



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115315530 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 08

(21) 申请号 202180023436.0

(22) 申请日 2021.01.28

(30) 优先权数据

10-2020-0010053 2020.01.28 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2021/001154 2021.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/154009 KO 2021.08.05

(71) 申请人 建誉立嗣股份公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 赵相来 文永镐 韩振日

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理师 左路 区斌

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2006.01)

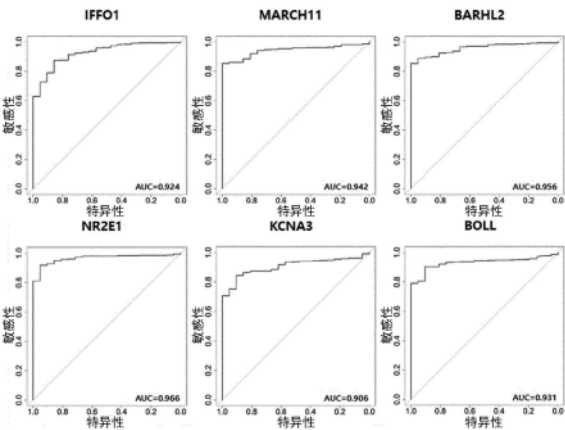
权利要求书1页 说明书12页 附图4页

(54) 发明名称

使用特定基因中CPG甲基化改变以诊断膀胱癌的组合物及其用途

(57) 摘要

本发明涉及通过检测选自 IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3 和 BOLL 组成一组中的至少一个基因的 CpG 位点的甲基化水平而能诊断膀胱癌的组合物、试剂盒、核酸和方法。根据本发明，由于基因的 CpG 位点的高甲基化在膀胱癌中特异性呈现，因此根据本发明的组合物、试剂盒、芯片或方法可用于精确且快速地诊断膀胱癌，并用于早期诊断和监测复发。



1. 一种用于诊断膀胱癌的组合物质,其包含用于测量选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平的物质。

2. 权利要求1的组合物质,其中所述CpG位点位于距所述基因的转录起始位点 $\pm$ 3000个碱基(3kb)之间。

3. 权利要求1的组合物质,其中所述用于测量所述基因的CpG位点甲基化水平的物质选自:

修饰未甲基化胞嘧啶或甲基化胞嘧啶碱基的化合物;

特异于来自所述样品的选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化序列的引物;和

特异于未甲基化序列的引物。

4. 权利要求3的组合物质,其中修饰未甲基化胞嘧啶碱基的化合物是亚硫酸氢盐或其盐,并且修饰甲基化胞嘧啶碱基的化合物是Tet蛋白。

5. 一种用于诊断膀胱癌的试剂盒,其包含用于扩增片段的引物对,所述片段包含选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点。

6. 一种用于诊断膀胱癌的核酸芯片,其中固定了能够与片段杂交的探针,所述片段包含选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点。

7. 一种用于提供用于诊断膀胱癌的信息的方法,包括:

测量来自疑似患有膀胱癌的患者样品的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平,所述至少一个基因选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL;和

将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

8. 权利要求7的方法,其中所述用于测量甲基化水平的方法选自无亚硫酸氢盐检测方法、甲基化特异性聚合酶链反应、实时甲基化特异性聚合酶链反应、使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR、定量PCR、焦磷酸测序和亚硫酸氢盐测序。

9. 权利要求7的方法,其中所述样品选自组织、细胞、血液、血浆、血清、粪便和尿液。

10. 一种用于测量分离自对象的生物学样品中至少一个基因的CpG位点的甲基化水平以提供诊断膀胱癌的复发或进展所需的信息的方法,所述至少一个基因选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL。

11. 权利要求10的方法,其中所述对象是被诊断有膀胱癌的患者或已经接受过膀胱癌治疗的患者。

12. 权利要求10的方法,其中所述生物学样品是尿液。

13. 用于测量选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的物质在制备用于诊断膀胱癌的物质中的用途。

14. 一种用于诊断膀胱癌的方法,包括以下步骤:

a) 从对象获取样品;

b) 测量来自所述样品的选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;和

c) 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

使用特定基因中CpG甲基化改变以诊断膀胱癌的组合物及其用途

技术领域

[0001] 本申请要求2020年1月28日提交的韩国专利申请No.10-2020-0010053的优先权，其全部内容为本申请的参考。

[0002] 本发明涉及通过检测选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平而能诊断膀胱癌的组合物、试剂盒、核酸和方法。

背景技术

[0003] 膀胱癌是发生于膀胱黏膜的癌症，是泌尿系统癌症中最常见的癌症。膀胱癌最常见的症状是血尿，在65岁以上的老年人中，膀胱癌导致血尿的比例约为25%。一般来说，当血尿或膀胱刺激症状持续存在时，怀疑可能存在膀胱癌并进行诊断膀胱癌的检测。

[0004] 膀胱癌最基本的检查是尿液分析和细胞学检查。尿液分析是检查尿液中红细胞和炎症细胞的存在情况，细胞学检查是确定癌细胞是否脱落在尿液中的检查。如果这些检测结果呈阳性，则很有可能患有泌尿系统癌症，包括膀胱癌。此外，还有一个优点是非侵入性检测且价格低廉，但也有一个缺点是精确性低。

[0005] 当通过尿液分析或细胞学检查怀疑膀胱癌并肉眼观察到血尿时，进行膀胱镜检查。在这个检测中，当内窥镜插入在局部麻醉下的尿道时，通过直接观察膀胱中是否存在癌症来确认膀胱中肿瘤的存在、位置、形状、数量和大小。但是，这种方法的缺点是检查费用昂贵，而且是侵入性的，在早期膀胱癌的情况下很难被检测出来。

[0006] 膀胱癌的早期发现与癌症的良好预后有关，并且与生活质量直接相关。此外，由于膀胱癌复发频繁，定期随访检查是必不可少的，因此有必要克服现有各种膀胱癌诊断方法的缺点，开发一种可有效实现早期诊断和复发监测的非侵入性检查方法。

[0007] 同时，表观遗传学是研究在DNA碱基序列未改变的状态下调控基因表达的领域。表观遗传学是研究通过表观遗传变异调控基因表达，所述表观遗传变异如DNA甲基化、乙酰化、甲基化、磷酸化、miRNA或组蛋白的遍在化等。

[0008] 其中，DNA甲基化是研究最多的表观遗传变异。表观遗传变异可导致基因功能变化和肿瘤细胞的变化。因此，DNA甲基化与细胞内疾病的调节基因的表达(或抑制和诱导)相关，并且最近已经提出了通过测量DNA甲基化来诊断癌症的方法。特别是，由于癌症特异性甲基化即使在癌前组织中也预先发生，因此癌症特异性甲基化的检测很有可能用于癌症的诊断。

[0009] 因此，有必要开发能预测膀胱癌风险的有效的膀胱癌特异性甲基化标志物。

[0010] 发明简述

[0011] 技术问题

[0012] 本发明人发现特定基因中的CpG位点在膀胱癌中是高甲基化的，因此开发了通过检测甲基化水平而能诊断膀胱癌的组合物、试剂盒、核酸芯片和方法，从而完成了本发明。

[0013] 本发明的一个目的是提供用于诊断膀胱癌的组合物，其包含用于测量特定基因的

CpG位点的甲基化水平的物质。

[0014] 本发明的目的还在于提供诊断膀胱癌的组合物,其由用于测量特定基因的CpG位点甲基化水平的物质组成。

[0015] 本发明的目的还在于提供膀胱癌诊断用组合物,其主要由用于测量特定基因的CpG位点甲基化水平的物质组成。

[0016] 本发明的另一个目的是提供诊断膀胱癌的试剂盒,其包含用于扩增包括特定基因的CpG位点的片段的PCR引物对,以及用于对由该引物对扩增的PCR产物进行焦磷酸测序的测序引物。

[0017] 本发明的另一个目的是提供诊断膀胱癌的核酸芯片,其中固定有在严格条件下能与包括特定基因的CpG位点的片段杂交的探针。

[0018] 本发明的又一个目的是提供提供诊断膀胱癌的信息的方法,包括测量和比较来自不同样品的特定基因的CpG位点的甲基化水平。

[0019] 本发明的再一个目的是提供测量分离自对象的生物学样品中特定基因的CpG位点的甲基化水平的方法,以提供诊断膀胱癌复发或进展所需的信息。

[0020] 本发明的再一个目的是提供测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的物质在制备用于诊断膀胱癌的物质中的用途。

[0021] 本发明的再一个目的是提供诊断膀胱癌的方法,包括以下步骤:

[0022] a) 从对象获取样品;

[0023] b) 测量来自样品的由IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL中至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;和

[0024] c) 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

[0025] 技术方案

[0026] 为了实现该目的,本发明提供了诊断膀胱癌的组合物,其包含测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平的物质。

[0027] 另外,本发明提供了诊断膀胱癌的组合物,其由测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的物质组成。

[0028] 此外,本发明提供了诊断膀胱癌的组合物,其主要由测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的物质组成。

[0029] 为了实现另一个目的,本发明提供了诊断膀胱癌的试剂盒,其包含扩增片段的引物对,所述片段包含选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点。

[0030] 为了实现又一个目的,本发明提供了诊断膀胱癌的核酸芯片,其中固定有与片段杂交的探针,所述片段包含选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点。

[0031] 为了实现再一个目的,本发明提供了提供诊断膀胱癌的信息的方法,该方法包括测量来自怀疑患有膀胱癌的患者样品的选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;及

[0032] 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

[0033] 为了实现又一目的,本发明提供了测量分离自对象的生物样品中选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的方法,以提供诊断膀胱癌复发或进展所需的信息。

[0034] 为了实现再一目的,本发明提供了测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平的物质在制备用于诊断膀胱癌的物质中的用途。

[0035] 为了实现又一目的,本发明提供了诊断膀胱癌的方法,包括以下步骤:

[0036] a) 从对象获取样品;

[0037] b) 测量样品中选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;和

[0038] c) 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

[0039] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本领域技术人员通常理解的含义相同。以下参考文献为技术人员提供了本说明书中使用的各种术语的一般定义: Singleton et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2th ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); 及 Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY。

[0040] 在下文中,将详细描述本发明。

[0041] 本发明提供了诊断膀胱癌的组合,其包含测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平的物质。

[0042] 如本文所用,术语“甲基化”是指甲基基团连接到构成DNA的碱基上。优选地,在本发明中,甲基化是指特定基因的特定CpG位点的胞嘧啶是否发生甲基化。当甲基化发生时,转录因子的结合受到干扰,从而抑制特定基因的表达。相反,当发生非甲基化或高甲基化时,特定基因的表达会增加。

[0043] 在哺乳动物细胞的基因组DNA中,除了A、C、G和T之外,还有第五个碱基,称为5-甲基胞嘧啶(5-mC),其具有连接于胞嘧啶环的第五个碳的甲基。5-甲基胞嘧啶的甲基化仅发生在称为CpG的CG二核苷酸的C上(5'-mCG-3'), CpG的甲基化抑制 α lu或转座子和基因组重复序列的表达。此外,由于CpG的5-mC天然脱氨基很容易成为胸腺嘧啶(T),因此CpG是哺乳动物细胞中最常发生表观遗传变化的位点。

[0044] 在本发明中,术语“甲基化水平的测量”是指测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平,并且可以提供根据亚硫酸氢盐(bisulfite)处理的检测方法或无亚硫酸氢盐检测方法进行。甲基化水平可以通过甲基化特异性PCR测量,例如甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)、实时甲基化特异性聚合酶链反应(PCR)、使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR或定量PCR。或者,甲基化水平可以通过自动测序例如焦磷酸测序和亚硫酸氢盐测序来测量,但不限于此。此外,甲基化水平可以使用利用10-11易位蛋白(TET蛋白)作为无亚硫酸氢盐检测方法的检测方法来测量(见Nature Biotechnology, volume 37, pages 424-429 (2019))。TET蛋白是一种作用于DNA并参与碱基

化学变化的酶,当亚硫酸氢盐处理时,除甲基化C外的所有C都转化为T碱基,而在Tet蛋白中,只有甲基化C转化为T以可以实现有效检测。

[0045] 优选地,选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点是指存在于该基因的DNA上的CpG位点。基因的DNA是包括基因表达所需的并且可操作地相互连接的所有一系列结构单元的概念,并且可以包括例如启动子区域、开放阅读框(ORF)和终止子区域。因此,选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点可以存在于相应基因的启动子区、开放阅读框(ORF)和终止子区域中。

[0046] 优选地,在本发明中,测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平可以是指测量下表1示出的基因的CpG位点中胞嘧啶的甲基化水平。

[0047] [表1]

符号	基因组构建	染色体	区域
IFF01	GRCh37	12	6664426-6665336
MARCH11	GRCh37	5	16179065-16180420
BARHL2	GRCh37	1	91185157-91185577
NR2E1	GRCh37	6	108485672-108490539
KCNA3	GRCh37	1	111216245-111217937
BOLL	GRCh37	2	198649752-198651599

[0049] 在本发明中,其特征在于选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点位于距基因的转录起始位点(TSS) +/- 3000个碱基(3kb)之间。

[0050] 在本发明中,人基因组染色体区域的碱基序列是根据2009年2月人参考序列(GRCh37)表达的,但是人基因组染色体区域的特定序列的表达可能会随着基因组序列的研究结果的更新而略有改变,本发明的人基因组染色体区域的表达可以根据变化而变化。因此,在根据本发明的2009年2月人参考序列(GRCh 37)表达的人基因组染色体区域中,由于人参考序列在本发明的申请日之后已经更新,即使人基因组染色体区域的表达从现在是不同改变,显然本发明的范围影响改变的人基因组染色体区域。本发明所属领域的普通技术人员可以容易地看到这些变化。

[0051] 在本发明中,测量CpG位点的甲基化水平的物质可以包括修饰胞嘧啶碱基或甲基化敏感性限制酶的化合物,特异于选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的甲基化等位基因序列的引物,以及特异于未甲基化等位基因序列的引物。

[0052] 所述修饰胞嘧啶碱基的化合物是修饰未甲基化胞嘧啶或甲基化胞嘧啶的化合物,可以是亚硫酸氢盐或其盐,优选修饰未甲基化胞嘧啶的亚硫酸氢钠,或修饰甲基化胞嘧啶的TET蛋白,但不限于对此。检测CpG位点是否通过修饰胞嘧啶碱基而被甲基化的方法是本领域熟知的(WO01/26536;US2003/0148326A1)。

[0053] 此外,甲基化敏感性限制酶可以是能特异性检测CpG位点的甲基化的限制酶,并且可以是含有CG作为限制酶的识别位点的限制酶。其实例包括SmaI、SacII、EagI、HpaII、MspI、BssHII、BstUI、NotI等,但不限于此。取决于在限制性酶识别位点的C的甲基化或非甲基化,所述限制酶的切割会有所不同,并且可以通过PCR或Southern印迹分析检测到。除了限制酶之外的甲基化敏感性限制酶是本领域熟知的。

[0054] 所述引物可以包括选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的甲基化等位基因序列特异性引物和未甲基化等位基因序列特异性引物。

[0055] 在本发明中,术语“引物”是指能与互补模板形成碱基对并作为复制模板链的起点的短核酸序列,作为具有短的游离3'-末端羟基的核酸序列。在适当的缓冲液和温度下,在存在聚合试剂(即DNA聚合酶或逆转录酶)和四种不同的三磷酸核苷的情况下,所述引物可以启动DNA合成。此外,所述引物是具有7至50个核苷酸的序列的有义和反义核酸,并且可以掺入其它特征而不改变用作DNA合成起始位点的引物的基本性质。

[0056] 本发明的引物可以优选根据特定CpG位点的序列设计以分析甲基化,更优选可以是选自以下引物中的至少引物:能特异性扩增被甲基化为未被亚硫酸氢盐修饰的胞嘧啶的引物对,能特异性扩增未被甲基化为被亚硫酸氢盐修饰的胞嘧啶的引物对,及能特异性扩增被甲基化为被基于Tet的蛋白质修饰的胞嘧啶的引物对,以及能特异性扩增被未被甲基化为且未被基于Tet的蛋白质修饰的胞嘧啶的引物对。

[0057] 因此,本发明提供了诊断膀胱癌的试剂盒,其包含用于扩增片段的引物对,所述片段包含选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点。

[0058] 在所述组合物和试剂盒中,除了所述制剂以外,还可以另外包括电泳所需的聚合酶琼脂糖缓冲液等。

[0059] 此外,本发明提供了诊断膀胱癌的核酸芯片,其中固定了能与包括选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的片段杂交的探针。

[0060] 在本发明中,术语“核酸”是指寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或其片段,单链或双链基因组或合成来源的DNA或RNA,有义或反义链的基因组或合成来源的DNA或RNA,以及肽核酸(PNA)或天然或合成来源的DNA或RNA类似物材料。如果核酸是RNA,本领域技术人员将清楚的是,代替脱氧核苷酸A、G、C和T,是核糖核苷酸A、G、C和U分别被取代。

[0061] 由于甲基化从基因的调控位点的外部开始并进行到其内部,因此可以早期诊断参与细胞转化的基因,并通过检测调控位点外的甲基化来监测治疗后的进展或复发。

[0062] 因此,可以使用甲基化基因标志物早期诊断可能形成膀胱癌的细胞。当确认在癌细胞中是甲基化的基因在临床或形态学上正常的细胞中是甲基化的时,所述正常表现的细胞正在癌化。因此,通过确认正常表现的细胞中膀胱癌特异性基因的甲基化,可以早期诊断膀胱癌并监测其治疗后的进展或复发。

[0063] 此外,本发明提供了用于提供诊断膀胱癌的信息的方法,包括测量来自怀疑患有膀胱癌的患者样本的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平,所述至少一个基因选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL;并将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

[0064] 用于测量甲基化水平的方法可以选自PCR、甲基化特异性PCR、实时甲基化特异性PCR、使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR、使用甲基化敏感限制酶测量是否存在甲基化、定量PCR、DNA芯片、焦磷酸测序和亚硫酸氢盐测序,但不限于此。

[0065] 具体而言,甲基化特异性PCR的方法是在用亚硫酸氢盐处理样品DNA后,根据CpG二核苷酸是否被甲基化,设计和使用不同类型的引物作为引物进行PCR的方法。如果引物结合位点已被甲基化,则PCR使用甲基化引物进行,如果未甲基化,则PCR使用正常引物进行。即,所述方法是用亚硫酸氢盐处理样品DNA,同时使用两种引物进行PCR,并比较结果的方法。

[0066] 实时甲基化特异性PCR是将甲基化特异性PCR方法转变为实时测量方法,并通过用亚硫酸氢盐处理基因组DNA、设计与甲基化对应的PCR引物并使用这些引物来进行实时PCR。此时,有两种方法:使用与扩增的碱基序列互补的TanMan探针的检测方法和使用Sybergreen的检测方法。因此,实时甲基化特异性PCR可以仅选择性定量分析甲基化DNA。在这种情况下,所述方法是使用体外甲基化DNA样品制作标准曲线,并通过扩增碱基序列中没有5'-CpG-3'序列的基因一起作为标准化的阴性对照来定量分析甲基化水平。

[0067] 在使用甲基化敏感性限制酶测量甲基化的方法中,甲基化敏感性限制酶以CpG二核苷酸为作用位点,当这个位点被甲基化时不作为酶发挥作用。因此,当将样品DNA用甲基化敏感性限制酶处理,然后通过PCR扩增以包括酶靶向位点时,所述限制酶在甲基化的情况下不起作用,但是通过PCR扩增,而未甲基化的正常位点被限制切酶切割且不通过PCR扩增,从而测量特定DNA位点是否被甲基化。

[0068] 在使用甲基化DNA特异性结合蛋白的PCR或DNA芯片方法中,当将仅与甲基化DNA特异性结合的蛋白质与DNA混合时,所述蛋白质仅与甲基化DNA特异性结合,因此可以仅选择性分离甲基化DNA。将基因组DNA与甲基化DNA特异性结合蛋白混合后,仅选择性分离甲基化DNA。这是使用对应于内含子位点的PCR引物扩增这些分离的DNA,然后通过琼脂糖电泳测量是否发生甲基化的方法。此外,甲基化甚至可以通过定量PCR来测量,并且将通过甲基化DNA特异性结合蛋白分离的甲基化DNA用荧光染料标记并与与互补探针整合的DNA芯片杂交以测量甲基化。在此,甲基化的DNA特异性结合蛋白不限于MBD2bt。

[0069] 此外,亚硫酸氢盐处理的DNA的焦磷酸测序基于以下原理。当在CpG二核苷酸位点发生甲基化时,形成5-甲基胞嘧啶(5-mC),其中经亚硫酸氢盐处理后修饰的碱基变为尿嘧啶。如果当从样品中提取的DNA用亚硫酸氢盐处理时CpG二核苷酸已被甲基化,则CpG二核苷酸被保留为胞嘧啶,而剩余的未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶。亚硫酸氢盐处理的DNA的测序可以优选使用焦磷酸测序方法进行。焦磷酸测序的详细描述是本领域已知的。

[0070] 同时,通过使用Tet蛋白的无亚硫酸氢盐检测方法,使用Tet蛋白可以只将甲基化的C转化为T以检测在甲基化区域的碱基(见LIU,Yibin,et al.,Nature Biotechnology volume 37,pages 424-429(2019))。

[0071] 当甲基化发生在CpG二核苷酸位点从而胞嘧啶形成为5-甲基胞嘧啶(5-mC)时,CpG二核苷酸在用10-11易位(Tet)蛋白处理时已甲基化变为尿嘧啶,并且未甲基化胞嘧啶被保留。Tet处理的DNA的测序不仅限于焦磷酸测序法,还可以使用甲基化敏感PCR(MSP)、微阵列、下一代测序(NGS)等方法进行。

[0072] 优选地,本发明的提供诊断膀胱癌的信息的方法可以通过包括以下步骤的方法进行:a)从对象获得样品,b)从样品中获得基因组DNA,c)用修饰未甲基化胞嘧啶碱基的化合物处理获得的基因组DNA,d)通过使用焦磷酸测序用引物通过PCR扩增处理的DNA获得PCR产物,所述引物能扩增选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的启动子,以及e)通过使用测序引物对PCR产物进行焦磷酸测序来测量甲基化水平。

[0073] 步骤b)中获取基因组DNA可以采用本领域常用的苯酚/氯仿提取法、SDS提取法、CTAB分离法或可商购市售的DNA提取试剂盒进行。

[0074] 在本发明中,术语“样品”是指广泛的体液,包括从个体获得的所有生物体液、体液、细胞系、组织培养物等,这取决于要进行的分析类型。从哺乳动物获得体液和组织活检

的方法通常是众所周知的,并且在本发明中,所述样品可以优选选自人衍生物,包括组织、细胞、血液、血浆、血清、粪便和尿液。由于在使用本发明的标志物的情况下,癌症组织中的异常甲基化改变显示出与得自生物学样品如细胞、全血、血清、血浆、唾液、痰、脑脊液或尿液的基因组DNA中的甲基化改变呈现显著的相似性,因此具有可以通过血液、体液等便于诊断的优点。

[0075] 同时,本发明提供了测量分离自对象的生物学样品中选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点甲基化水平的方法,以提供诊断膀胱癌复发或进展所需的信息。

[0076] 在本方法中,“对象”可以是动物,优选包括哺乳动物、特别是人等动物,也可以是来源于动物的细胞、组织、器官等。对象可以是需要所述效果的患者,优选是疑似膀胱癌的患者、经诊断有膀胱癌的患者或接受膀胱癌治疗的患者。

[0077] 此外,“样品”与上述相同含义,但优选用于诊断复发或进展的样品可以是对象或患者获得的尿液。

[0078] 在本发明中,膀胱癌的复发或进展诊断可以包括膀胱癌的预后。“预后”是指在膀胱癌治疗期间或治疗后疾病进展的过程,优选是指治疗后疾病进展的过程,包括总生存期、无病生存期或无远处转移生存期,但不限于此。此外,膀胱癌的进展是包括膀胱癌的治愈、复发、转移或转移性复发的概念,更优选是指转移性复发,但不限于此。

[0079] 本发明提供了测量选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平的物质在制备用于诊断膀胱癌的物质中的用途。

[0080] 本发明提供了诊断膀胱癌的方法,包括以下步骤:

[0081] a) 从对象获取样本;

[0082] b) 测量样品中选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;和

[0083] c) 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较。

[0084] 一方面,本发明提供了诊断和治疗对象的膀胱癌的方法,包括以下步骤:

[0085] i) 从对象获取样本;

[0086] ii) 测量样品中选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的甲基化水平;

[0087] iii) 将测量的甲基化水平与正常对照样品中相同基因的CpG位点的甲基化水平进行比较;和

[0088] iv) 通过为确定的对象施用治疗膀胱癌的治疗药物或通过手术来治疗膀胱癌。

[0089] 包括步骤i)至iv)的方法基于上述包括步骤a)至c)的方法来理解。

[0090] 步骤iv)是通过诸如为对象施用治疗药物或手术的手段进行疾病治疗的步骤,所述对象的疾病在步骤iii)中诊断。

[0091] 本发明的“治疗”泛指改善膀胱癌或其症状,并且可以包括治疗或基本上预防该疾病,或改善其状况并且包括减轻、治疗或预防源自膀胱癌的症状或大部分症状,但不限于此。

[0092] “治疗药物”的类型没有特别限制,只要治疗药物是通常用于治疗膀胱癌的任何类

型的药物即可。此外,治疗药物以“治疗有效剂量”施用于对象,其中对于患者的治疗有效剂量可以由本领域技术人员通过考虑各种因素例如年龄、体重、健康状况和患者的性别、疾病的严重程度、饮食和排泄率等,以及药物的独特性质、施用途径和治疗时间而定。治疗药物的施用途径没有特别限制,治疗药物可以口服或肠胃外途径施用,包括局部施用和全身施用。肠胃外施用不限于此,例如可以是鼻内施用、皮下注射等,作为其它实例可以使用肌肉射、静脉内注射等方法。

[0093] 本发明的“样品”是从疑似患有疾病的对象分离和获得的,但不限于此,而是可以选自细胞、组织、血液、血清、血浆、唾液、痰、黏膜液和尿液样品。“对象”可以是动物,优选包括哺乳动物、特别是人等动物,并且可以是源自动物的细胞、组织、器官等。对象可以是需要治疗效果的患者。

[0094] 本文使用的术语“包含”与“包括”或“特征在于”具有相同的含义,并且不排除在根据本发明的组合物或方法中未具体提及的其它成分或方法步骤。除非另有说明,术语“由…组成”是指不包括其它元件、步骤或成分等。术语“基本上由…组成”是指在所述组合物或方法的范围内除了所述材料或步骤之外包括基本上不影响其基本性质的材料或步骤。

[0095] 有利效果

[0096] 如上所述,由于选自IFF01、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的高甲基化在膀胱癌中特异性呈现,因此可以精确且快速地诊断膀胱癌,并且还可以监测在使用根据本发明的组合物、试剂盒、芯片或方法治疗后的早期诊断和复发。

[0097] 附图描述

[0098] 图1是确认根据本发明选择的共6个基因在肿瘤组织(肿瘤)组和非肿瘤组织(正常)组之间甲基化差异的结果。

[0099] 图2是确认根据本发明选择的共6个基因在肿瘤组织(肿瘤)细胞系组中的甲基化信息的结果。

[0100] 图3是确认根据本发明选择的共6个基因在外周血单核细胞中的甲基化信息的结果。

[0101] 图4是确认根据本发明选择的共6个基因针对每种外周血单核细胞的甲基化信息的结果。

[0102] 图5是确认根据本发明选择的共6个基因的膀胱癌诊断准确性的结果。

[0103] 发明的模式

[0104] 在下文中,将提出优选实施例以帮助理解本发明。然而,提供以下实施例只是为了更容易理解本发明,本发明的内容不受实施例的限制。

[0105] 实施例1:膀胱癌特异性甲基化基因的选择

[0106] 为了选择在膀胱癌中特异性发现的甲基化基因,使用大规模甲基化微阵列芯片数据对膀胱癌患者癌症手术获得的癌组织和正常组织进行了大规模甲基化比较研究。这项研究中使用的肿瘤组织是指膀胱癌的癌组织,非肿瘤组织是指包括除了癌组织以外的正常组织的组织。分析中使用的膀胱癌组织数量为412个,非肿瘤组织数量为21个。

[0107] 为了选择膀胱癌特异性甲基化基因,从每个组织中提取DNA,并使用Infinium Human Methylation 450Beadchip微阵列确认基因区域的甲基化水平。

[0108] 将从各组织提取的DNA通过亚硫酸氢盐处理进行转化,由此根据DNA位点是否甲基

化而修饰胞嘧啶碱基。相应的微阵列实验中使用的探针针对甲基化和去甲基化而特别设计,以确认基因甲基化区域中的胞嘧啶碱基是否被修饰。

[0109] 微阵列实验通过代表每个基因的甲基化区域的约450,000 (450k) 个探针测量基因的甲基化水平,并且将来自实验的每个探针的结果呈现为 β 值。 β 值为0至1的值,并且经确定该值越接近1,则对应基因区域的甲基化水平越高。

[0110] 为了鉴定肿瘤组和非肿瘤组之间的差异甲基化区域 (DMR),通过使用经验贝叶斯t检验的微阵列数据线性模型 (Limma) 方法,鉴定在组之间具有统计学显著甲基化差异的基因区域。

[0111] 已知Limma方法在鉴别组间差异的几种甲基化统计分析方法中受异常值影响最小。因此,该方法是一种适合发现癌症特异性标志物的方法,因为该方法受某些样品异常测量值的影响较小。在本实验中,确定了两组之间的甲基化存在显著差异,因为通过Limma方法得出的调整后的p值较小。

[0112] 特别地,为了寻找肿瘤特异性甲基化区域,在肿瘤组和非肿瘤组之间 β 值差异显著的基因区域中,选择肿瘤组织中甲基化程度高于非肿瘤组织的基因区域作为癌症特异性生物标志物候选物。

[0113] 结果,作为数据集的limma分析的结果,与非肿瘤组相比,在比较肿瘤组时,选择在450,000个探针中第10,000个探针内具有低p值以及组间 β 值为0.3或更高的较大差异的基因区域,作为肿瘤特异性高甲基化区域。结果,在大约450,000个基因区域中,选择在数据集中表现出肿瘤特异性高甲基化的352个基因区域作为候选生物标志物。

[0114] 在这些基因区域中,当相应区域不是假基因时,其存在于CpG岛位点中,位于距基因转录起始位点 (TSS) $\pm$ 3000个碱基 (3kb) 之间选择的基因区域中,并且存在于常染色体中,选择所述相应区域作为膀胱癌特异性高甲基化基因。结果,如下表2所示,共选择了6个基因 (见图1)。

[0115] [表2]

[0116]	符号	名称	位置(染色体)	CpG 岛
	IFFO1	中间丝家族孤啡肽蛋白(intermediate filament family orphan)1 (IFFO ; HOM-TES-103)	12	岛
	MARCH11	膜相关环-CH-型指蛋白(membrane associated ring-CH-type finger)11 (RNF226; MARCHF11; MARCH-XI)	5	岛
	BARHL2	BarH 样同源框 2	1	岛
	NR2E1	核受体亚家族 2 组 E 成员 1(nuclear receptor subfamily 2 group E member 1)	6	岛
	KCNA3	电压门控钾离子通道亚家族 A 成员 3(potassium voltage-gated channel subfamily A member 3) (MK3 ; HGK5 ; HLK3 ; PCN3 ; HPCN3 ; KV1.3 ; HUKIII)	1	岛
	BOLL	boule 同源物 RNA 结合蛋白(boule homolog, RNA binding protein) (BOULE)	2	岛

[0117] 实施例2:细胞系中膀胱癌诊断基因的膀胱癌特异性确认

[0118] 为了确认六个选择的基因的高甲基化是否是由膀胱癌细胞引起的,使用公共数据库大量分析了源自膀胱癌的20个癌细胞系中的甲基化模式。对于相应的数据,根据制造商的标准化甲基化分析测试程序,对从每个细胞系中提取的DNA进行Infinium Human Methylation 450Beadchip微阵列实验。

[0119] 在进行的实验的结果值中,与实施例1一样,通过约450,000个探针测量基因的甲基化水平,并且每个探针的甲基化值以 β 值表示。 β 值为0至1的值,并且经确定该值越接近1,则对应基因区域的甲基化水平越高。

[0120] 所述20个膀胱癌细胞系如下:5637 (comic ID:687452),639-V (comic ID:906798),647-V (comic ID:906797),BFTC-905 (comic ID:910926),CAL-29 (comic ID:1290730),DSH1 (comic ID:753552),HT-1197 (comic ID:907065),HT-1376 (comic ID:907066),J82 (comic ID:753566),KU-19-19 (comic ID:907312),LB831-BLC (comic ID:753584),RT-112 (comic ID:909704),RT4 (comic ID:687455),SCABER (comic ID:1299051),SW1710 (comic ID:909749),SW780 (comic ID:687457),T-24 (comic ID:724812),TCCSUP (comic ID:687459),UM-UC-3 (comic ID:724838),VM-CUB-1 (comic ID:909780)。

[0121] 作为确认六个选择的基因在膀胱癌细胞系中的甲基化水平结果,每个基因的甲基化中位值均为0.93或更高,这示出高水平的甲基化值,如选择的基因在肿瘤组织中高甲基化水平一样(见图2)。因此,确认选择的基因在膀胱癌中具有特异性甲基化。

[0122] 实施例3:外周血单核细胞中膀胱癌诊断基因低甲基化水平的确认

[0123] 外周血单核细胞(PBMC)是具有球形细胞核的外周血细胞。这些外周血单核细胞包括如T细胞、B细胞、巨噬细胞、树突细胞、自然杀伤细胞(NK细胞、自然杀伤细胞)等免疫相关细胞。

[0124] 为了确认选择的六个基因的甲基化水平,需要一个获取癌症样品的步骤。这些样品涉及范围广泛的体液,包括得自个体的所有癌症相关的生物液、体液、细胞系、组织培养物等,具体取决于要进行的分析类型。在获取样品的过程中,外周血单核细胞的污染是抑制甲基化测量最频繁发生的原因,并且通过外周血单个细胞中待测基因的甲基化影响癌症样品中的基因甲基化水平。

[0125] 为了确定选择的六个基因是否受到外周血单核细胞污染的影响,对总共110名对象的外周血单核细胞的甲基化模式进行了分析。对于数据,将从外周血单核细胞中提取的DNA按照实施例1和2中的标准化制造商的甲基化分析测试方法进行Infinium Human Methylation 450Beadchip微阵列实验。在进行的实验的结果值中,通过大约450,000个探针测量基因的甲基化水平,每个探针的甲基化值以 β 值表示。 β 值为0至1的值,经确定该值越接近1,则对应基因区域的甲基化水平越高。

[0126] 作为确认六个选择的基因的外周血单核细胞中甲基化水平的结果,每个基因的甲基化中位值均小于0.10,这示出低水平的甲基化值,而所述选择的基因的在肿瘤组织呈现高甲基化水平(见图3)。因此,证实所述选择的基因在膀胱癌中具有特异性甲基化。

[0127] 此外,对构成外周血单核细胞的细胞群进行甲基化分析,以分析特定细胞群是否影响样品中甲基化水平的测量。在共6份正常血样中,将构成PBMC的细胞群分为全血、外周血单核细胞(PBMC)、粒细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD56+NK细胞、CD19+B细胞、CD14+细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞以分析DNA甲基化水平。通过如实施例1和2中的Infinium Human Methylation 450Beadchip微阵列实验测量甲基化水平。

[0128] 作为确认六个选择的基因的外周血单核细胞的每个细胞亚群的水平结果,每个基因的甲基化中位值最多小于0.16,并且选择的基因即使在每个外周血单核细胞中也示出低甲基化水平值(见图4)。

[0129] 这些结果意味着,由于所选择的基因在外周血单核细胞中表现出低甲基化水平,因此外周血单核细胞的污染对样品中相应基因的甲基化测量的影响极为有限。

[0130] 实施例4:膀胱癌诊断基因的 diagnostic 性能评估

[0131] 为了确认选择的基因作为膀胱癌诊断标志物的效用,评估根据甲基化水平诊断膀胱癌的精确性。

[0132] 为了评估诊断的精确性,使用敏感性和特异性评估。通过计算连续诊断测试测量值的可行的截止值的敏感性和特异性值,可以示出根据截止值呈现敏感性和特异性变化的接收者操作特征(ROC)曲线。诊断的精确性可以通过ROC曲线下面积(AUC)来衡量。AUC值在0.5至1之间,并且经评估所述值越高,则诊断精确性越高。如果AUC值为1,则意味着诊断结果是完全精确的测试,但如果AUC值为0.5,则确定诊断结果与随机结果相同。

[0133] 如图7所示,通过使用收集的甲基化数据集,根据选择的基因在非肿瘤组织和肿瘤组织之间的甲基化水平分析癌症分类精确性的结果,确认了所有选择的基因均具有0.906或更高的曲线下面积(AUC)值以具有高诊断精确性,因此选择的基因可用于诊断膀胱癌(见图5)。

[0134] 工业适用性

[0135] 如上所述,由于选自IFFO1、MARCH11、BARHL2、NR2E1、KCNA3和BOLL的至少一个基因的CpG位点的高甲基化在膀胱癌中特异性呈现,因此可以精确且快速地诊断膀胱癌,并且还

可以监测在使用根据本发明的组合物、试剂盒、芯片或方法治疗后的早期诊断和复发。

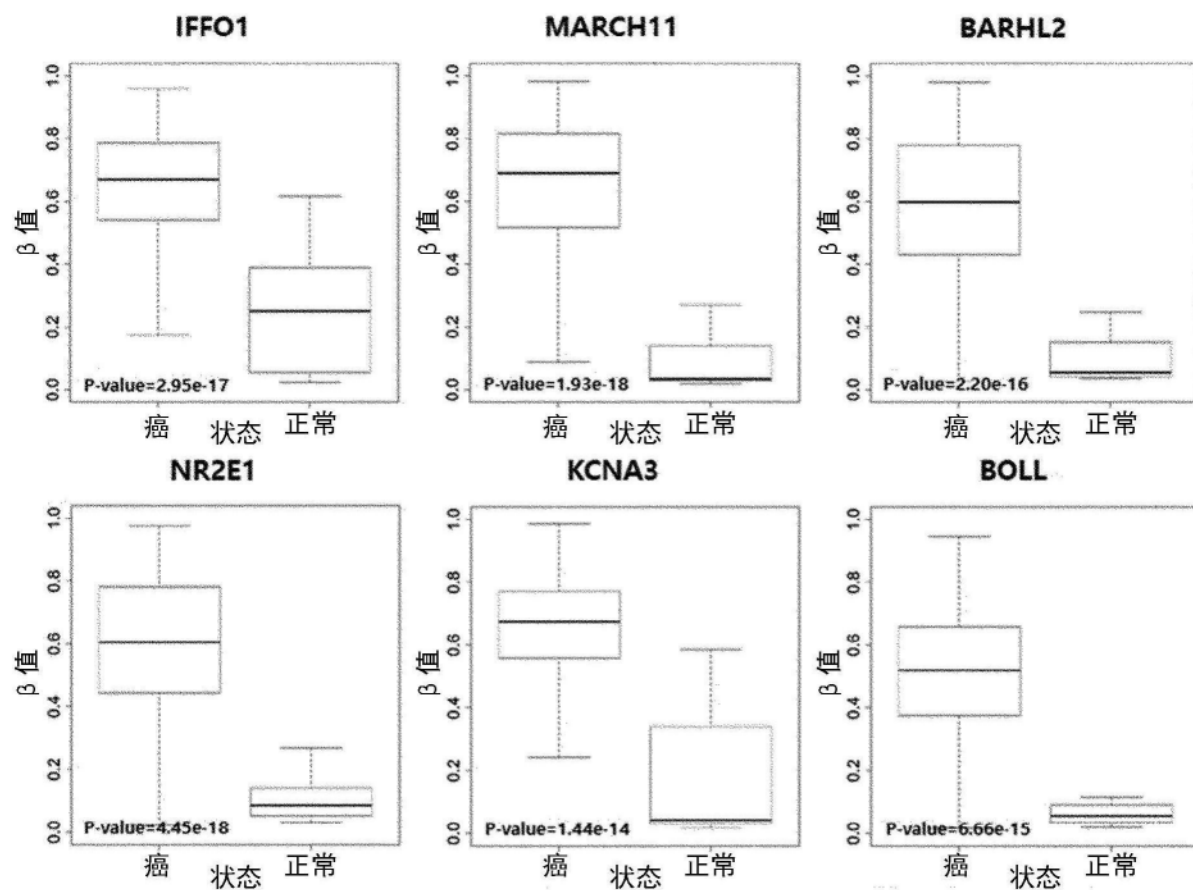


图1

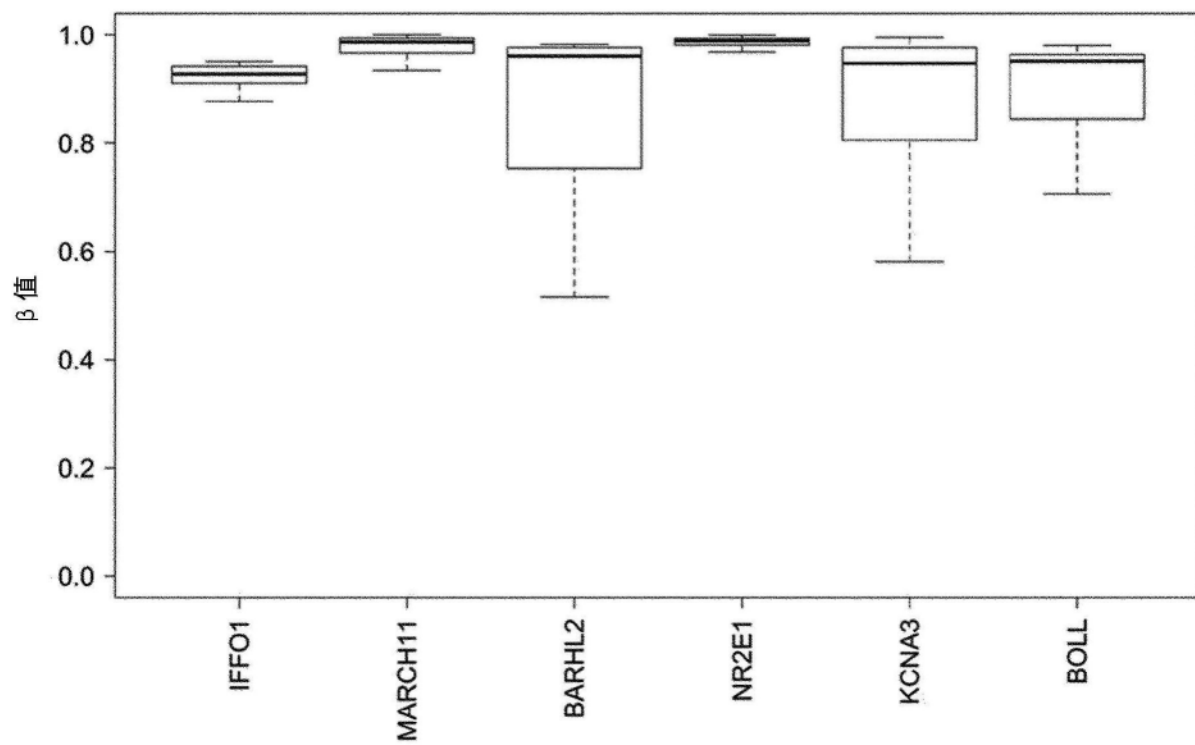


图2

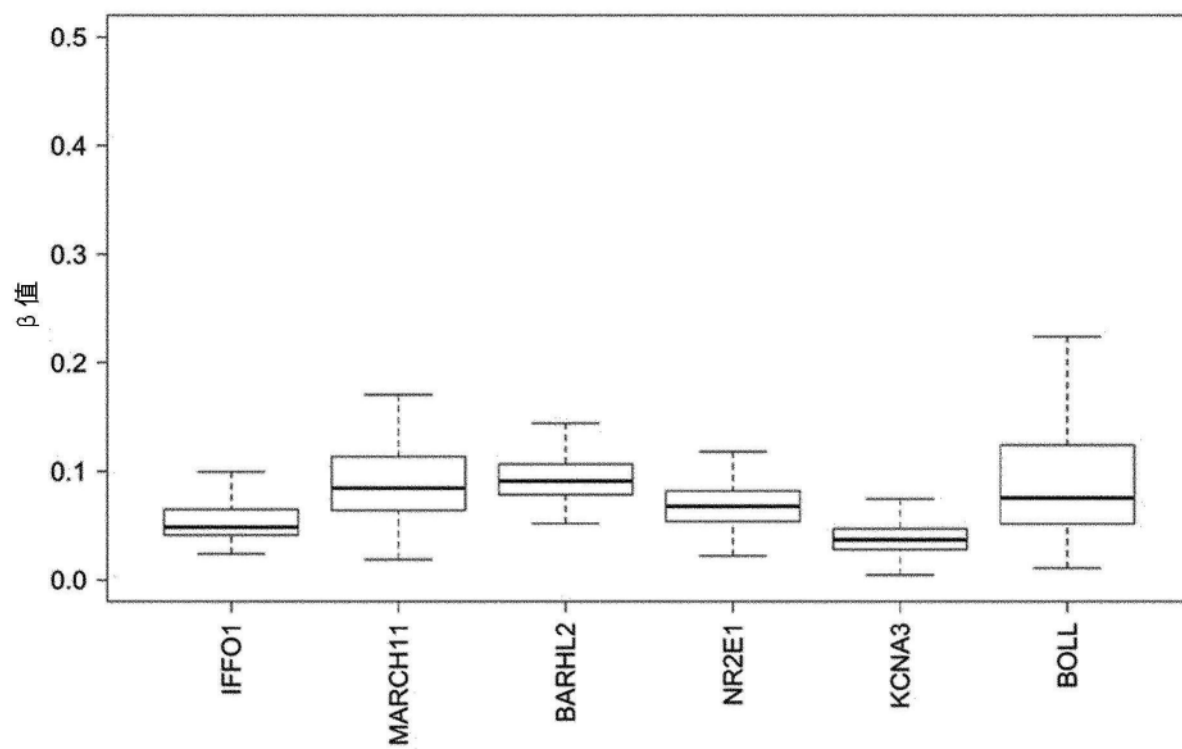


图3

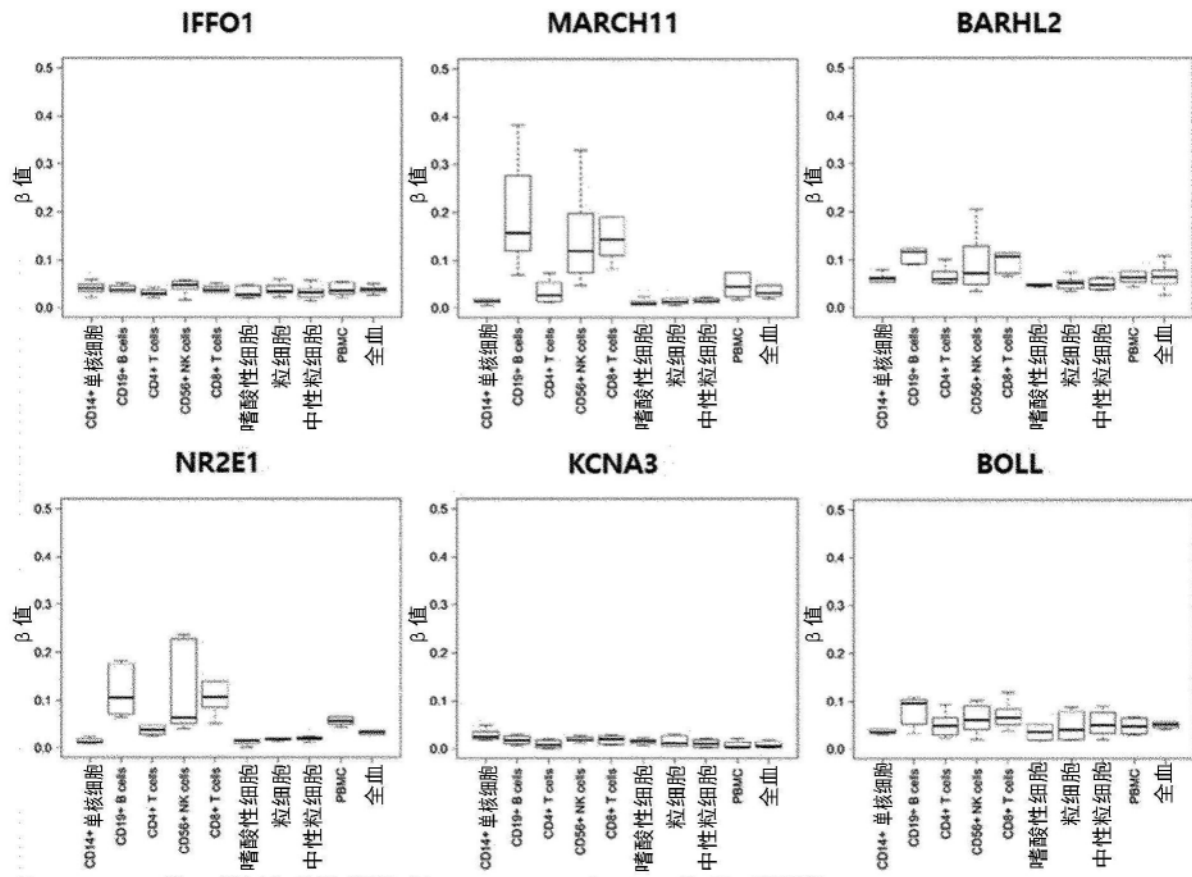


图4

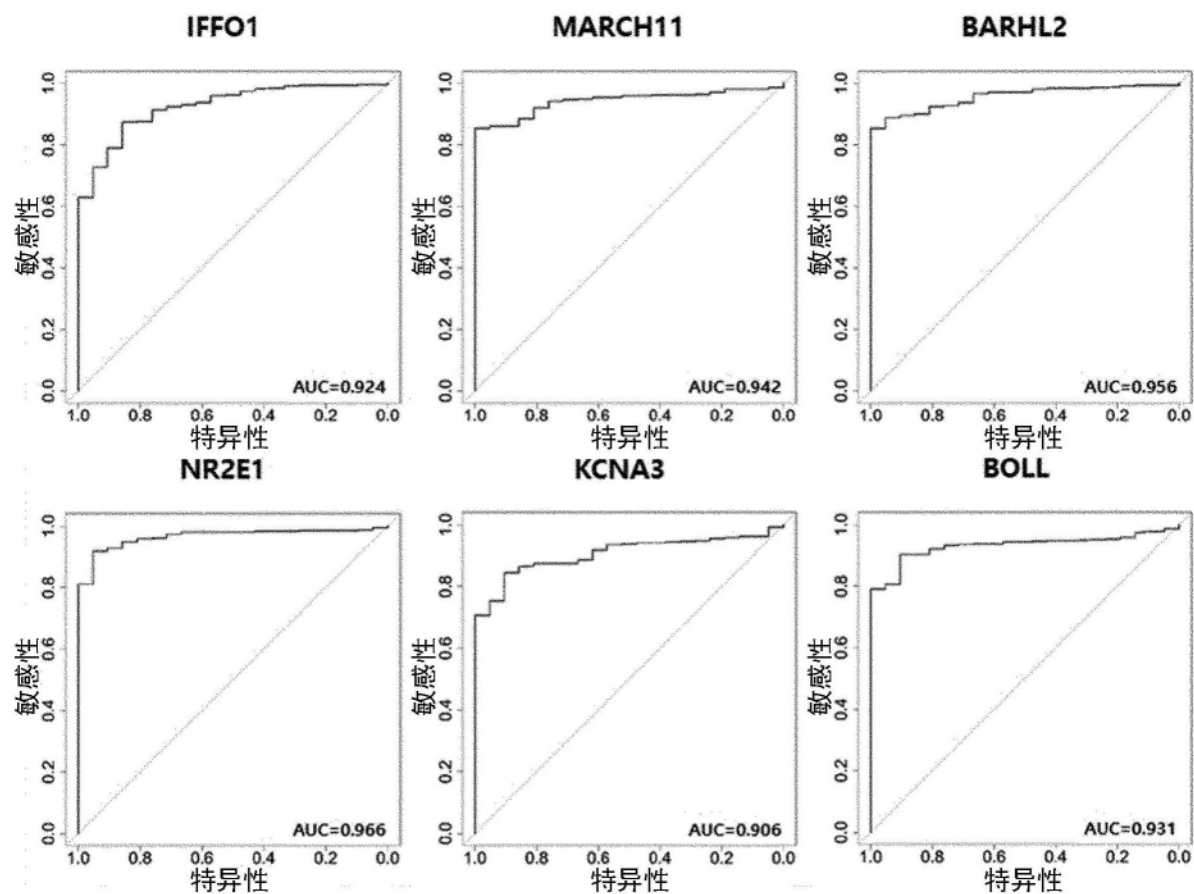


图5