以独立于纯化、储存以及在一定程度上也与组织质量无关地完成测量和分析。

[0024] 优选地,扩增涉及聚合酶、PCR或化学扩增反应,或如下文所述的本领域技术人员已知的其他扩增方法,例如在MSP、HeavyMethyl、Scorpion、MS-SNUPE、MethylLight、亚硫酸氢盐测序、甲基特异性限制性测定和/或数字PCR的情况下(参见例如,Kristensen and Hansen PCR-Based Methods for Detecting Single-Locus DNA Methylation Biomarkers in Cancer Diagnostics,Prognostics,and Response to Treatment *Clinical Chemistry* 55:8 1471-1483(2009))。

[0025] 使用扩增,产生了LRP5基因区的扩增子,该扩增子是用于实施根据本发明的方法的特别优选的“工具”。因此,根据SEQ ID No.4和5中任一项所示的寡聚物,或根据本文提及的基于SEQ ID No.4和5或6和7或9和10的引物对扩增的扩增子,构成了本发明的优选实施方案。因此,可以使用SEQ ID No.1-3所示序列(以及如果需要的话,其互补序列)来设计用于扩增的引物,即用作相关序列中的“信标”。类似地,可以基于根据SEQ ID No.1的扩增子来设计另外的引物和探针。可以在基因组和/或亚硫酸氢盐(即“转化的”)DNA序列中进行扩

增。

[0026] 此外,技术人员将能够选择CpG位置的特定子集以使待分析的位点的量最小化,例如选自根据SEQ ID No.1的扩增子中的CpG位置的至少一个CpG位置,以及优选选自根据SEQ ID No.1的扩增子No.2249中的CpG位置3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22和23的至少一个CpG位置。从生成和分析的扩增子的5'端以数字计数位置,并且该位置在图1中被指定为105、114、159、163、167、171、174、194、208、213、218、223、261、272、285、306、336、357、384、423和433。优选3、4、5、6、7、8、9或10个位置的组合,其分析产生足够的数据和/或信息以便在本发明的背景下提供信息。

[0027] 此外,技术人员将能够选择CpG位置的特定子集,以使待分析的位点的量最小化,例如所述LRP5特定亚硫酸氢盐可转化区(SEQ ID No.1)的扩增子No.2249中的CpG位置5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16和/或17中的至少一个,或作为存在于根据SEQ ID No.1的亚硫酸氢盐可转化区上的所有位点。

[0028] 为了分析CpG位置的亚硫酸氢盐可转化性,可以使用任何已知的分析DNA甲基化的方法。在根据本发明方法的优选实施方案中,甲基化状态的分析包括选自甲基化特异性酶消化、亚硫酸氢盐测序的方法,选自启动子甲基化、CpG岛甲基化、MSP、HeavyMethyl、MethyLight、Ms-SNuPE的分析或依靠检测扩增的DNA的其他方法。这些方法是技术人员所熟知的,可以在相应的文献中找到。

[0029] 在根据本发明方法的优选实施方案中,所述方法适用于常规应用,例如在DNA芯片上。基于以上信息和相应的文献,技术人员将能够将上述方法调整到这样的设置。

[0030] 在根据本发明方法的又一个优选实施方案中,在没有纯化和/或富集待鉴定的所述细胞的步骤的情况下,优选使用全血和/或未经胰蛋白酶消化的组织实施所述方法。

[0031] 在根据本发明方法的另一个优选实施方案中,所述鉴定包括将所述B细胞与所有主要外周血细胞类型和/或非血细胞区分,优选但不限于与以下细胞区分:滤泡辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、单核细胞、NK细胞和T辅助细胞,以及来自除血液之外的其他器官的其他细胞类型。

[0032] 在根据本发明方法的又一个优选实施方案中,所述样品选自:哺乳动物体液,包括人血液样品,或者组织、器官或白细胞样品,或者这种组织、器官或白细胞的纯化或分离的部分或细胞类型样品。优选地,所述哺乳动物是小鼠、山羊、狗、猪、猫、牛、大鼠、猴或人。如果需要,样品可以适当地合并。

[0033] 此外,根据本发明方法的另一个优选方面还包括基于所述B细胞推断所述哺乳动物的免疫状态的步骤。所述B细胞可被定量并用作基准以相对地定量更详细的亚群,或者其可被用作预测和/或筛选和/或诊断和/或预后和/或不良事件检测因子,或者它可以被用来最终检测这个群体以确定整体的免疫活性状态。

[0034] 在根据本发明方法的另一个优选实施方案中,所述哺乳动物患有或可能患有自身免疫疾病、移植排斥、感染性疾病、癌症和/或过敏症,例如但不限于克氏锥虫感染、疟疾和HIV感染;血液恶性肿瘤,例如但不限于慢性骨髓性白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金病、慢性淋巴细胞白血病、移植物抗宿主和宿主抗移植物病、蕈样霉菌病、结外T细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、间变性大细胞淋巴瘤、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤和其他T细胞、B细胞和NK细胞肿瘤,T细胞缺陷例如但不限于淋巴细胞减少症、严重联合免疫缺

陷(SCID)、Omenn综合征、软骨-毛发发育不全、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)以及遗传病况如DiGeorge综合征(DGS)、染色体断裂综合征(CBS)、多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、干燥综合征、系统性硬化症、皮炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、银屑病、白癜风、大疱性类天疱疮、斑秃、特发性扩张型心肌症、1型糖尿病、格雷夫斯病、桥本氏甲状腺炎、重症肌无力、IgA肾病、膜性肾病和恶性贫血；以及B细胞和T细胞联合病症，例如但不限于共济失调毛细血管扩张症(AT)和Wiskott-Aldrich综合征(WAS)；以及癌症，例如但不限于乳腺癌、结肠直肠癌、胃癌、胰腺癌、肝细胞癌、胆管癌、黑色素瘤和头颈癌。

[0035] 此外，根据本发明方法的另一个优选方面涉及如上所述的方法，其还包括测量和/或监测响应于提供给所述哺乳动物的化学和/或生物物质(即响应于所述患者的治疗)的B细胞的量。所述方法包括如上所述的步骤，并将所鉴定的所述细胞的所述相对量与早期或平行取自相同哺乳动物的样品和/或与对照样品进行比较。基于本发明方法所提供的结果，主治医师将能够推断患者的免疫状态，并相应地调整潜在疾病的治疗。

[0036] 优选地，在没有纯化和/或富集细胞的步骤的情况下，优选在全血和/或未经胰蛋白酶消化的组织，或任何其他潜在含有所述B细胞的生物样品中，例如细胞转移入患者的样品中实施所述方法。

[0037] 此外，根据本发明方法的另一个优选方面涉及如上所述的方法，其还包括配制所鉴定的用于移植入患者的所述B细胞。用于这些目的的药物制剂及其制备方法，根据移植药物领域已知的方法实施。

[0038] 根据本发明方法的另一个优选方面涉及SEQ ID No. 4-11中任一项所示的寡聚物或SEQ ID No. 1-3所示的扩增子。

[0039] 此外，本发明的另一个优选方面涉及基于对LRP5的基因区中的CpG位置的亚硫酸氢盐可及性的分析来鉴定、定量和/或监测哺乳动物中的B细胞的试剂盒，其包含用于实施本文所述的根据本发明方法的组分，特别地，所述试剂盒包含：a) 亚硫酸氢盐试剂，和b) 用于分析CpG位置的甲基化状态的材料，所述CpG位置选自SEQ ID NO. 1所示区中的CpG位置，如选自根据SEQ ID No. 4-11所示序列的寡聚物中的CpG位置。

[0040] 本发明还包括如本文所述的根据本发明的寡聚物或扩增子或试剂盒在鉴定和/或监测哺乳动物B细胞中的用途。

[0041] 如上所述，最近发现了三种新的胞嘧啶修饰。因此，预计未来的科学发现将会修正过去描述的表现遗传修饰模式。这些过去的胞嘧啶修饰模式包括：亚硫酸氢盐可转化的(非甲基化的，未修饰的)和不可转化的(甲基化的，修饰的)胞嘧啶。如所述，两端都需要修正。根据新的科学发现：(i) 亚硫酸氢盐不可转化的胞嘧啶包括5-甲基胞嘧啶(mC)和5-羟甲基胞嘧啶(hmC)，和(ii) 亚硫酸氢盐可转化的(即“亚硫酸氢盐可转化性”)胞嘧啶包括5-甲酰胞嘧啶(fC)、5-羧基胞嘧啶(cC)以及未修饰的胞嘧啶。

[0042] 此外，过去的发明是基于：(i) 亚硫酸氢盐可转化的胞嘧啶与染色质(细胞型独立的，100%亚硫酸氢盐可转化的DNA基因座)总量的比率，或(ii) 基于亚硫酸氢盐可转化的胞嘧啶(fC、cC、未修饰的胞嘧啶)与亚硫酸氢盐不可转化的胞嘧啶(hmC和mC)的比率。这些比率表征细胞类型、细胞分化、细胞阶段以及病理细胞阶段。因此，新技术将导致新的更特定的比率，可补充当前的细胞特异性、细胞状态特异性以及表现遗传修饰的病理模式，并因此

定义潜在的新型生物标志物。待发现的作为生物标志物的新比率可以定义为：

[0043] 生物标志物比率 = a/b

[0044]  $a = \Sigma (C \text{ 和/或 } mC \text{ 和/或 } hmC \text{ 和/或 } fC \text{ 和/或 } cC)$

[0045]  $b = \Sigma (C \text{ 和/或 } mC \text{ 和/或 } hmC \text{ 和/或 } fC \text{ 和/或 } cC)$ ，

[0046] 由此a和b彼此相差1-4种修饰。新的DNA修饰的发现将扩大这个列举。

[0047] 出于本申请定义的目的，DNA序列中的“表观遗传修饰”通过以下的术语来提及：(i) 亚硫酸氢盐可转化的胞嘧啶 (5-甲酰基胞嘧啶 (fC) 和/或5-羧基胞嘧啶 (cC))，和(ii) 亚硫酸氢盐不可转化的胞嘧啶 ((包括5-甲基胞嘧啶 (mC)、5-羟甲基胞嘧啶 (hmC))。由于这两种甲基化 (mC和hmC) 都不是亚硫酸氢盐可转化的，而不可能区别二者，同样，fC、cC以及未修饰的胞嘧啶都是亚硫酸氢盐可转化的，也不能相互区分。术语“甲基化的”DNA包括mC以及hmC。术语“非甲基化的”DNA包括fC、cC和未修饰的DNA。预计将来会发现DNA修饰的新型变体。每种修饰类型会为亚硫酸氢盐可转化的或不可转化的。然而，由于本发明的方法可靠地区分这两个群组，这些新的修饰也可以用作标志物。

[0048] 此外，除了DNA的修饰之外，组蛋白也进行翻译后修饰，这改变了它们与DNA和核蛋白的相互作用。修饰包括甲基化、乙酰化、磷酸化、泛素化、苏素化 (sumoylation)、瓜氨酸化和ADP-核糖基化。组蛋白H2A、H2B和H3的核心也可以被修饰。组蛋白修饰在多种生物过程如基因调控、DNA修复、染色体浓缩 (有丝分裂) 和精子发生 (减数分裂) 中发挥作用。另外，对于这些修饰，特定的修饰模式对不同的细胞类型、细胞阶段、分化状态是特异的，并且可以分析这种模式的亚硫酸氢盐可转化性或类似的方法以鉴定某些细胞和细胞阶段。本发明还包括这些修饰的应用。

[0049] 总之，使用本文所述的LRP5基因区，特别是扩增子作为标志物，本申请的发明人非常特别地鉴定、定量特别是分化的B细胞，以及它们与样品中其他细胞类型，例如其他血细胞的关系。

[0050] 现在将基于以下实施例并参照附图和序列列表进一步描述本发明，但本发明不限于此。出于本发明的目的，本文引用的所有参考文献通过引用整体并入。

[0051] 图1显示了根据本发明的扩增子No. 2249 (SEQ ID No. 1) 上的CpG位点的分析。表中的水平框对应于所分析的扩增子中的CpG位置 (例如CpG 1、2等)，所表示的位置 (105、114、159、163、167、171、194、208、213、218、223、261、272、285、306、336、357、384、423和433，对应于CpG 3、4、...等)，并且列对应于所分析的细胞类型。在底部的缩写分别表示为：BLC25 = B淋巴细胞；CTL01 = CD8<sup>+</sup>细胞毒性T细胞；GRC52 = 粒细胞；MOC26 = CD14<sup>+</sup>单核细胞；NKC15 = CD56<sup>+</sup>NK-细胞；以及THC14 = CD4<sup>+</sup>辅助T细胞。

[0052] SEQ ID No. 1显示了根据本发明的扩增子AMP2249的基因组序列。

[0053] SEQ ID No. 2和3显示了本发明优选的qPCR测定系统的亚硫酸氢盐转化的靶区域的序列。

[0054] SEQ ID No. 4-11显示了根据本发明的特定寡聚物 (引物和探针) 的序列。

## 实施例

[0055] 实施例1

[0056] 为了鉴定B细胞，在源于根据以下序列 (AMP2249, SEQ ID No. 1) 的人基因组区的亚



[0072]

正向扩增引物	2249r	ATATCCAAATATCCTACCCTCC (SEQ ID No. 4)
反向扩增引物	2249q	ATTTTTGTGTGATTTTAGGGTT (SEQ ID No. 5)
正向引物, TpG-特异的	2249r_T_fw	AATATTACAACCATACACCCAACAA (SEQ ID No. 6)
反向引物, TpG-特异的	2249q_T_rev	AAGTGATAGAATTTTATGTTTTTTTATG (SEQ ID No. 7)
探针, TpG-特异的	2249_TP	TTAGTTGAGGTGAGGTGTTTTGTTAGT (SEQ ID No. 8)
正向引物, CpG-特异的	2249r_C_fw	ATTAATATTACGACCGTACGC (SEQ ID No. 9)
反向引物, CpG-特异的	2249q_C_rev	CGATAGAATTTTACGTTTTTTTAC (SEQ ID No. 10)
探针, CpG-特异的	2249_CP	ACGAAACGCCTCGCCTCGA (SEQ ID No. 11)

[0073] 如图2中所示,使用测试模板(质粒-DNA)证明了TpG特异的PCR系统的特异性。

[0074] 发现的细胞类型特异性(如通过qPCR所测量的)如下:

免疫细胞群体	CP-值 TpG-PCR	TpG-拷贝	CP-值 CpG-PCR	CpG-拷贝	B-细胞 [%]
[0075] CD8+ 细胞	35.3	11.9	26.3	5323.3	0.22
CD4+ 细胞	34.1	17.9	26.4	4900.0	0.36
B-细胞	25.1	8213.3	31.7	128.0	98.47
粒细胞	35.0	13.1	26.1	5980.0	0.22
[0076] 单核细胞	33.9	19.6	25.9	6913.3	0.28
GRK01	31.4	94	26.8	3723.3	2.46

## 序列表

<110>	艾皮恩蒂斯有限公司(Epiontis GmbH)	
<120>	LRP5作为用于鉴定免疫细胞特别是B细胞的表观遗传标志物	
<130>	E31799W0	
<150>	GB1516972.5	
<151>	2015-09-25	
<160>	11	
<170>	SIP0SequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	488	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	1	
	gtatccaaat gtctgcct ccaggtttca ttcettgccg taaaatatca cgttaaagga	60
	aaatgttttg ttaaaagacc acagtctgt cacctgagca cagtcgctgt tctcggttcc	120
	tctgtggctt tccaggctgc aggtgccat tggattgcg gccgtgcgcc cggcgggcat	180
	gaattagctg tgccgctgg ctgctgacgg gacgcctgc ctcgactgaa aactacctgg	240
	agctgctcac ccaggggcaa cgtaagaaa acgtgaaatt ctgtcgttg ttgcagctga	300
	cagcacggct gtgaggccc agtgggcaga ggctcgtgc agggcacctc accagccggg	360
	atgtcagagc tggccagaag gagcgggtgcc catggagggc tgccagtgcc cagagagcct	420
	tccgaggtgt cacgttgggc agtgaattc agagtcgggc agaggaggcc ctggggctcac	480
	acagggat	488
<210>	2	
<211>	138	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	2	
	aatattacaa ccatacacc aacaacata aattaactat accacctaac tactaacaaa	60
	acacctcacc tcaactaaaa actacctaaa actactcacc caaaaacaac ataaaaaaaa	120
	cataaaattc tatcaactt	138
<210>	3	
<211>	138	
<212>	DNA	
<213>	智人(Homo sapiens)	
<400>	3	
	attaatatta cgaccgtaag cccgacgaac ataaattaac tataccgct aactactaac	60
	gaaacgcctc gcctcgacta aaaactacct aaaactactc acccaaaaac aacgtaaaaa	120
	aaacgtaaaa ttctatcg	138

<210> 4	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 4	
atatccaaat atcctaccct cc	22
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 5	
atTTTTgtgt gattttaggg tt	22
<210> 6	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 6	
aatattacaa ccatacaccc aacaa	25
<210> 7	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 7	
aagtgataga atTTTatgTT tTTTTatg	29
<210> 8	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 8	
ttagttgagg tgagggttt tgttagt	27
<210> 9	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 9	
attaatatta cgaccgtacg c	21
<210> 10	
<211> 25	
<212> DNA	

---

<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 10	
cgatagaatt ttacgttttt ttac	25
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 智人 (Homo sapiens)	
<400> 11	
acgaaacgcc tcgcctcg	18

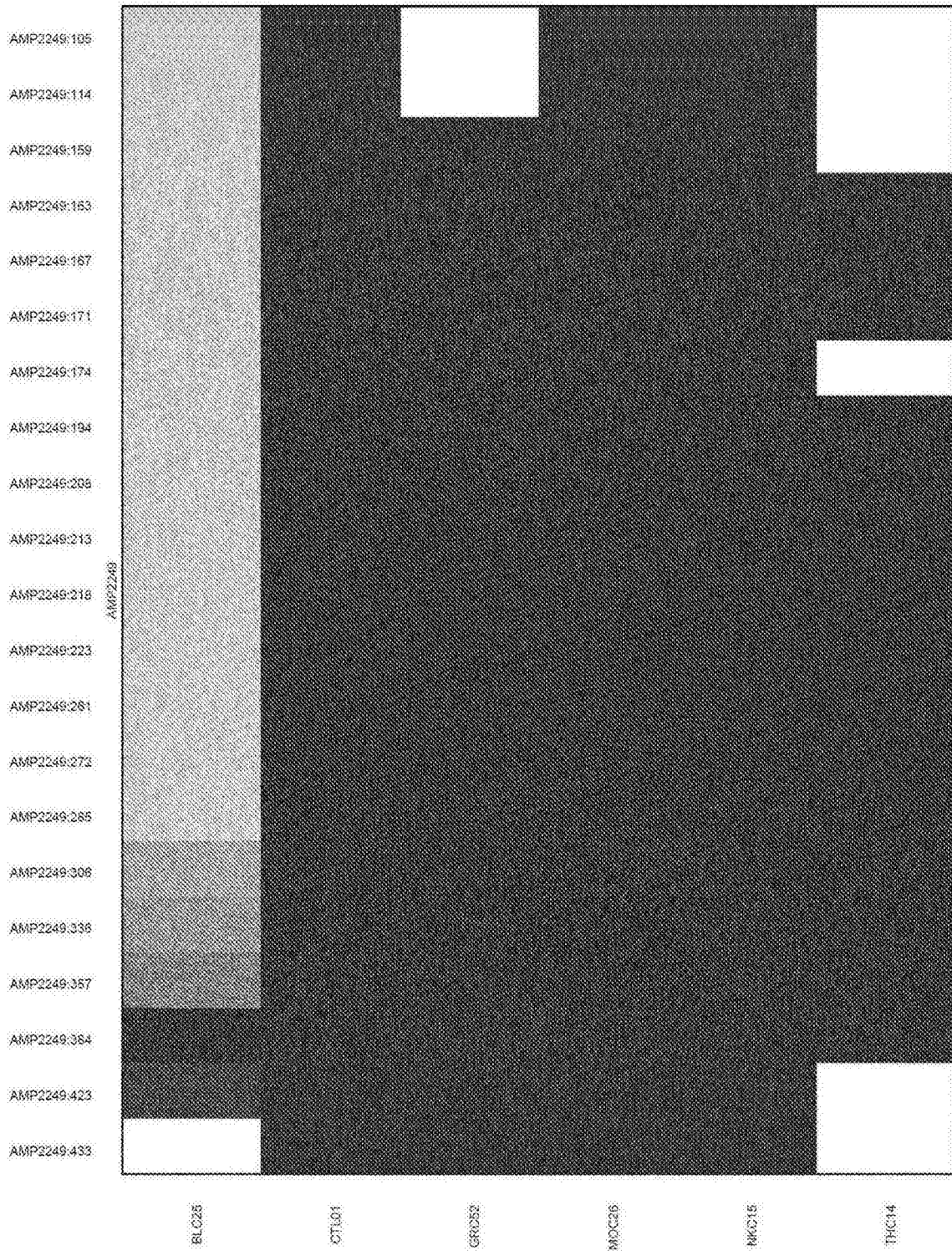


图1

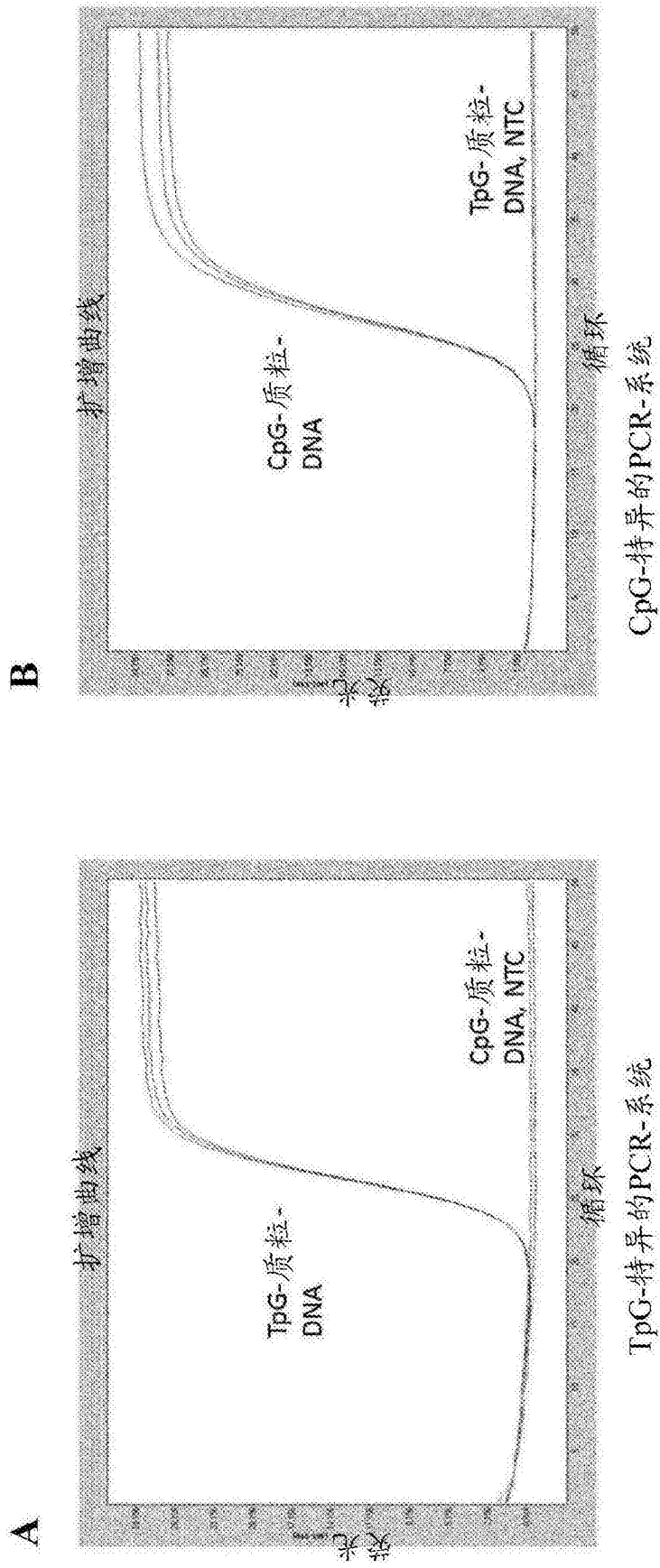


图2