



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111247253 A

(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201880068476.5

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(22)申请日 2018.10.26

有限责任公司 11204

(30)优先权数据

代理人 王达佐 洪欣

102017125335.1 2017.10.27 DE

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6881(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.21

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/079406 2018.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/081707 EN 2019.05.02

(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

权利要求书2页 说明书9页

序列表3页 附图3页

(54)发明名称

作为用于鉴定免疫细胞尤其是非典型单核细胞的表观遗传标记的扩增子区

(57)摘要

本发明涉及用于鉴定非典型单核细胞的方法,尤其是体外方法,其包括分析包含扩增子的哺乳动物基因组区中至少一个CpG位置的甲基化状态,其中当与典型单核细胞或非单核细胞细胞相比,所述区域的去甲基化或缺乏甲基化指示出非典型单核细胞。根据本发明的分析可在表观遗传水平上鉴定非典型单核细胞,并将它们与复杂样品中的所有其他细胞(例如其他血液或免疫细胞)区分开。本发明还提供了用于定量尤其是在复杂样品中的非典型单核细胞的改进方法。可以在没有纯化和/或富集细胞的步骤的情况下,优选在全血和/或非胰蛋白酶化组织中进行所述方法。

1. 用于鉴定样品中的非典型单核细胞的方法,其包括分析哺乳动物的2213扩增子内的基因组区域中的至少一个CpG位置的甲基化状态,其中优选地根据SEQ ID No.1定位所分析的所述区域,其中与典型单核细胞或非单核细胞相比,所述区域的去甲基化或缺乏甲基化指示出非典型单核细胞。

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2213扩增子内的任何基因的转录起始上游的5'区、启动子区、5'或3'非翻译区、外显子、内含子、外显子/内含子边界中和/或转录终止下游的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位置选自这样的CpG,其选自根据SEQ ID No.1的扩增子中的CpG位置30、89、123、169、206、242和248,并且优选地选自扩增子第2213号的片段中或根据SEQ ID No.2或3的亚硫酸氢盐转化的序列的片段中的CpG位置30、169、206和242。

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促消化、亚硫酸盐测序的方法,选自启动子甲基化、CpG岛甲基化、MSP、重甲基、荧光定量法、Ms-SNuPE的分析,以及其它依赖于检测扩增的DNA的方法。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其还包括基于比较所分析的2213扩增子中的所述甲基化频率的相对量与对照基因例如GAPDH中的甲基化频率的相对量来定量非典型单核细胞的相对量。

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,包括人血样品或组织、器官或细胞类型血样品、血液淋巴细胞样品或其级分。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其还包括区分所述非典型单核细胞与选自以下的所有或至少一种细胞类型:滤泡辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、典型单核细胞、B细胞、NK-细胞和T-辅助细胞以及源自血液之外的器官的其他细胞类型。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的方法,其中在无纯化和/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/或非胰蛋白酶化组织进行所述方法。

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非典型单核细胞断定所述哺乳动物的免疫状态的步骤。

10. 用于监测哺乳动物中的非典型单核细胞的水平的方法,其包括进行权利要求5至9中任一项所述的方法,以及比较所鉴定的所述细胞与更早或同时从相同哺乳动物取得的样品和/或对照样品的所述相对量。

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/或生物物质的所述非典型单核细胞的量。

12. 如权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物罹患或可能罹患自身免疫性疾病、移植排斥、感染性疾病、癌症和/或过敏。

13. 用于基于分析2213扩增子内的基因组区中的CpG位置的亚硫酸氢盐可及性来鉴定、定量和/或监测哺乳动物中的非典型单核细胞的试剂盒,其包括用于进行权利要求1至12中任一项所述的方法的组分,特别是包括以下的试剂盒:a) 亚硫酸氢盐试剂,和b) 用于分析选自根据SEQ ID No:1的区域中的CpG位置的CpG位置的甲基化状态的材料,诸如选自根据SEQ ID No:4至11的序列的寡聚物。

14. SEQ ID No.4至11中任一项的寡聚物或SEQ ID No.1、2或3的扩增子。

15. 权利要求13所述的试剂盒或权利要求14所述的寡聚物或扩增子用于鉴定、定量和/或监测哺乳动物中的非典型单核细胞的用途。

作为用于鉴定免疫细胞尤其是非典型单核细胞的表观遗传标记的扩增子区

[0001] 本发明涉及用于鉴定非典型单核细胞的方法,特别是体外方法,其包括分析包含扩增子的哺乳动物基因组区中至少一个CpG位置的甲基化状态,其中当与典型单核细胞或非单核细胞细胞相比时,所述区域的去甲基化或缺乏甲基化指示出非典型单核细胞。根据本发明的分析可在表观遗传水平上鉴定非典型单核细胞,并将它们与复杂样品中的所有其他细胞(诸如,例如其他血液或免疫细胞)区分开。本发明还提供了用于定量特别是在复杂样品中的非典型单核细胞的改进方法。所述方法可以在没有纯化和/或富集细胞的步骤的情况下,优选在全血和/或非胰蛋白酶化组织中进行。

[0002] 此外,本发明涉及用于进行上述方法的试剂盒以及其相应用途。本发明的一个目的是提供一种新型、更稳健的定量检测和测量哺乳动物的任何实体器官或组织内的血液或任何其他体液的非典型单核细胞的方法。

背景技术

[0003] 单核细胞是最大的白血细胞(白细胞)类型。它们构成了人体所有白细胞的2%至10%,并且其中约有一半储存在脾脏中。单核细胞是包括所有哺乳动物(包括人类)、鸟类、爬行动物和鱼类在内的脊椎动物先天免疫系统的一部分,并因此可以影响适应性免疫的过程。单核细胞可分化为巨噬细胞和髓系谱系树突细胞以引发免疫响应。单核细胞在免疫功能中起到多种作用。此类作用包括:(1)在正常状态下补充常驻巨噬细胞,以及(2)响应于炎性信号,单核细胞可以迅速迁移到组织中的感染部位。

[0004] 人血中至少存在三种类型的单核细胞,其不同之处为其细胞表面受体的表达。“典型”单核细胞的特征在于高水平的CD14细胞表面受体表达(CD14++CD16-单核细胞)。相反,“非典型”单核细胞表达CD14和另外共表达CD16受体。“非典型”单核细胞还可细分为显示低水平CD14表达和高CD16共表达的单核细胞(CD14+CD16++单核细胞)。“中间”单核细胞表达高水平的CD14和低水平的CD16(CD14++CD16+单核细胞)。

[0005] 即使个体中几乎所有细胞都含有完全相同的DNA密码的互补序列,高级生物也必须在各种类型的组织中施加并维持不同的基因表达模式。大多数基因调控是暂时的,取决于细胞的当前状态和外部刺激的变化。另一方面,持久调控是表观遗传学的主要作用-可遗传的调控模式,不改变DNA的基本遗传编码。DNA甲基化是表观遗传调控的典型形式;它充当细胞的稳定记忆,并在维持各种细胞类型的长期同一性中发挥关键作用。最近,发现了其他形式的表观遗传调控。除了“第五碱基”5-甲基胞嘧啶(mC)之外,可发现第六(5-羟甲基胞嘧啶,hmC)、第七(5-甲酰基胞嘧啶,fC)和第八(5-羧基胞嘧啶,cC)(Michael J. Booth等人Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 2012年5月18日,第336卷第6083期第934-937页)。

[0006] 提及的DNA修饰的主要靶标是两核苷酸序列胞嘧啶-鸟嘌呤(“CpG位点”);在这种情况下,胞嘧啶(C)可以进行简单的化学修饰以被甲酰化、甲基化、羟甲基化或羧基化。在人类基因组中,CG序列比预期的少得多,除了在称为“CpG岛”的某些相对密集的簇中。CpG岛经

常与基因启动子相关,并且据估计,超过一半的人类基因具有CpG岛 (Antequera和Bird, Proc Natl Acad Sci USA 90:11995-9, 1993)。

[0007] DNA的异常甲基化通常与健康细胞向癌性细胞的转化有关。在观察到的作用中有全基因组的次甲基化,肿瘤抑制基因的甲基化增加以及许多致癌基因的次甲基化(由例如以下综述:Jones和Laird, Nature Genetics 21:163-167, 1999;Esteller, Oncogene 21: 5427-5440, 2002; 和Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003)。甲基化谱已被认为是肿瘤特异性的(即,特定基因或甚至单个CpG的甲基化模式的改变都可以诊断特定的肿瘤类型),并且现在存在一组广泛的膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、食道癌、胃癌、肝癌、肺癌和前列腺癌的诊断标记(例如由Laird, Nature Reviews/Cancer 3:253-266, 2003概述)。

[0008] 对于最近描述的胞嘧啶修饰之一即5-羟基甲基化,显示了氧化亚硫酸盐测序在CpG岛上作图和定量5hmC的效用 (Michael J. Booth等人Quantitative Sequencing of 5-Methylcytosine and 5-Hydroxymethylcytosine at Single-Base Resolution Science 2012年5月18日,第336卷第6083期第934-937页)。在与转录调控因子相关的CpG岛和长散在核元件中发现了高水平的5hmC。提示这些区域可能在胚胎干细胞中进行表观遗传重编程。

[0009] WO 2012/162660描述了使用DNA甲基化阵列的方法,所述DNA甲基化阵列经提供用于鉴定细胞或细胞混合物以及用于定量血液或组织中细胞分布的变化,以及用于诊断、预后和治疗疾病状况,特别是癌症。该方法使用新鲜和档案样本。

[0010] Zawada等人(于:Zawada等人DNA methylation profiling reveals differences in the 3 human monocyte subsets and identifies uremia to induce DNA methylation changes during differentiation. Epigenetics. 2016年4月2日; 11 (4) : 259-72. doi:10.1080/15592294.2016.1158363. Epub 2016年3月28日)使用下一代甲基测序来公开单核细胞的不同亚组的DNA甲基化组内的差异。他们进一步描述了在单核细胞中具有差异甲基化启动子区的基因,这些基因与不同的免疫学过程相关。没有提及2213扩增子内的基因组区。

[0011] Illingworth等人(于:Illingworth等人A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. PLoS Biol. 2008年1月; 6 (1) : e22. doi:10.1371/journal.pbio.0060022)公开了与源自血样品的粒细胞相比,单核细胞中三个不同CpG岛的甲基化模式内的变异。没有给出2213扩增子的启示。

[0012] Accomando等人(于:Accomando等人Quantitative reconstruction of leukocyte subsets using DNA methylation. Genome Biol. 2014年3月5日; 15 (3))公开了细胞谱系-特异性DNA甲基化模式将正常人白细胞亚组区分开并可用于检测和定量外周血中的这些亚组。他们使用DNA甲基化同时定量多个白细胞亚组,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。没有提及扩增子2213。

[0013] 鉴于上述情况,本发明的目的是提供基于DNA-甲基化分析的改进的且特别稳健的方法作为更好的工具,以便更方便且可靠地检测、鉴定、区分和定量非典型单核细胞。

[0014] 本发明通过提供用于鉴定样品中的非典型单核细胞的方法解决了上述目的,所述方法包括分析包含2213扩增子(AMP 2213)序列的哺乳动物(如人)基因组区中至少一个CpG位置的甲基化状态(亚硫酸氢盐可转化性),其中优选地基于/根据SEQ ID No. 1定位所分析

的所述区域,其中与典型单核细胞或非单核细胞细胞相比,所述区域的去甲基化或缺乏甲基化指示出非典型单核细胞。

[0015] 2213扩增子内的哺乳动物区尚未与特定基因相关联。在本发明的上下文中,该区域应包含与2213扩增子内的任何基因有关并编码2213扩增子内的任何基因的整个基因组区。因此,包含了属于2213扩增子内任何基因的增强子区、一个或多个启动子区、内含子、外显子和非编码区(5' -和/或3' -区)。因此,优选的是根据本发明的方法,其中至少一个CpG位置存在于转录起始上游的5' 区、启动子区、5' 或3' 非翻译区、外显子、内含子、外显子/内含子边界中和/或2213扩增子内任何基因的转录终止下游的3' 区中。

[0016] 本发明进一步基于本发明人对2213扩增子作为特定表观遗传标记的令人惊讶的鉴定,从而允许鉴定非典型单核细胞以及所述分析的临床常规应用。

[0017] 在本发明的上下文中,在特别是根据SEQ ID No.1的2213扩增子内的基因组区、允许鉴定非典型单核细胞。令人惊讶地,亚硫酸氢盐可转化和不可转化胞嘧啶的区分模式特别地且甚至排他地限于使用根据SEQ ID No.1的扩增子所示的非典型单核细胞的根据SEQ ID No.1的基因组区,并且特别是根据SEQ ID No.2和/或3的亚硫酸氢盐转化的序列中。

[0018] 本发明人可以证明,在非典型单核细胞中,所公开的CpG基序几乎完全脱甲基化(即至大于70%,优选80%,优选大于90%,且最优选大于95%),而在所有其他免疫细胞中相同的基序被完全甲基化。

[0019] 上述区域内CpG基序的差异甲基化是鉴定非典型单核细胞的有价值的工具,诸如对于在任何可预见的诊断背景下鉴定和定量自身免疫性疾病、移植排斥、癌症、过敏、原发性和继发性免疫缺陷(例如HIV感染和AIDS)、移植物抗宿主(GvH)、血液系统恶性肿瘤、类风湿性关节炎、多发性硬化或细胞毒性T细胞相关的免疫状态中所述细胞是所需的/或至少具有某些价值。该测定法允许无需纯化或任何染色程序即可测量非典型单核细胞。

[0020] 根据本发明的方法的另一个优选的实施方案还包括,基于比较所分析的2213扩增子中所述甲基化频率的相对量与对照基因(例如GAPDH)中的甲基化频率的相对量来定量非典型单核细胞的相对量。因此,基于如本文所述和分析的2213扩增子内的区域(如SEQ ID No.1)中亚硫酸氢盐可转化DNA与不可转化DNA之比,实现了所述定量。最优选的是,基于对2213扩增子内细胞特异性区域的亚硫酸氢盐可转化DNA的相对量和细胞-非特异性基因(优选被指定为“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的相对量的(优选平行或同时)分析。

[0021] 在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中,所述亚硫酸氢盐可转化性分析包括可以用基于SEQ ID No.1适当设计的合适引物对中的至少一个引物进行扩增,优选SEQ ID No.4至11中任一项的寡聚物。

[0022] 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,并且在一定程度上还有组织质量来进行一种或多种测量和分析。

[0023] 优选地,扩增涉及聚合酶、PCR或化学扩增反应或如下所述的技术人员已知的其他扩增方法,如在MSP、重甲基(HeavyMethyl)、蝎式(Scorpion)、MS-SNUPE、荧光定量法(MethylLight)、亚硫酸盐测序、甲基特异性限制测定和/或电子PCR的情况下(参见,例如Kristensen和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))。

[0024] 通过扩增,产生了2213扩增子,其是用于进行根据本发明的一个或多个方法的特别优选的“工具”。因此,如本文提及的根据SEQ ID No.4和5或6和7或9和10中任一项的寡聚物或由基于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本发明的优选实施方案。因此,SEQ ID No.1至3的序列(以及如果需要的话,其互补序列)可以用于设计用于扩增的引物,即在相关序列中用作“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。扩增可以在基因组和/或亚硫酸氢盐(即“转化的”)DNA序列中进行。

[0025] 技术人员还将能够选择CpG位置的特定亚组以使待分析的位点的数量最小化,例如选自根据SEQ ID No.1的扩增子中的CpG位置的CpG位置的至少一个,并优选选自根据SEQ ID No.1的扩增子第2213号中的CpG位置30、89、123、169、206、242和248。从如生成和分析的扩增子的5' -末端对位置进行数量计数,并且指定为如图1中的AMP2213:30。优选的是3、4、5、6或7个位置的组合,对其进行分析可产生足够的数据和/或信息,以便在本发明的上下文中提供信息。

[0026] 技术人员还将能够选择CpG位置的特定亚组,以使待分析的位点的数量最小化,例如特定亚硫酸氢盐可转化区(SEQ ID No.1)的扩增子第2213号中的CpG位置30、169、206和242的至少一个,或根据SEQ ID No.1的亚硫酸氢盐可转化区上存在的所有位点。位置89、123和248中的一个或多个可以被排除,优选123。

[0027] 为了分析CpG位置的亚硫酸氢盐可转化性,可使用任何已知的分析DNA甲基化的方法。在根据本发明的方法的一个优选的实施方案中,甲基化状态的分析包括选自甲基化特异性酶促消化、亚硫酸氢盐测序的方法,选自启动子甲基化、CpG岛甲基化、MSP、重甲基(HeavyMethyl)、荧光定量法(MethyLight)、Ms-SNuPE的分析,或其他依赖于检测经扩增的DNA的方法。这些方法是技术人员众所周知的,并且可以在相应的文献中找到。

[0028] 在根据本发明的方法的一个优选的实施方案中,所述方法适用于常规应用,例如在DNA芯片上。基于上述信息和相应的文献,技术人员将能够将上述方法调整为这种设置。

[0029] 在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中,在无纯化和/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/或非胰蛋白酶化组织进行所述方法。

[0030] 在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中,鉴定包括将所述非典型单核细胞与优选但不限于以下的所有主要外周血细胞类型和/或非血细胞区分开:滤泡辅助T细胞、细胞毒性T细胞、粒细胞、典型单核细胞、B细胞、NK细胞和T-辅助细胞,以及源自血液之外的器官的其他细胞类型。

[0031] 在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中,样品选自哺乳动物体液,包括人血样品,或组织、器官或白细胞样品,或此类组织、器官或白细胞的经纯化或经分离的级分,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、猴子或人。如果需要,可以适当汇集样品。

[0032] 根据本发明的方法的另一个优选的实施方案还包括基于所述B细胞断定所述哺乳动物的免疫状态的步骤。B细胞可以被定量并用作相对定量进一步详述的亚群的基准,或者其可以用作预测和/或筛选和/或诊断和/或预后和/或不良事件检测因子,或者其可以用于最终检测该群体以确定总体免疫活性状态。

[0033] 在根据本发明的方法的另一个优选的实施方案中,哺乳动物罹患或可能罹患自身

免疫性疾病、移植排斥、感染性疾病、癌症和/或过敏,如但不限于克氏锥虫感染、疟疾和HIV感染;血液系统恶性肿瘤,包括但不限于慢性粒细胞性白血病、多发性骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(Non Hodgkin's Lymphoma)、霍奇金氏病、慢性淋巴细胞性白血病、移植植物抗宿主和宿主抗移植植物疾病、蕈样真菌病、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细胞赘生物,T细胞缺陷诸如但不限于淋巴细胞减少症、严重的联合免疫缺陷(SCID)、Omenn综合征、软骨-头发发育不全、获得性免疫缺陷综合征(AIDS)和遗传性疾患诸如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、舍格伦综合征(Sjögren's syndrome)、全身性硬化症、皮肌炎、原发性胆汁性硬化、原发性硬化性胆管炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病(Crohn's disease)、牛皮癣、白癜风、大疱性类天疱疮、斑秃、特发性扩张型心肌病、1型糖尿病、格雷夫斯病(Graves' disease)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、重症肌无力、IgA肾病、膜性肾病和恶性贫血;以及B细胞和T细胞合并病症-诸如但不限于共济失调毛细血管扩张(AT)和Wiskott-Aldrich综合征(Wiskott-Aldrich syndrome, WAS);癌,包括但不限于乳腺癌、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。

[0034] 根据本发明的方法的另一个优选的实施方案涉及如上方法,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,响应于对所述患者的治疗)的非典型单核细胞的量。所述方法包括如上步骤,并比较所鉴定的所述细胞与更早或同时从相同哺乳动物取得的样品和/或对照样品的所述相对量。基于本发明的一种或多种方法所提供的结果,主治医师将能够断定患者的免疫状态,并据此调整对潜在疾病的治疗。

[0035] 优选地,在没有纯化和/或富集细胞的步骤的情况下进行所述方法,优选在全血和/或非胰蛋白酶化组织中,或在可能含有所述非典型单核细胞的任何其他生物样品,如用于将细胞转移到患者体内的样品中。

[0036] 根据本发明的方法的另一个优选的实施方案涉及如上方法,其还包括将所鉴定的所述非典型单核细胞配制用于移植至患者。用于这些目的的药物制剂和用于其产生的方法根据移植医学领域中已知的方法进行。

[0037] 根据本发明的方法的另一个优选的实施方案涉及根据SEQ ID No.4至11中任一项的寡聚物或根据SEQ ID No.1至3的扩增子。

[0038] 本发明的另一个优选的方面则涉及用于基于分析2213扩增子内的基因组区中的CpG位置的亚硫酸氢盐可及性来鉴定、定量和/或监测哺乳动物中的非典型单核细胞的试剂盒,其包括用于进行如本文所述的根据本发明的方法的组分,特别是包括以下的试剂盒:a)亚硫酸氢盐试剂,和b)用于分析选自根据SEQ ID NO.1的区域中的CpG位置的CpG位置的甲基化状态的材料,诸如选自根据SEQ ID NO.4至11的序列的寡聚物。

[0039] 本发明还涵盖了根据本发明的寡聚物或扩增子或试剂盒用于鉴定和/或监测如本文所述的哺乳动物中的非典型单核细胞的用途。

[0040] 如上所述,最近发现了三种新的胞嘧啶修饰。因此,预期未来的科学发现将纠正过去描述的表观遗传修饰模式。这些过去的胞嘧啶修饰模式涵盖亚硫酸氢盐可转化(非甲基化,未经修饰)和不可转化(甲基化,经修饰)胞嘧啶。如所述,两个末端都需要校正。根据新的科学发现,(i)非亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶包括5-甲基胞嘧啶(mC)和5-羟甲基胞嘧啶

(hmC), 以及 (ii) 亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶 (即“亚硫酸氢盐可转化性”胞嘧啶) 包括5-甲酰基胞嘧啶 (fC)、5-羧基胞嘧啶 (cC) 以及未经修饰的胞嘧啶。

[0041] 另外, 过去的发明基于 (i) 亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶与染色质总量 (非细胞类型依赖性, 100% 亚硫酸氢盐可转化DNA基因座) 的比率或 (ii) 亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶 (fC, cC, 未经修饰的胞嘧啶) 与非亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶 (hmC和mC) 的比率。这些比率表征细胞类型、细胞分化、细胞阶段以及病理性细胞阶段。因此, 新技术将产生新的、更特定的比率, 并可能补充表观遗传修饰的当前细胞特异性、细胞状态特异性以及病理模式, 并因此定义了潜在的新型生物标记。被发现为生物标记的新比率可以被定义为:

[0042] 生物标记比 = a/b

[0043] a = Σ (C和/或mC和/或hmC和/或fC和/或cC)

[0044] b = Σ (C和/或mC和/或hmC和/或fC和/或cC),

[0045] 其中a和b彼此的差异为一到四种修饰。发现新型DNA修饰将扩大这一枚举。

[0046] 为了本申请的定义的目的, DNA序列中的“表观遗传修饰”通过术语是指 (i) 亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶 (5-甲酰基胞嘧啶, (fC) 和/或5-羧基胞嘧啶 (cC)) 和 (ii) 非亚硫酸氢盐可转化胞嘧啶 ((包括5-甲基胞嘧啶 (mC)、5-羟甲基胞嘧啶, (hmC))。因为两种甲基化, mC和hmC不是亚硫酸氢盐可转化的, 所以不能区分这两者。同样, fC, cC以及未修饰的胞嘧啶是亚硫酸氢盐可转化的, 并且也不能彼此区分。术语“甲基化”的DNA涵盖mC以及hmC。术语“非甲基化的”DNA涵盖fC、cC和未修饰的DNA。预期未来将发现DNA修饰的新型变型。每种类型的修饰都将是亚硫酸氢盐可转化的, 或是不可转化的。然而, 由于本方法可靠地区分了这两组, 这些新型修饰也可用作标记。

[0047] 此外, 除DNA修饰外, 组蛋白还经历翻译后修饰, 从而改变了它们与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、SUMO化、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。组蛋白修饰作用于多种生物过程, 诸如基因调控、DNA修复、染色体凝结 (有丝分裂) 和精子发生 (减数分裂) 中。同样对于这些修饰, 特定的修饰模式对于不同的细胞类型、细胞阶段、分化状态是特定的, 并且可以针对亚硫酸氢盐可转化性或类似方法分析这种模式, 以鉴定某些细胞和细胞阶段。本发明还涵盖了这些修饰的用途。

[0048] 总之, 使用如本文所述的2213扩增子作为标记, 本发明人非常明确地鉴定、定量和特别区分了非典型单核细胞, 以及它们与样品中其他细胞类型、例如与其他血细胞的关系。

[0049] 现在将基于以下实施例并参考附图和序列表进一步描述本发明, 但不限于此。为了本发明的目的, 如本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文。

[0050] 图1显示了根据本发明的扩增子第2213号 (SEQ ID No.1) 上的CpG位点的分析。图中的列对应于其中指定了位置的所分析的扩增子中的CpG位置 (如CpG 1, 2等), 并且水平框对应于所分析的细胞类型。

[0051] 图2以表 (图2a) 和图解 (图2b) 显示了本发明测定的线性。

[0052] SEQ ID No.1显示了根据本发明的扩增子AMP2213的基因组序列。

[0053] SEQ ID No.2和3显示了本发明的优选qPCR-测定-系统的亚硫酸氢盐转化的靶区域的序列, 从而显示了亚硫酸氢盐转化后的四条可能链中的仅一条。所有四条链都是设计特异性测定的优选靶标。给定的名为亚硫酸氢盐链2正向链 (b2f) 的亚硫酸氢盐链仅仅是用

作引物和探针设计实例的一种优选靶标。反向链 (b2r) 用于互补引物。链b1f和b1r未示出，但是优选的应用。

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

实施例

[0055] 实施例1

[0056] 为了鉴定非典型单核细胞,根据以下序列(AMP2213,SEQ ID No.1)对源自人类基因组区的亚硫酸氢盐转化的样品进行了qPCR,相关的CpG为粗体和加下划线:

CCCTTCCTCTGACTCAGTGGAAAGGGCAGGAGAGTGCCCC**CGA**
 GGAGCTGCCACATCCCTGGCTGAGTGCCTCACCCCCAGGGCCT
CCACCGAGGAGCAGCTTCCACAGGGTGCCTGTGGGG**CTCG**TTCT
 [0057] CTGGATGCTTTCCCTTGCTGTGAATGCCTCTGGGG**ACGA**ATAT
 ATGCCCTGGGTCTAGGCCTAGGGCTCCGGTGACCAGGATAG
 GAAGTGTGCAAGGCCCTGCC**CG**AGGG**CGGC**ATTAGCTTTCC
 CCCCCACT

[0058] 对于血细胞亚型中扩增子区域的实际表观遗传谱分析,所分析的免疫细胞群如图1所示。

[0059] 所开发的优选的qPCR-测定-系统的亚硫酸氢盐转化的靶区域是:

[0060] TpG-特异性(SEQ ID No.2):

[0061] (b2F)

CCCTTCCTCTAACTCAATAAAAAACAAAAAAATACCCCAA
 AAAACTACCCACATCCCTAACTAAATAACCTCACCCCCAAACCTC
 [0062] **CAC**AAAAAAACAACCTCCACAAAATACCTATAAAACTCATTCTCT
 AAATACTTTCCCTTACTATAAATACCTCTAAAACACAAATATATA
 ACCCTAAATCTAACCTAAAACCTCCAATAACCAAAATAAAAAA
 [0063] ATATTACAAACCCCTACCCCAAAAACAACACATTAACTTTCCCCA
 CTACTTTCATCTACCCATCTCACCAAATTCC

[0064] CpG-特异性:(SEQ ID No.3):

[0065] (b2F)

		CCCTTCCTCTAACTCAATAAAAAACAAAAAAATACCCCGA AAAACTACCCACATCCCTAACTAAATACCTCACCCCCAAAACCTC CACGAAAAACAACCTCCACAAAATACCTATAAAACTCGTTCCTCT
[0066]		AAATACTTTCCCTTACTATAAATACCTCTAAAACACGAATATATA ACCCTTAAATCTAACCTTAAACTTCCGATAACCAAAATAAAAAA ATATTACAAACCTACCCCGAAAACGACGCATTAACCTTCCCCC ACTACTTTCATCTACCCATCTCACCAAATTCC
[0067]	以下引物和探针用于qPCR:	
	正向扩增引物 2213-fwd	CCCTTCCTCTAACTCAATAAAA (SEQ ID No. 4)
	反向扩增引物 2213-rev	AGTGGGGAAAAGTTAATG (SEQ ID No. 5)
[0068]	正向引物 TpG- 特异性 2213-TpG-fwd	CC CTTAAATCTAACCTTAAACTTCCA A (SEQ ID No. 6)
	反向引物 TpG- 特异性 2213-TpG-rev	TAGTGGGGAAAAGTTAATGTGTT (SEQ ID No. 7)
	探针 TpG-特异 性 2213-TpG-pro	ACAAACCCCTACCCCAAAAACAAACAC (SEQ ID No. 8)
	正向引物 CpG- 特异性 2213-CpG-fwd	CCTTAAATCTAACCTTAAACTTCCGA (SEQ ID No. 9)
	反向引物 CpG- 特异性 2213-CpG-rev	GTGGAGGAAAAGTTAATGCGTC (SEQ ID No. 10)
	探针 CpG-特异 性 2213-CpG-pro	CAAACCCCTACCCCGAAAACGACGC (SEQ ID No. 11)

[0069] 如图2所示,使用测试模板(质粒-DNA)证明了TpG-特异性PCR-系统的特异性。发现细胞类型特异性(如通过qPCR测量)如下:

细胞类型	描述	GAPDH-拷贝	TpG-拷贝	去甲基化 (%)
[0070]	粒细胞	CD15+	15433.3	60.9
	单核细胞	CD14+	3370.0	4.4
	单核细胞 (II)	CD14+	4406.7	10.9
	Nc 单核细胞	CD14-CD16+	3510.0	2880.0
	Nc 单核细胞 (II)	CD14-CD16+	3110.0	2360.0
	c 单核细胞	CD14+	4216.7	7.1
	c 单核细胞 (II)	CD14+	4000.0	5.3
	T 辅助细胞	CD3+CD4+	3893.3	10.3
	细胞毒性 T 细胞	CD3+CD8+	1920.0	3.2
	NK 细胞	CD56+	3306.7	5.7
	B 细胞	CD19+	3203.3	12.4

序列表

<110> 艾皮恩蒂斯有限公司 (Epiontis GmbH)
<120> 作为用于鉴定免疫细胞尤其是非典型单核细胞的表观遗传标记的扩增子区
<130> E31869W0
<150> DE 10 2017 125 335.1
<151> 2017-10-27
<160> 11
<170> PatentIn 3.5版
<210> 1
<211> 271
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 1
cccttcctct gactcagtgg aagggcagga gagtgccccc aggagctgcc cacatccctg 60
gctgagtgcc tcaccccccag ggcctccacg aggagcagct tccacagggt gcctgtgggg 120
ctcgttcctc tggatgcttt tcccttgct gtgaatgcct ctggggcacg aatatatggc 180
ccttgggtct aggccttagg gcttccggtg accaggatag gaagtgttgc aggccctgcc 240
ccgagggcgg cgcattagct tttcccccac t 271
<210> 2
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 2
cccttcctct aactcaataa aaaaacaaaa aaatacccca aaaaactacc cacatcccta 60
actaaataacc tcacccccaa aacctccaca aaaaacaact tccacaaaaat acctataaaa 120
ctcattcctc taaatacttt tcccttact ataaataacct ctaaaacaca aatatataac 180
ccttaaatct aaaccttaaa acttccaata accaaaataa aaaatattac aaaccctacc 240
ccaaaaacaa cacattaact tttcccccac tactttcatc taccatctc accaaattcc 300
<210> 3
<211> 300
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 3
cccttcctct aactcaataa aaaaacaaaa aaataccccc aaaaactacc cacatcccta 60
actaaataacc tcacccccaa aacctccacg aaaaacaact tccacaaaaat acctataaaa 120
ctcggttcctc taaatacttt tcccttact ataaataacct ctaaaacacg aatatataac 180
ccttaaatct aaaccttaaa acttccgata accaaaataa aaaatattac aaaccctacc 240
ccgaaaacga cgcattaaact tttcccccac tactttcatc taccatctc accaaattcc 300

<210> 4
<211> 22
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 4
cccttcctct aactcaataa aa 22
<210> 5
<211> 19
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 5
agtggggaa aagttaatg 19
<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 6
cccttaaattc taaaccttaa aacttccaa 29
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 7
tagtggggaa aaagttaatg tgtt 24
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 8
acaaacccta ccccaaaaac aacac 25
<210> 9
<211> 28
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 9
ccttaaatct aaaccttaaa acttccga 28
<210> 10
<211> 22
<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 10
gtggaggaaa agttaatgcg tc 22
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 智人 (Homo sapiens)
<400> 11
caaaccctac cccgaaaacg acgc 24

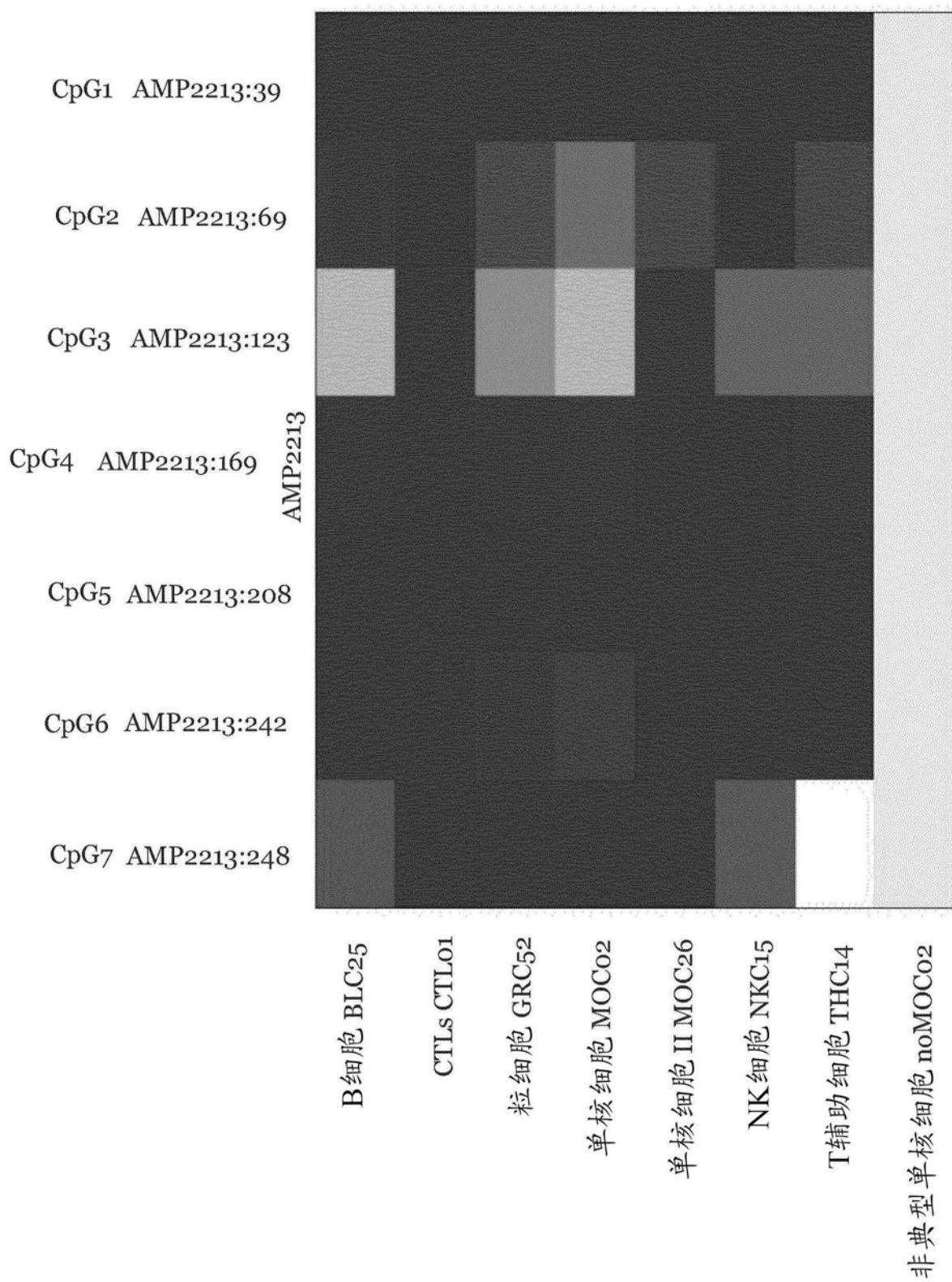


图1

		PM39 TpG 捷贝	%
Cp			
100	24.88	10106.67	100.00
25	26.87	2593.33	20.22
5	29.35	477	3.62
2	30.82	175	1.32
1	31.88	84.9	0.62
0	38.69	0.8	0.01

理论
[%]

图2a

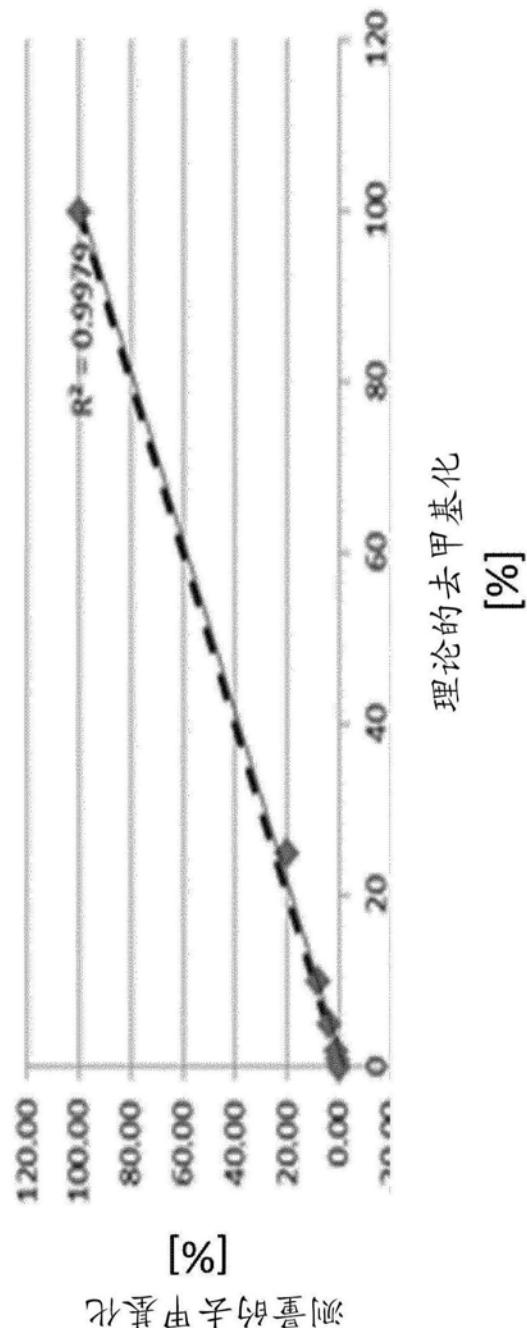


图2b