



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110945145 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201880032401.1

J.阿兹

(22)申请日 2018.05.16

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

(30)优先权数据

司 72001

62/507433 2017.05.17 US

代理人 初明明 黄登高

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.11.15

C12Q 1/6883(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 33/53(2006.01)

PCT/US2018/032888 2018.05.16

G01N 33/50(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/213392 EN 2018.11.22

(71)申请人 外来体诊断公司

地址 美国马萨诸塞州

申请人 布里格姆妇女医院

(72)发明人 J.赫利 C.科蒂基亚 R.基钦

V.塔蒂戈尔塔 J.K.O.斯科格

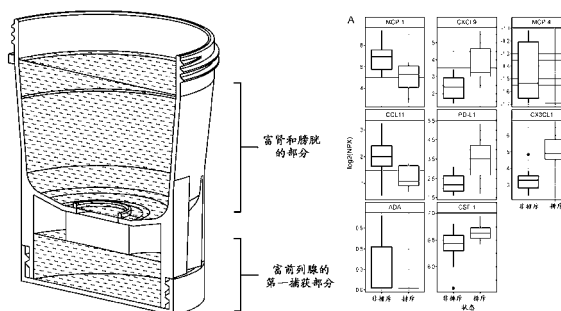
权利要求书3页 说明书20页 附图6页

(54)发明名称

微泡核酸和/或蛋白及其作为肾移植排斥的标志物的应用

(57)摘要

本发明一般涉及微泡生物标志物用于在患者中评估肾移植排斥的用途,所述生物标志物例如核酸(包括mRNA标记)和/或蛋白。本发明进一步涉及在已接受肾移植的患者中评估和/或监测肾移植排斥。本发明还涉及通过从改良的收集杯的上室采集尿样,或通过从标准杯采集30 ml,改进来自尿液外来体标志物的信号的方法。



1. 一种在患者中评估肾排斥的方法,该方法包括以下步骤:
 - a) 从患者的生物样品中分离微泡部分;
 - b) 从微泡部分提取多种生物标志物;
 - c) 从患者样品的多种生物标志物中确定至少一种生物标志物的表达水平;
 - d) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和
 - e) 测量至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。
2. 权利要求1的方法,其中多种生物标志物来自一个或多个已经历肾移植排斥的患者群/组,以及来自一个或多个患者群/组或未经历肾排斥的任何症状的患者群/组。
3. 权利要求1-2的任一项的方法,其中至少一种生物标志物包含RNA。
4. 权利要求1-3的任一项的方法,其中任选的标准化步骤d) 包括将至少一种生物标志物的表达水平与至少一种标准化基因或至少一种标准化蛋白进行比较。
5. 权利要求4的方法,其中至少一种生物标志物或至少一种标准化基因包含具有基因CXCL9、CXCL10和IL17RA的至少一种的基因标记。
6. 权利要求1-2或4的任一项的方法,其中至少一种生物标志物包含蛋白。
7. 权利要求4或6的任一项的方法,其中至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含至少一种选自表4的蛋白。
8. 权利要求4或6-7的任一项的方法,其中至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1的至少一种或其组合。
9. 权利要求1-8的任一项的方法,其中所述方法定期进行,以监测患者中肾排斥的进展。
10. 权利要求1-8的任一项的方法,其中该方法为患者提供了预后因子。
11. 权利要求1-8的任一项的方法,其中所述患者正经历肾脏疾病的疗法。
12. 权利要求1-11的任一项的方法,其中该方法包括选择用于肾排斥的疗法或监测用于肾排斥的疗法。
13. 权利要求1-12的任一项的方法,其中生物样品是尿液。
14. 权利要求1-14的任一项的方法,其中在从患者的生物样品中分离微泡的步骤后,该方法还包括(i) 处理微泡以排除脂质、细胞碎片、非相关微泡和其它污染物;(ii) 使用亲和色谱、捕获柱、免疫捕获、超速离心或纳米膜超滤浓缩器纯化微泡;和(iii) 洗涤微泡。
15. 权利要求1-14的任一项的方法,其还包括确定患者中肾排斥的类型。
16. 权利要求15的方法,其中肾排斥的类型是细胞排斥,包括边缘排斥,急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR),或细胞和AMR临床排斥,或其组合。
17. 权利要求1-16的任一项的方法,其中所述患者群/组或未经历肾排斥的任何症状的患者群/组没有细胞或抗体介导的排斥的临床适应症。
18. 权利要求1-17的任一项的方法,其中肾排斥是肾移植排斥。
19. 权利要求1-18的任一项的方法,其中所述方法还包括使用用于识别肾移植排斥的算法。
20. 权利要求19的方法,其中所述算法包括使用至少一种下列风险因素:
 - a) 女性;

- b) 年龄<50;
 - c) 非洲裔美国人;
 - d) 重复移植;
 - e) 当前群体反应性抗体 (PRA) >25% (一些研究显示>0%);
 - f) 人白细胞抗原 (HLA) 错配 (A、B和DR) 的数目:3-6个错配;
 - g) 死亡供体肾;
 - h) 延迟的移植物功能;
 - i) 供体特异性抗体的存在;
 - j) 无胸腺球蛋白诱导;或其组合。
21. 一种增加肾特异性生物标志物信号的方法,该方法包括以下步骤:
- a) 从改良的尿液收集杯的上室收集患者的生物样品,或在标准收集杯中收集至少约 30 ml;其中生物样品是尿液;
 - b) 从患者的生物样品中分离微泡部分,所述生物样品含有多种肾特异性生物标志物;和
 - c) 从微泡部分提取多种肾特异性生物标志物,从而增加肾特异性生物标志物信号。
22. 权利要求21的方法,其中该方法还包括以下步骤:
- d) 从患者样品的多种生物标志物中确定至少一种生物标志物的表达水平;
 - e) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和
 - f) 测量至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。
23. 权利要求21-22的任一项的方法,其中从改良的尿液收集杯的上室的所述收集增加肾特异性微泡的浓度。
24. 权利要求21-23的任一项的方法,其中标准收集杯是标准排尿杯。
25. 权利要求21-24的任一项的方法,其中至少一种生物标志物来自一个或多个已经历肾移植排斥的患者群/组以及来自一个或多个患者群/组或未经历肾排斥的任何症状的患者群/组。
26. 权利要求21-25的任一项的方法,其中至少一种生物标志物包含RNA。
27. 权利要求22-26的任一项的方法,其中任选的标准化步骤e) 包括将至少一种生物标志物的表达水平与至少一种标准化基因或至少一种标准化蛋白进行比较。
28. 权利要求27的方法,其中至少一种生物标志物或至少一种标准化基因包含具有基因CXCL9、CXCL10和IL17RA的至少一种的基因标记。
29. 权利要求21-25或27的任一项的方法,其中至少一种生物标志物包含蛋白。
30. 权利要求27或29的任一项的方法,其中至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含至少一种选自表4的蛋白生物标志物。
31. 权利要求27或29-30的任一项的方法,其中至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1的至少一种或其组合。
32. 权利要求21-31的任一项的方法,其中在从患者的生物样品中分离微泡的步骤后,该方法还包括 (i) 处理微泡以排除脂质、细胞碎片、非相关微泡和其它污染物;(ii) 使用亲和色谱、捕获柱、免疫捕获、超速离心或纳米膜超滤浓缩器纯化微泡;和 (iii) 洗涤微泡。

33. 权利要求22-32的任一项的方法,其中肾排斥是肾移植排斥。

微泡核酸和/或蛋白及其作为肾移植排斥的标志物的应用

[0001] 相关申请

本申请要求2017年5月17日提交的美国临时申请号62/507,433的权益,其内容通过引用以其整体结合到本文中。

发明领域

[0002] 本发明一般涉及微泡生物标志物用于在患者中评估肾移植排斥的用途,所述生物标志物例如核酸(包括核酸标记)和/或蛋白。本发明还涉及在已接受肾移植的患者中评估和/或监测肾移植排斥。

[0003] 背景

对细胞中发生的遗传和表观遗传变化的日益增加的了解,为通过分析疾病特异性核酸和蛋白序列和特征来检测、表征和监测疾病和病症提供了机会。这些变化可以通过检测各种疾病相关的生物标志物的任何一种来观察。各种分子诊断分析被用来检测这些生物标志物并为患者、医生、临床医生和研究人员提供有价值的信息。

[0004] 使用体液样品进行这些测试的能力在患者福利、进行纵向疾病监测的能力、和甚至在组织细胞不易获得的情况下获得表达特征的能力方面,具有广泛的意义。

[0005] 因此,需要检测生物标志物,例如微泡中的生物标志物的新的、非侵入性的方法,以帮助对于疾病或其它医学病症的表征、诊断、监测或疗法选择。

[0006] 发明简述

在一个方面,本发明涉及一种用于在患者中评估肾排斥的方法,该方法包括以下步骤:

- a) 从患者的生物样品中分离微泡部分;
- b) 从微泡部分中提取多种生物标志物;
- c) 从患者样品的多种生物标志物中确定至少一种生物标志物的表达水平;
- d) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和
- e) 测量至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。

[0007] 在一个优选的实施方案中,肾排斥是肾移植排斥。

[0008] 在一些实施方案中,本文公开的任何一种方法所识别的多种生物标志物包括RNA,而在其它实施方案中,多种生物标志物包括蛋白。在一些实施方案中,多种生物标志物包括RNA和蛋白的组合。

[0009] 在一个实施方案中,本文的受试者是已接受肾移植的患者。在一些实施方案中,评估受试者中的肾排斥为患者提供了预后因子。

[0010] 在一个相关的方面,本发明涉及使用微泡RNA标记来评估、分析、确定、测量、表征、识别或诊断受试者中的肾移植排斥的方法,其中在一些实施方案中,受试者是成人。在其它实施方案中,受试者是儿童。在一些实施方案中,所述方法用来纵向监测治疗功效。

[0011] 本文提供的方法和组合物可用于测量从微泡获得的核酸,例如微泡RNA(本文也称为外来体RNA或外来体的RNA),以及从微泡获得的蛋白(如微泡或外来体蛋白),作为移植排斥,例如肾移植排斥的诊断。

[0012] 传统上,生物标志物的发现和开发需要使用从组织活检中获得的材料。然而,微泡领域的最新进展使得生物流体中的生物标志物研究得以发展。外来体是高度稳定的微泡,直径约30-200 nm,其由细胞脱落到所有生物流体中,包括血液、尿液和脑脊液,携带完整蛋白和RNA的丰富来源。外来体和其它囊泡可以通过多囊体途径释放,或者通过在质膜上直接出芽释放。RNA可以通过诸如RT-qPCR和NGS的技术有效地分离和处理(参见例如,Brock, G. et al. (2015) Liquid biopsy for cancer screening, patient stratification and monitoring. *Translational Cancer Research*, 4(3), 280-290;和Enderle, D. et al. (2015) Characterization of RNA from Exosomes and Other Extracellular Vesicles Isolated by a Novel Spin Column-Based Method. *PLoS ONE*, 10(8): e0136133. doi: 10.1371/journal.pone.0136133)。

[0013] 在一些实施方案中,本文描述的方法和试剂盒通过将微泡捕获到表面,然后将微泡溶解以释放其中包含的核酸(特别是RNA)或蛋白来分离微泡部分。本文提供的方法和试剂盒使用任何合适的技术分离微泡部分。在一些实施方案中,使用PCT公布号WO 2014/107571和PCT公布号WO 2016/007755中描述的方法和捕获表面分离微泡,其各自的内容通过引用以其整体结合到本文中。在一些实施方案中,使用PCT公布号WO 2015/021158中描述的方法和捕获表面从尿样分离微泡,其内容通过引用以其整体结合到本文中。在一些实施方案中,使用免疫捕获法从尿样分离微泡。在一些实施方案中,免疫捕获表面是柱。在一些实施方案中,免疫捕获表面是珠或任何其它固体表面。

[0014] 在一个方面,本发明涉及在生物样品中检测多种生物标志物的方法,以帮助对于移植排斥、例如肾移植排斥的诊断、监测或疗法选择。本文提供的方法和试剂盒可用于从患者的生物样品(例如尿样)的微泡部分检测多种生物标志物。

[0015] 在一个方面,任意的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与至少一种标准化基因或至少一种标准化蛋白进行比较。

[0016] 在另一个方面,生物标志物组包含基因标记。在另一个方面,至少一种生物标志物包含基因标记。在一些实施方案中,基因标记包含基因CXCL9、CXCL10和IL17RA中的至少一种。在一些实施方案中,至少一种生物标志物或至少一种标准化基因包含具有基因CXCL9、CXCL10和IL17RA的至少一种的基因标记。

[0017] 在另一个方面,多种生物标志物包含蛋白。在另一个实施方案中,生物标志物组包含蛋白标记。在一些实施方案中,蛋白包括多种蛋白形式,包括蛋白、蛋白单体、蛋白复合物和蛋白聚集体。在一些实施方案中,至少一种生物标志物或标准化蛋白包含至少一种选自表4的蛋白生物标志物。在其它实施方案中,至少一种生物标志物或至少一种标准化蛋白包含MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1的至少一种或其组合。

[0018] 在另一个方面,本文公开的方法定期进行,以监测患者中肾移植排斥的进展。在另一个实施方案中,患者正经历肾排斥疗法。

[0019] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括选择用于肾移植排斥的疗法,监测用于肾移植排斥的疗法,或优化正在进行的肾移植排斥疗法。

[0020] 现在将详细描述本发明的各个方面和实施方案。应该理解,在不背离本发明的范围的情况下,可以对细节进行修改。此外,除非上下文另有要求,单数术语应包括复数,和复

数术语应包括单数。

[0021] 除非另外定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本发明的实践或测试中可以使用与本文描述的方法和材料相似或等同的方法和材料,但是下面描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均通过引用以其整体结合到本文中。在有冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图是限制性的。

[0022] 所有确定的专利、专利申请和出版物通过引用明确结合到本文中,目的是描述和公开例如可结合本发明使用的此类出版物中所描述的方法。这些出版物仅为其在本申请提交日期之前的公开内容而提供。这方面不应被解释为承认发明人无权因在前发明或任何其它原因而提早这样的公开内容。所有有关这些文件的日期的声明或有关这些文件的内容的陈述均基于申请人可获得的信息,并且不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

[0023] 附图简述

当与附图相结合时,将从下面的详细描述中更清楚地了解上述和进一步的特征。

[0024] 图1说明了改良的尿液收集杯的图示(参见W02016/054252,其通过引用以其整体结合到本文中) - 这是一种尿液收集装置,用于产生分级尿样。所述杯最适合于第一次或中流的尿液收集。在第一次尿液捕获中发现的富前列腺细胞外囊泡(EV)被捕获在杯的底部,而含有来自肾和膀胱的EV的尿液被收集在杯的上室中。

[0025] 图2说明了收集并保存直至处理的尿样。用临床样品浓缩器滤膜提取外来体RNA。从浓缩的微泡提取外来体RNA,并通过实时PCR分析与炎症相关的转录物的表达。

[0026] 图3说明了使用exoRNA CXCL9和CXCL10作为训练(图3A)和验证(图3B)集的生物标志物,用于诊断肾排斥的接受者操作特征(ROC)曲线,其中IL17RA作为正规化子。

[0027] 图4说明了使用CXCL9和CXCL10的蛋白表达作为生物标志物,用于诊断急性排斥的接受者操作特征(ROC)曲线。使用CXCL9和CXCL10诊断急性排斥的真阳性结果的分数(灵敏性)和假阳性结果的分数(1-特异性)。

[0028] 图5说明了尿液外来体蛋白差异表达,并且能够识别肾排斥与非排斥的样品。图5显示了8种蛋白(来自92种检查的蛋白)的盒状图,它们在非排斥和排斥样品之间差异表达, $P = 0.05$, ANOVA。

[0029] 图6说明了尿液外来体蛋白MCP-1、MCP-4和CX3CL1准确识别具有肾排斥的个体和没有排斥的个体。图6显示了三种非常重要的外来体蛋白的盒状图,它们在非排斥和排斥样品之间差异表达, $P = 0.01$, ANOVA。

[0030] 发明详述

本公开内容提供了使用从微泡分离的核酸和蛋白生物标志物来评估肾排斥和/或监测肾排斥治疗功效的方法。在一些实施方案中,所述方法用于纵向监测治疗功效。

[0031] 在一些实施方案中,生物标志物在肾排斥与非排斥的患者中差异表达。

[0032] 在一个特定的实施方案中,提供了一种在患者中评价肾排斥的方法,该方法包括以下步骤:

a) 从患者的生物样品中分离微泡部分;

- b) 从微泡部分中提取多种生物标志物;
- c) 从患者样品的多种生物标志物中确定至少一种生物标志物的表达水平;
- d) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和
- e) 测量至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。

[0033] 在一个特定的实施方案中,提供了一种在患者中测定肾排斥的方法,该方法包括以下步骤:

- a) 从患者的生物样品中分离微泡部分;
- b) 从微泡部分中提取多种生物标志物;
- c) 从患者样品的多种生物标志物中测定至少一种生物标志物的表达水平;
- d) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和
- e) 测定至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。

[0034] 在另一个实施方案中,该方法包括测定、评估、确定、测量、表征、识别或诊断患者的肾排斥。在另一个实施方案中,肾排斥是肾移植排斥。

[0035] 在一个实施方案中,本文公开的任选标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与一组对照生物标志物的表达特征比较。在一个实施方案中,对照生物标志物组包括一种或多种标准化基因。在另一个实施方案中,对照生物标志物组包括一种或多种标准化蛋白。在另一个实施方案中,与表示具有肾排斥的患者的生物标志物的对照组的表达特征比较,至少一种生物标志物差异表达。在另一个实施方案中,与表示没有肾排斥的患者的生物标志物的对照组的表达特征比较,至少一种生物标志物差异表达。

[0036] 在一个实施方案中,任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与已知的生物标志物标记比较。在另一个实施方案中,任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与对照生物标志物标记比较。在另一个实施方案中,任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与对照生物标志物基因标记比较。在另一个实施方案中,任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与对照生物标志物蛋白标记比较。

[0037] 在一个实施方案中,任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与一种或多种标准化基因的表达特征比较。在另一个实施方案中,在本文中任选的标准化步骤包括将至少一种生物标志物的表达水平与对照生物标志物基因标记的表达特征比较。在一个实施方案中,基因标记包括基因CXCL9、CXCL10和IL17RA的至少一种。在一个实施方案中,标准化基因包括选自CXCL9、CXCL10、IL17RA或其组合的基因。

[0038] 在一个实施方案中,标准化步骤包括确定生物标志物的标准化相对表达水平,其中生物标志物的相对表达水平是生物标志物表达水平与参考基因表达水平之间的比率,其中当生物标志物的相对表达水平大于生物标志物表达的截止水平时,受试者被鉴定为患有肾排斥,或有导致排斥的肾脏医学病症。在一些实施方案中,生物标志物的相对表达水平低于生物标志物表达的截止水平。在一些实施方案中,肾脏医学病症包括肾脏或本领域已知的任何类型以及本文进一步公开的任何类型的肾移植排斥。

[0039] 在一个实施方案中,生物标志物表达的截止水平是评分,其基于在正罹患肾排斥或导致肾排斥的医学病症的对照组受试者中生物标志物表达的集体水平。在其它实施方案中,肾排斥是肾移植排斥。这样的评分可有助于鉴定患者为无排斥还是有排斥。

[0040] 在一些实施方案中,生物标志物表达的截止水平是评分,其基于在正罹患任何类型的肾排斥(包括但不限于细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR临床排斥,或其组合)的对照组受试者中生物标志物表达的集体水平。

[0041] 在其它实施方案中,生物标志物表达的截止水平是评分,其基于在未罹患肾排斥的对照组受试者中生物标志物表达的集体水平。这样的评分可以帮助确定或表征患者为患有肾排斥。因此,当使用本文公开的方法时,技术人员能够表征患者为患有或没有肾排斥。

[0042] 在一些实施方案中,生物标志物表达的截止水平是评分,其基于在未罹患肾移植排斥的对照组受试者中生物标志物表达的集体水平。

[0043] 在一些实施方案中,生物标志物表达的截止水平是评分,其基于在未罹患任何类型的肾排斥(包括但不限于细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR临床排斥,或其组合)的对照组受试者中生物标志物表达的集体水平。

[0044] 在一个实施方案中,多种生物标志物包含至少一种RNA。在一些实施方案中,本文提供的方法和组合物可用于测量从微泡获得的核酸,例如微泡RNA,在本文也称为外来体RNA或外来体的RNA,作为移植排斥、例如肾移植排斥的诊断。

[0045] 微泡由真核细胞脱落到细胞外部,或出芽离开质膜到细胞外部。这些膜囊泡大小不均匀,直径范围从约10 nm到约5000 nm。由细胞脱落的直径 $< 0.8\mu\text{m}$ 的所有膜囊泡在本文统称为“细胞外囊泡”或“微泡”。这些细胞外囊泡包括微泡、外来体、微泡-样颗粒、前列腺小体、dexasome、texosome、核外粒体、癌小体、凋亡小体、逆转录病毒样颗粒和人内源性逆转录病毒(HERV)颗粒。由胞内多囊体的胞吐作用释放的小微泡(直径约10-1000nm,且更常见30-200 nm)在本领域被称为“微泡”。

[0046] 在一些实施方案中,术语“外来体”、“微泡”和细胞外囊泡(EV)在本文可互换使用。在一些实施方案中,本文公开的方法包括从患者的生物样品中分离微泡部分。

[0047] 在一个实施方案中,对照生物标志物组包含至少一种RNA。在另一个实施方案中,对照生物标志物组包含基因标记。

[0048] 在一个实施方案中,当多种生物标志物包含RNA时,本文步骤d)中的方法包括将来自多种生物标志物的至少一种RNA生物标志物的表达水平与已知的或对照组的RNA生物标志物比较。

[0049] 在另一个实施方案中,一种或多种已知的或对照RNA生物标志物包含CXCL9、CXCL10、IL17RA或其组合。在另一个实施方案中,一种或多种已知的或对照RNA生物标志物选自自由CXCL9、CXCL10和IL17RA组成的列表。在另一个实施方案中,至少一种标准化基因包含CXCL9、CXCL10、IL17RA或其组合。在另一个实施方案中,至少一种标准化基因选自自由CXCL9、CXCL10和IL17RA组成的列表。

[0050] 在一个实施方案中,至少一种生物标志物或至少一种标准化基因包含具有基因CXCL9、CXCL10和IL17RA的至少一种的基因标记。

[0051] 正如技术人员所理解的,术语“核酸”指DNA和RNA。核酸可以是单链或双链的。在某些情况下,核酸是DNA。在某些情况下,核酸是RNA。RNA包括但不限于信使RNA、转移RNA、核糖体RNA、非编码RNA、微RNA和HERV元件。在本文公开的任何方法中,核酸是DNA或RNA。RNA的例

子包括信使RNA、转移RNA、核糖体RNA、小RNA（非-蛋白-编码RNA、非-信使RNA）、微RNA、piRNA、exRNA、snRNA和snoRNA。在一些实施方案中，RNA是miRNA。

[0052] 在上述任何一种方法中，核酸从微泡部分中分离，或者以其它方式来源于微泡部分。在一些实施方案中，核酸是从微泡部分中分离或者以其它方式来源于微泡部分的RNA或DNA或RNA和DNA。在一些实施方案中，核酸是从微泡部分中分离或者以其它方式来源于微泡部分的RNA。

[0053] 在本文公开的任何方法中，核酸是无细胞核酸，在本文也称为循环核酸。在一些实施方案中，无细胞核酸是DNA或RNA。在一些实施方案中，无细胞核酸是无细胞DNA。在一些实施方案中，无细胞核酸是DNA和RNA。

[0054] 在一个实施方案中，多种生物标志物包含至少一种蛋白。

[0055] 在另一个实施方案中，对照生物标志物组包含至少一种蛋白生物标志物。在另一个实施方案中，对照生物标志物组包含蛋白标记。在另一个实施方案中，当多种生物标志物包含蛋白时，任选的标准化步骤包括将来自多种生物标志物的至少一种蛋白生物标志物的表达水平与已知的或对照组的蛋白生物标志物比较。在另一个实施方案中，当多种生物标志物包含蛋白时，任选的标准化步骤包括将来自多种生物标志物的至少一种蛋白生物标志物的表达水平与至少一种标准化蛋白比较。在另一个实施方案中，当多种生物标志物包含蛋白时，步骤d)中的方法包括将来自多种生物标志物的至少一种蛋白生物标志物的表达水平与至少一种来自表4的蛋白生物标志物比较。在另一个实施方案中，当多种生物标志物包含蛋白时，标准化步骤包括将来自多种生物标志物的至少一种蛋白生物标志物的表达水平与选自以下的至少一种蛋白生物标志物比较：MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1或其组合。在另一个实施方案中，至少一种标准化蛋白选自表4。

[0056] 在一个实施方案中，对照蛋白标记选自表4。在另一个实施方案中，一种或多种已知的或对照蛋白生物标志物选自表4。在另一个实施方案中，一种或多种已知的或对照蛋白生物标志物包含MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8、CSF-1或其组合。在另一个实施方案中，一种或多种已知的或对照蛋白生物标志物选自MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1组成的列表。在另一个实施方案中，至少一种标准化蛋白选自以下：MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1或其组合。

[0057] 在一个实施方案中，至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含选自表4的至少一种蛋白。在另一个实施方案中，至少一种生物标志物和/或至少一种标准化蛋白包含MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CXCL10、CCL11、PD-L1、ADA、IL-8和CSF-1的至少一种或其组合。

[0058] 在一个实施方案中，从患者的样品分离的生物标志物组来自一个或多个已经历肾移植排斥的患者群/组以及来自一个或多个患者群/组或未经历肾排斥的任何症状的患者群/组。在一些实施方案中，患者群/组或未经历肾排斥的任何症状的患者群/组没有细胞或抗体介导的排斥的临床适应症。在一个实施方案中，本文公开的方法还包括使用用于识别肾移植排斥的算法。在另一个实施方案中，该算法包括使用至少一种下列风险因素：a) 女性；b) 年龄<50；c) 非洲裔美国人；d) 重复移植；e) 当前群体反应性抗体(PRA) >25%（一些研究显示>0%）：它测量HLA抗体的存在；f) 人白细胞抗原(HLA)错配(A、B和DR)的数目：3-

6个错配;g) 死亡肾脏;h) 延迟的移植物功能;i) 供体特异性抗体的存在;j) 无胸腺球蛋白诱导;或其组合。

[0059] 在一个实施方案中,本文公开的方法包括确定患者中肾排斥的类型。在另一个实施方案中,肾排斥是肾移植排斥。在另一个实施方案中,肾排斥的类型是细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR临床排斥,或其组合。在另一个实施方案中,本文公开的肾移植排斥的类型包括细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR临床排斥,或其组合。

[0060] 在一个实施方案中,来自肾移植排斥患者的尿样的标准包括细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR。

[0061] 在一个实施方案中,从患有肾排斥或非排斥的患者获得生物样品。在一些实施方案中,微泡部分从患者的生物样品中分离。如本文所用的,术语“生物样品”指含有生物材料例如DNA、RNA和蛋白的样品。

[0062] 在一些实施方案中,生物样品可以适当地包括来自受试者的体液。体液可以从受试者身体的任何地方(例如外周部位)分离的流体,包括但不限于,例如血液、血浆、血清、尿液、痰、脊髓液、脑脊液、胸膜液、乳头抽吸液、淋巴液;呼吸道、肠道和泌尿生殖道的流体;泪液、唾液、乳汁、来自淋巴系统的流体、精液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊液、羊水和细胞培养上清液,及其组合。生物样品还可包括粪便或盲肠样品,或从中分离的上清液。

[0063] 在一些实施方案中,生物样品可以适当地包括来自受试者的组织样品。组织样品可以从受试者身体的任何地方分离。

[0064] 体液的合适的样品体积是例如在约0.1 ml-约30 ml流体的范围内。流体体积可取决于几个因素,例如所用流体的类型。例如,血清样品的体积可以是约0.1 ml-约4 ml,优选约0.2 ml-4 ml。血浆样品的体积可以是约0.1ml-约4 ml,优选0.5 ml-4ml。尿样的体积可以是约10 ml-约30 ml,优选约20 ml。

[0065] 当本文提供的例子使用血浆样品时,技术人员应该意识到,这些方法适用于各种生物样品。其它合适的生物样品包括尿液、脑脊液、血液(包括血液组分,如血浆和血清)、痰、胸膜液、乳头抽吸液、淋巴液;呼吸道、肠道和泌尿生殖道的流体;泪液、唾液、乳汁、来自淋巴系统的流体、精液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊液、羊水、细胞培养上清液及其组合。

[0066] 本公开内容的方法和试剂盒还适用于源自人受试者的样品。本公开内容的方法和试剂盒适用于源自非-人受试者,例如啮齿动物、非-人灵长类动物、伴侣动物(例如,猫、狗、马)和/或农场动物(例如,鸡)的样品。

[0067] 术语“受试者”旨在包括被证明或预期具有含核酸的细胞外囊泡的人和动物。该术语还包括被证明或预期具有含蛋白的细胞外囊泡的人和动物。在特定的实施方案中,受试者是哺乳动物、人或非人灵长类动物、狗、猫、马、牛、其它农场动物或啮齿动物(例如小鼠、大鼠、豚鼠等)。人受试者可以是没有明显异常(例如疾病)的正常人。人受试者可以有明显异常(例如疾病)的人。人受试者可以是成人或儿童。明显异常可以由本人或由医护专业人员观察到。术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文可以互换使用。

[0068] 在另一个实施方案中,评估患者为患有肾排斥的方法还包括监测用于肾排斥的疗法。在一个实施方案中,本文提供的方法在初步评估后定期进行,以监测接受肾排斥疗法的患者中肾排斥的进展。

[0069] 在一些实施方案中,该方法每天、每周、每两周、每三周、每月、每2个月、每2-12个月、每年或每2-5年执行。在其它实施方案中,本文公开的方法可以在已接受肾移植的患者中在肾排斥发作之后根据需要执行。在其它实施方案中,本文公开的方法可在肾衰竭后的患者中在肾排斥发作之后根据需要执行。

[0070] 在一个实施方案中,评估患者为患有肾排斥的方法还包括选择用于肾排斥的疗法。在一个实施方案中,评估患者为患有肾排斥的方法还包括为患有肾排斥的患者选择最佳疗法,其中在一些实施方案中,技术人员将比较本领域中可用的几种疗法,以确定对于需要疗法的特定患者的最佳疗法。

[0071] 在一个实施方案中,肾排斥疗法可包括本领域中可用的任何类型的疗法,包括根据现行的肾移植标准指南(PMDID: PMC5455080)的免疫抑制疗法。目前诊断肾移植排斥的标准指南包括肾脏的核心针刺活检,然后由病理学家对组织样品进行免疫组织化学和组织学分析。

[0072] 在一些实施方案中,对于经历肾排斥疗法的患者,本文公开的方法允许选择肾排斥疗法,以防止或减少患者中肾排斥的进展。

[0073] 在一些实施方案中,通过使用本文公开的方法,给予有需要的患者的肾排斥或肾脏疾病疗法的优化还包括进行任何必要的疗法调整,如由临床医生决定的,以改进肾排斥疗法的功效。这些调整可包括(但不限于)药物或药物合剂调整、药物制剂调整、药物剂量调整、药物剂量给予时间表调整、使用额外药物(例如控制感染、治疗高血压等)或其任何组合,包括本领域可用的任何其它治疗方式。

[0074] 在一些实施方案中,可收集生物样品(例如,尿样和/或等等)进行分析,例如,以确定一个人的健康和/或等等。在一些实施方案中,改良的样品收集杯(见图1)可配置为将样品的部分与样品的其它部分分开(例如,样品的第一体积和/或等等可与样品的其它部分分开),以获得最佳结果。在一些实施方案中,容器的部分可以用多种方式密封,以防止泄漏或溢出(例如在运输和/或等等期间),并防止样品部分的稀释。该样品收集杯的例子描述于WO 2016/054252中,其通过引用以其整体结合到本文中。

[0075] 例如,改良的样品收集容器可以通过底-盖设计、两-杯设计和/或等等形成。参照WO 2016/054252的图1,在一些实施方案中,实验室可以使用底-盖设计102作为样品收集容器。在一些实施方案中,容器可包含双密封顶盖104、单模制收集杯106、漂浮装置108和螺旋式底盖110。在一些实施方案中,收集容器还可以具有标签空间112,在标签上可以印有样品识别信息(例如,患者的姓名、获取样品的日期和时间、获取的样品的类型和/或等等)。

[0076] 在一些实施方案中,标准尿液收集杯被用来收集尿液等,其中在一些实施方案中,这种标准杯被用来收集至少30 ml的患者尿样。

[0077] 本公开内容的方法使用来自受试者的至少30 ml的第二次捕获尿样,例如,其中在25-40 mL之间的第一次捕获尿液的样品被丢弃。

[0078] 在一个优选的实施方案中,尿样是从膀胱第一次排泄后的尿液,其被称为“第二次捕获”尿液。第二次或第一次排泄后的尿液含有最高浓度的源自肾的微泡,因此对第二次或后来排泄的尿液的分析提供了来自肾生物标志物的更高信号。

[0079] 在一个实施方案中,一种增加肾特异性生物标志物信号的方法包括以下步骤:a)从改良的尿液杯(见图1)的上室收集患者的生物样品或在标准收集杯中收集至少约30 ml;

其中生物样品是尿液;b) 从患者的含有多肾特异性生物标志物的生物样品中分离微泡部分;和 c) 从微泡部分提取多种肾特异性生物标志物,从而增加肾特异性生物标志物信号。

[0080] 在另一个实施方案中,增加肾特异性生物标志物信号的方法还包括以下步骤:d) 从患者样品的多种生物标志物中确定至少一种生物标志物的表达水平;e) 任选地使至少一种生物标志物的表达水平标准化;和f) 测量至少一种生物标志物的表达水平,以确定患者正在经受肾排斥还是非排斥。

[0081] 在另一个实施方案中,从改良的杯的上室的收集或在标准尿液收集杯中收集至少约30 ml的尿液增加肾特异性微泡的浓度。在另一个实施方案中,至少约30-40 ml、41-50 ml、51-60 ml或61-70 ml尿液被收集在标准尿液收集杯或等价物中。

[0082] 在实施方案中,微泡分离方法使用捕获表面。在一些实施方案中,捕获表面是膜,从生物样品分离微泡部分的装置包含至少1个膜。在一些实施方案中,装置包含1、2、3、4、5或6个膜。在一些实施方案中,装置包含3个膜。在其中装置包含一个以上的膜的实施方案中,膜都在柱的一端彼此直接相邻。在其中装置包含一个以上的膜的实施方案中,膜都是彼此相同的,即具有相同的电荷和/或具有相同的官能团。

[0083] 应该注意到,通过比微泡更小的孔径过滤来捕获微泡并不是本文提供的方法的主要捕获机制。然而,滤器孔径仍然是非常重要的,例如因为mRNA卡在20 nm的滤器上,无法被回收,而微RNA可很容易被洗掉,例如因为滤器孔径是可利用的表面捕获区域中的重要参数。

[0084] 本文提供的方法使用各种捕获表面中的任何一种。在一些实施方案中,捕获表面是膜,在本文也称为滤器或膜滤器。在一些实施方案中,捕获表面是市售可得的膜。在一些实施方案中,捕获表面是带电荷的市售可得的膜。在一些实施方案中,捕获表面是中性的。在一些实施方案中,捕获表面选自PALL Corporation的Mustang® 离子交换膜;Sartorius AG的Vivapure® Q膜;Sartobind Q或Vivapure® Q Maxi H;Sartorius AG的Sartobind® D;Sartorius AG的Sartobind (S);Sartorius AG的Sartobind® Q;Sartorius AG的Sartobind® IDA;Sartorius AG的Sartobind® Aldehyde;Sigma的Whatman® DE81;EMD Millipore的快速捕获病毒纯化柱;Thermo Scientific* Pierce强阳离子和阴离子交换旋转柱。

[0085] 在一个实施方案中,当膜被用作捕获表面时,应该理解捕获表面的格式,例如珠或滤器(本文也称为膜),不影响本文提供的方法从生物样品有效捕获微泡的能力。

[0086] 根据本文提供的方法,广泛的表面能够捕获微泡,但并不是所有的表面都能捕获微泡(有些表面不捕获任何东西)。

[0087] 在一些实施方案中,捕获表面是带正电荷的。在另一个实施方案中,捕获表面是带负电荷的。在又一个实施方案中,捕获表面是中性的。在一些实施方案中,捕获表面用抗体、肽、表位或配体修饰,用于免疫捕获法。

[0088] 在捕获表面带电荷的实施方案中,捕获表面可以是带电荷滤器,其选自0.65 μ m带正电荷的Q PES真空过滤器(Millipore)、3-5 μ m带正电荷的Q RC旋转柱过滤器(Sartorius)、0.8 μ m带正电荷的Q PES自制旋转柱过滤器(Pall)、0.8 μ m带正电荷的Q PES注射器过滤器(Pall)、0.8 μ m带负电荷的S PES自制旋转柱过滤器(Pall)、0.8 μ m带负电荷的S

PES注射器过滤器(Pall)和50 nm带负电荷的尼龙注射器过滤器(Sterlitech)。优选地,带电荷过滤器不安装在注射器过滤装置中,因为在这些实施方案中,Qiazol/RNA较难从过滤器中取出。优选地,带电荷过滤器安装于柱的一端。

[0089] 在捕获表面为膜的实施方案中,膜可以由各种合适的材料制成。在一些实施方案中,膜是聚醚砜(PES)(例如,来自Millipore或PALL Corp.)。在一些实施方案中,膜是再生纤维素(RC)(例如,来自Sartorius或Pierce)。

[0090] 在一些实施方案中,捕获表面是带正电荷的膜。在一些实施方案中,捕获表面是Q膜,它是带正电荷的膜,并且是含有季胺的阴离子交换器。例如,Q膜被季铵 $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$ 官能化。在一些实施方案中,捕获表面是带负电荷的膜。在一些实施方案中,捕获表面是S膜,它是带负电荷的膜,并且是含有磺酸基的阳离子交换器。例如,S膜被磺酸 $R-CH_2-SO_3^-$ 官能化。在一些实施方案中,捕获表面是D膜,它是弱碱性阴离子交换器,含有二乙胺基 $R-CH_2-NH^+(C_2H_5)_2$ 。在一些实施方案中,捕获表面是金属螯合膜。例如,该膜是用氨基二乙酸 $-N(CH_2COOH)_2$ 官能化的IDA膜。在一些实施方案中,捕获表面是用醛基 $-CHO$ 官能化的微孔膜。在其它实施方案中,该膜是弱碱性阴离子交换器,含有二乙基氨基乙基(DEAE)纤维素。并不是所有带电荷的膜都适用于本文提供的方法,例如,使用Sartorius Vivapure S膜旋转柱分离的RNA显示出RT-qPCR抑制作用,因此不适合于PCR相关的下游测定。

[0091] 在捕获表面带电荷的实施方案中,微泡可以用带正电荷的过滤器分离。

[0092] 在捕获表面带电荷的实施方案中,微泡捕获期间的pH是 $pH \leq 7$ 。在一些实施方案中,pH大于4并且小于或等于8。

[0093] 根据膜材料,膜的孔径范围为3 μm -20 nm。

[0094] 在一些实施方案中,捕获表面是膜。捕获表面的表面电荷可以是正电荷、负电荷或中性的。在一些实施方案中,捕获表面是一个或多个带正电荷的珠。例如,珠是磁性的。或者,珠是非-磁性的。在又一个实施方案中,珠被亲和配体、抗体或捕获寡核苷酸功能化。

[0095] 本文提供的方法包括裂解试剂。在一些实施方案中,用于膜上裂解的试剂是基于酚的试剂。在一些实施方案中,裂解试剂是基于胍鎓的试剂。在一些实施方案中,裂解试剂是基于高盐的缓冲液。在一些实施方案中,裂解试剂是QIAzol。

[0096] 在一些实施方案中,方法包括一个或多个洗涤步骤,例如,在将生物样品与捕获表面接触之后。在一些实施方案中,洗涤剂被添加到洗涤缓冲液中,以便于去除非特异性结合(即污染物、细胞碎片和循环蛋白复合物或核酸),以获得更纯净的微泡部分。适合使用的洗涤剂包括但不限于:十二烷基硫酸钠(SDS)、吐温-20、吐温-80、Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40)、Brij-35、Brij-58、辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、CHAPS或CHAPSO。

[0097] 在一些实施方案中,捕获表面,例如膜,被置于用于离心的装置中,例如,旋转柱;或用于真空系统的装置中,例如真空过滤器夹具;或用于压力过滤的装置中,例如注射器过滤器。在一个优选的实施方案中,捕获表面被置于旋转柱或真空系统中。

[0098] 提取核酸前从生物样品中分离微泡因为以下原因而具有优势:1) 从微泡提取核酸提供了选择性地分析通过分离流体样品内的疾病或肿瘤特异性微泡与其它微泡所获得的疾病或肿瘤特异性核酸的机会;2) 与通过直接从流体样品中提取核酸而不首先分离微泡获得的产率/完整性相比,含有核酸的微泡以更高完整性产生显著更高产率的核酸种类;3) 可扩展性,例如,为了检测低水平表达的核酸,可以使用本文所述的方法从较大体积的

样品中浓缩微泡来提高灵敏度;4) 提取的核酸纯度更高或质量/完整性更高,因为在核酸提取步骤之前排除了生物样品中天然存在的蛋白、脂质、细胞碎片、细胞和其它潜在污染物以及PCR抑制剂;和5) 在核酸提取方法上有更多的选择可以采用,因为分离的微泡部分的体积可小于起始样品的体积,这使得使用小体积柱滤器从这些部分或颗粒中提取核酸成为可能。提取蛋白前从生物样品中分离微泡因为以下原因而具有优势:1) 从微泡提取蛋白提供了选择性地分析通过分离流体样品中的疾病或肿瘤特异性微泡与其它微泡所获得的疾病或组织-特异性蛋白的机会;2) 与通过直接从流体样品中提取蛋白而不首先分离微泡获得的产率/完整性相比,含有蛋白的微泡以更高纯度产生组织-特异性蛋白;3) 可扩展性,例如,为了检测低水平表达的蛋白,可以使用本文所述的方法从较大体积的样品中浓缩微泡来提高灵敏度;4) 蛋白的纯度更高或质量/完整性更高,因为在蛋白提取步骤之前排除了生物样品中天然存在的非-相关蛋白、脂质、细胞碎片、细胞和其它潜在污染物以及抑制剂;和5) 在蛋白纯化/分离方法上有更多的选择可以采用,因为分离的微泡部分的体积可小于起始样品的体积,这使得使用小体积柱滤器从这些部分或颗粒中提取蛋白成为可能。

[0099] 本领域已描述了从生物样品中分离微泡的几种方法。例如,Raposo等的论文(Raposo et al., 1996),Skog等的论文(Skog et al., 2008)和Nilsson等的论文(Nilsson et al., 2009)描述了差速离心的方法。美国专利号6,899,863和6,812,023描述了离子交换和/或凝胶渗透色谱的方法。美国专利号7,198,923描述了蔗糖密度梯度或细胞器电泳方法。Taylor和Gercel Taylor的论文(Taylor and Gercel-Taylor, 2008)描述了磁激活细胞分选(MACS)的方法。Cheruvanky等的论文(Cheruvanky et al., 2007)描述了纳米膜超滤浓缩的方法。Miranda等的出版物(Miranda et al., 2010)描述了Percoll梯度分离方法。此外,微泡可以通过微流装置从受试者的体液中识别和分离(Chen et al., 2010)。在核酸生物标志物的研究和开发以及商业应用中,需要以一致、可靠和实用的方式从生物样品中提取高质量的核酸。在一些实施方案中,在微泡的分离步骤之前或之后,该方法还包括(i) 处理微泡以排除脂类、细胞碎片、来自非疾病组织的不相关微泡和其它污染物;(ii) 使用超速离心或纳米膜超滤浓缩器纯化微泡;和(iii) 洗涤微泡。

[0100] 在一些实施方案中,在从生物样品分离和提取核酸(例如DNA和/或DNA和RNA)或蛋白之前,不对样品进行预处理。

[0101] 在一些实施方案中,在对微泡进行分离、纯化或富集之前,对样品进行预处理步骤,以去除生物样品中存在的大的不需要的颗粒、细胞和/或细胞碎片、不相关的非疾病微泡和其它污染物。预处理步骤可以通过一个或多个离心步骤(例如,差速离心)或一个或多个过滤步骤(例如,超滤)或其组合来实现。在分离、纯化微泡之前或之后,处理步骤可通过免疫-捕获特定微泡来实现。在进行超过一个离心预处理步骤的情况下,生物样品可首先以较低的速度离心,然后以较高的速度离心。如有需要,可进一步进行适当的离心预处理步骤。或者,或除了一个或多个离心预处理步骤之外,生物样品还可以被过滤。例如,生物样品可首先以20,000g离心1小时,以去除大的不需要的颗粒;然后可过滤样品,例如,通过0.8 μ m滤器过滤。

[0102] 在一些实施方案中,样品被预过滤以去除大于0.8 μ m的颗粒。在一些实施方案中,样品包含添加剂例如EDTA、柠檬酸钠和/或柠檬酸盐-磷酸盐-葡萄糖。在一些实施方案中,样品被预清除不相关的微泡,或预富集相关的微泡。

[0103] 在一些实施方案中,在将生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个离心步骤,以分离微泡并浓缩从生物部分中分离的微泡。例如,样品在4℃下以20,000g离心1小时。为去除大的不需要的颗粒、细胞和/或细胞碎片,样品可以以约100-500g,优选约250-300g的低速离心。作为选择或另外地,可以更高的速度离心样品。适宜的离心速度可达约200,000g;例如,从约2,000g至低于约200,000g。约15,000g以上和小于约200,000g,或约15,000g以上和小于约100,000g,或约15,000g以上和小于约50,000g的速度是优选的。更优选从约18,000g到约40,000g或约30,000g;以及从约18,000g到约25,000g的速度。约20,000g的离心速度是特别优选的。一般来说,适宜的离心时间是从约5分钟至约2小时,例如,从约10分钟到约1.5小时,或更优选从约15分钟到约1小时。约0.5小时的时间可能是优选的。有时,将生物样品以约20,000g离心约0.5小时是优选的。然而,上述速度和时间可适合以任何组合使用(例如,从约18,000g至约25,000g,或从约30,000g至约40,000g,持续约10分钟至约1.5小时,或约15分钟至约1小时,或约0.5小时等)。一个或多个离心步骤可在低于环境的温度下进行,例如在约0-10℃,优选约1-5℃,例如约3℃或约4℃。

[0104] 在一个实施方案中,方法包括过滤浓缩的步骤。在一些实施方案中,过滤浓缩步骤使用具有保留微泡部分并除去所有其它细胞部分和细胞碎片的分子量截止值的滤器。在一些实施方案中,滤器具有至少100 kDa的分子量截止值。

[0105] 在一些实施方案中,在生物样品与捕获表面接触之前或之后执行一个或多个过滤步骤。可以使用尺寸在约0.1至约1.0 μm范围内的滤器,优选约0.8 μm或0.22 μm。过滤还可以使用具有递减的孔隙率的滤器以连续过滤进行。

[0106] 在一些实施方案中,在生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个浓缩步骤,以减少在色谱阶段处理的样品体积。浓缩可通过对样品高速离心(例如10,000和100,000g之间),使微泡沉降。这可包括一系列差速离心。所获得的沉淀中的微泡可以较小体积和在适当的缓冲液中重构,以进行该过程的后续步骤。浓缩步骤也可以通过超滤进行。事实上,这种超滤既浓缩了生物样品,又对微泡部分进行了额外的纯化。在另一个实施方案中,过滤是超滤,优选切向超滤。切向超滤包括在由确定截止阈值的膜分隔的两个隔室(滤出液和保留液)之间浓缩和分级分离溶液。分离是通过在保留液隔室中施加流动和在该隔室与滤出液隔室之间施加跨膜压力来执行的。不同的系统可以用来进行超滤,如螺旋膜(Millipore, Amicon)、扁平膜或中空纤维(Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor)。在本发明的范围内,使用截止阈值在1000 kDa以下,优选在100 kDa至1000 kDa之间,或甚至更优选在100 kDa至600 kDa之间的膜是有利的。

[0107] 在一些实施方案中,在生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个尺寸排阻色谱步骤或凝胶渗透色谱步骤。为了进行凝胶渗透色谱步骤,优选使用从二氧化硅、丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物或其混合物(例如琼脂糖-葡聚糖混合物)中选择的载体。例如,这样的载体包括但不限于: SUPERDEX® 200HR (Pharmacia)、TSK G6000 (TosoHaas)或SEPHACRYL® S (Pharmacia)。

[0108] 在一些实施方案中,在生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个亲和色谱步骤。一些微泡也可以用某些表面分子来表征。由于微泡是从细胞质膜的出芽形成的,因此这些微泡通常共有它们的起源细胞上存在的许多相同的表面分子。在这里使用的“表面分子”共同指存在于微泡的表面上或膜中或膜上的抗原、蛋白、脂类、碳水化合物和标志

物。这些表面分子可以包括,例如,受体、肿瘤相关抗原、膜蛋白修饰(例如糖基化结构)。例如,从肿瘤细胞出芽的微泡通常在其细胞表面上显示肿瘤相关抗原。因此,亲和色谱或亲和和排阻色谱也可与本文提供的方法结合使用,以从特定供体细胞类型中分离、鉴定和/或富集特定的微泡群体(Al-Nedawi et al., 2008; Taylor and Gercel-Taylor, 2008)。例如,肿瘤(恶性或非恶性)微泡携带肿瘤相关表面抗原,并可通过这些特定的肿瘤相关表面抗原检测、分离和/或富集。在一个例子中,表面抗原是上皮细胞粘附分子(EpCAM),其对于来自肺、结直肠、乳腺、前列腺、头颈和肝来源的癌的微泡具有特异性,而对来自血液细胞来源的癌的微泡无特异性(Balzar et al., 1999; Went et al., 2004)。此外,肿瘤特异性微泡还可以通过某些表面标志物(例如CD80和CD86)的缺乏来表征。在这些情况下,例如通过亲和和排阻色谱,可以排除带有这些标志物的微泡,以进一步分析肿瘤特异性标志物。例如,可以通过使用不同的载体、树脂、珠、抗体、适体、适体类似物、分子印迹聚合物或本领域已知的特异性靶向微泡上的所需表面分子的其它分子,实现亲和色谱。

[0109] 任选地,可以在微泡分离或核酸(或蛋白)提取之前将对照颗粒加入到样品中用作内部对照,以评价微泡纯化和/或核酸提取的效率或质量。本文所描述的方法提供了有效的分离和对照颗粒以及微泡部分。这些对照颗粒包括Q-β噬菌体、病毒颗粒或含有对照核酸(例如,至少一种对照靶基因)的任何其它颗粒,这些对照核酸可以是天然存在的,或通过重组DNA技术改造的。在一些实施方案中,对照颗粒的数量在添加到样品之前是已知的。使用实时PCR分析,可以定量对照靶基因。在一些实施方案中,对照颗粒的大小在添加到样品之前是已知的。对照靶基因的定量可用来确定微泡纯化或核酸提取过程的效率或质量。

[0110] 优选地,对照颗粒是Q-β噬菌体,这里称为“Q-β颗粒”。本文描述的方法中使用的Q-β颗粒可以是天然存在的病毒颗粒,或可以是重组或工程改造的病毒,其中病毒颗粒的至少一种组分(例如,基因组或外壳蛋白的一部分)是由本领域已知的重组DNA或分子生物学技术合成的。Q-β是光滑病毒科的成员,特征为线性的单链RNA基因组,它由三个编码以下四种病毒蛋白的基因组成:外壳蛋白、成熟蛋白、溶解蛋白和RNA复制酶。由于Q-β的大小与平均微泡相似,Q-β可以容易地使用与本文所述的用于分离微泡的相同纯化方法,从生物样品中纯化。此外,Q-β病毒单链基因结构的复杂度低,有利于其在基于扩增的核酸测定中用作对照。Q-β颗粒包含对照靶基因或对照靶序列,其经检测或测量用于定量样品中Q-β颗粒的量。例如,对照靶基因是Q-β外壳蛋白基因。在Q-β颗粒加入到生物样品中后,使用本文描述的提取方法,提取来自Q-β颗粒的核酸,以及来自生物样品的核酸。Q-β对照靶基因的检测可以通过RT-PCR分析测定,例如,与感兴趣的生物标志物同时测定。10倍稀释的对照靶基因的至少2、3或4个已知浓度的标准曲线可以用来确定拷贝数。可以比较检测到的拷贝数和添加的Q-β颗粒的数量以确定分离和/或提取过程的质量。

[0111] 在一个优选的实施方案中,在核酸提取之前,将Q-β颗粒加入到尿样中。例如,在超滤之前和/或在预过滤步骤之后,将Q-β颗粒加入到尿样中。

[0112] 在一些实施方案中,将50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、1,000或5,000拷贝的Q-β颗粒添加到体液样品中。在一个优选的实施方案中,将100拷贝的Q-β颗粒添加到体液样品中。可以根据Q-β噬菌体感染靶细胞的能力来计算Q-β颗粒的拷贝数。因此,Q-β颗粒的拷贝数与Q-β噬菌体的菌落形成单位相关。

[0113] 在一些实施方案中,本文所述的方法和试剂盒包括一个或多个过程中对照。在一

些实施方案中,过程中对照是指示样品质量的参考基因(即体液样品的质量的指示物)的检测和分析。在一些实施方案中,参考基因是样品固有的转录物。在一些实施方案中,参考基因通过额外的qPCR进行分析。

[0114] 在一些实施方案中,提取的核酸或蛋白接受进一步分析。各种核酸测序和蛋白鉴定技术被用来检测和分析从生物样品的微泡部分提取的核酸(如无细胞DNA和/或RNA)或蛋白。由于微泡可容易收集的非-侵入性,分析从微泡提取的核酸或蛋白用于诊断目的具有广泛的意义。

[0115] 核酸生物标志物的检测

在一些实施方案中,提取的核酸包含DNA和/或DNA和RNA。在所提取的核酸包含DNA和RNA的实施方案中,在进一步扩增之前,优选RNA被逆转录成互补DNA(cDNA)。这样的逆转录可以单独进行,或与扩增步骤结合进行。结合逆转录和扩增步骤的方法的一个例子是逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),它可以进一步改良为定量的,例如定量RT-PCR,如美国专利号5,639,606所述,其为本教导通过引用并入本文。该方法的另一个例子包括两个独立的步骤:将RNA转化为cDNA的逆转录的第一步,和用定量PCR或RNA测序对cDNA的量进行定量的第二步。如随后的实施例所示,使用本文公开的方法从含有核酸的颗粒中提取的RNA包括多种转录物,包括但不限于核糖体18S和28S rRNA、微RNA、转移RNA、与疾病或医学病症相关的转录物以及对诊断和监测医学病症具有重要意义的生物标志物。

[0116] 例如,RT-PCR分析检测了每个反应的Ct值(循环阈值)。在RT-PCR中,通过累积荧光信号来检测阳性反应。Ct值被定义为荧光信号超越阈值(即超过背景水平)所需的循环数。Ct水平与样品中靶核酸或对照核酸的量成反比(即Ct水平越低,样品中的对照核酸的量越大)。

[0117] 在另一个实施方案中,对照核酸的拷贝数可以使用各种公认技术中的任何一种来测量,包括但不限于RT-PCR。可以使用本领域已知的方法,例如通过产生和利用校准或标准曲线,来检测对照核酸的拷贝数。

[0118] 因此,在一些实施方案中,确定、评价、测量、表征或测定基因表达的方法使用RT-PCR进行。在其它实施方案中,确定、评价、测量、表征或测定基因表达的方法根据本领域已知的用于测量基因表达的任何其它PCR方法进行。

[0119] 在一些实施方案中,将从样品提取的核酸与对照组基因或与如本文进一步提供的基因标记进行比较的方法,包括使用RT-PCR、定量PCR(qPCR)或本领域已知的可用于比较至少一种或多种基因的基因表达的任何其它方法。

[0120] 在一些实施方案中,一种或多种生物标志物可以是一个遗传畸变或遗传畸变的集合,其在本文用于指含核酸的颗粒中的核酸量以及核酸变体。具体而言,遗传畸变包括但不限于基因(例如癌基因)或一组基因的过度表达、基因(如肿瘤抑制基因,例如p53或RB)或一组基因的表达不足、基因或一组基因的剪接变体的可选产生、基因拷贝数变体(CNV)(例如,DNA双微体)(Hahn, 1993)、核酸修饰(例如甲基化、乙酰化和磷酸化)、单核苷酸多态性(SNP)、染色体重排(例如倒置、缺失和重复)和基因或一组基因的突变(插入、缺失、重复、错义、无义、同义或任何其它核苷酸改变),在许多情况下,所述突变最终影响基因产物的活性和功能,导致可选转录剪接变体和/或基因表达水平的变化,或上述任意的组合。

[0121] 分离的颗粒中存在的核酸的分析是定量和/或定性的。对于定量分析,对分离的颗

粒中感兴趣的特定核酸的量(表达水平),无论是相对的还是绝对的,用本领域已知的方法测量(下文所述)。对于定性分析,在分离的微泡中感兴趣的特定核酸的种类,无论是野生型还是变体,用本领域已知的方法鉴定。

[0122] 本发明还包括从生物样品中分离微泡以便从生物样品中提取高质量的核酸的新方法的各种用途,用于(i) 辅助诊断受试者,(ii) 监测受试者中疾病或其它医学病症的进展或复发,或(iii) 辅助评估正经历或预期针对疾病或其它医学病症的治疗的受试者的治疗功效;其中,检测了由本方法获得的核酸提取物中是否存在一种或多种生物标志物,并且该一种或多种生物标志物分别与疾病或其它医学病症的诊断、进展或复发或治疗功效相关。

[0123] 外来体蛋白生物标志物的检测

使用本文描述的方法从体液中分离的细胞外囊泡(EV)含有与疾病或医学病症相关的许多类型的蛋白,并且这些蛋白生物标志物对于诊断和监测医学病症是重要的。

[0124] 本文描述了从尿液细胞外囊泡(EV)中提取并用于评估和/或监测肾移植排斥的蛋白生物标志物。虽然本文提供的例子使用了用于离心的各种膜和设备或/或外壳设备,这些设备允许有效地捕获EV并释放其中所含的蛋白。

[0125] 从微泡分离物检测蛋白的方法可以是本领域中使用的任何方法。蛋白可以是在EV表面上或包含在EV内的蛋白。

[0126] 在一些实施方案中,EV蛋白分析使用识别完整微泡的表面的蛋白的方法。完整的外来体可以使用多种从捕获表面洗脱完整的外来体的方法来分离。例如,一些方法采用尺寸排阻色谱。在其它实施方案中,完整的囊泡用洗脱缓冲液从捕获材料中洗脱。洗脱缓冲液可以是pH 3直至pH 8.5的缓冲液。在其它实施方案中,完整的EV可使用过滤膜从尿液或血浆分离。在其它实施方案中,微泡可通过接头分子从亲和性捕获材料洗脱,所述接头分子在暴露于光、UV光、pH变化或酶时分离和释放微泡。

[0127] 在其它实施方案中,本领域的蛋白检测测定将用于检测从EV裂解的EV蛋白。完整的EV可从捕获材料提取,然后裂解。在一些实施方案中,通过将裂解缓冲液直接添加到表面,从捕获表面提取EV蛋白。蛋白纯化方法被用来鉴定完整的EV、裂解的EV上的蛋白或其组合。

[0128] 本领域的鉴定蛋白的蛋白检测方法可以是定量或定性的。有些方法检测天然蛋白;有些方法检测变性蛋白,有些方法检测蛋白复合物,有些方法检测蛋白聚集体、多肽、脂蛋白和/或蛋白修饰。当使用完整囊泡蛋白时,使用检测天然构象的蛋白的方法可能是优选的,但不是必需的。在一些实施方案中,当使用从EV裂解的蛋白时,通常使用检测变性蛋白的方法,但不是必需的。

[0129] 在其它实施方案中,检测和/或定量存在于从体液分离的细胞外囊泡中的完整和/或裂解的蛋白可以使用多种公知技术中的任何技术进行/测量,包括但不限于酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白免疫印迹、邻近连接测定(PLA)、邻近延伸测定(PEA)、免疫荧光测定(IF)、免疫组织化学(IHC)、免疫细胞化学(ICC)、流式细胞术和FACS分析、免疫沉淀法(IP)、酶联免疫斑点(ELISPOT)、中尺度发现ELISA测定、基于适体的测定、表面等离子体共振、拉曼光谱、酶促测定、荧光共振能量转移(FRET)、均匀时间分辨荧光(HTFR)、质谱和/或总蛋白浓度测定,如Bradford蛋白测定,或二辛可宁酸测定(BCA测定),也称为Smith测定。在一些

实施方案中,采用本文描述的方法的组合。

[0130] 在一些实施方案中,采用基于抗体的检测方法。在其它方法中,使用适体或合成抗体检测方法。

[0131] 用于从生物样品分离微泡的试剂盒

本发明的一个方面还涉及在本文公开的方法中使用的试剂盒。该试剂盒包括捕获表面装置,该捕获表面装置足以将来自生物样品的微泡与也存在于生物样品中的不需要的颗粒、碎片和小分子分离。本发明还任选地包括在分离和任选的后续核酸和/或蛋白提取过程中使用上述试剂的说明书。

实施例

[0132] 虽然本文提供的实施例使用了用于离心和/或过滤目的的各种膜和设备,但应该理解,这些方法可以用于允许有效地捕获微泡和释放其中所含的核酸(特别是RNA)的任何捕获表面和/或外壳设备。

[0133] 实施例1:用于诊断肾移植排斥的尿液外来体mRNA标记的发现和验证

在本文提出的研究中,从对于临床适应症经历移植肾活检的患者中采集尿样。来自尿液外来体的RNA从至多20 mL尿液中分离,以供表达分析。筛选了两个患者群,第一群用于产生候选标志物组(训练),和第二群用于证实较小组的性能(验证)。来自外来体的RNA,在此也称为exoRNA,进行逆转录和预扩增,然后使用OpenArray™ Human Inflammation Panel分析RNA标记。OpenArray是一种TaqMan qPCR阵列。Human Inflammation Panel由586个靶标和21个内源性对照测定组成。来自肾移植排斥患者的尿样的排斥标准包括细胞排斥(包括边缘排斥)、急性或慢性活动性的抗体介导的排斥(AMR)、或细胞和AMR。没有来自肾移植患者的排斥尿样没有症状,没有细胞或抗体介导的移植排斥的临床适应症。此外,使用了三个内部尿液对照样品:一个混合的人类男性和女性样品(CTRL_1)、一个混合的人类男性样品(CTRL_M)和一个混合的人类女性样品(CTRL_F)。

[0134] 每个受试者的简要说明在下面的表1和表2中提供:

表1:训练群患者信息。每个患者通过排斥状态和排斥的性质来表征(AMR - 抗体介导的排斥,* - RNA提取过程中拒绝的样品)

患者 ID	状态	排斥类型
EX01-01a	排斥	细胞
EX01-01b*	排斥	细胞
EX01-02a	非-排斥	
EX01-02b	非-排斥	
EX01-04	排斥	AMR, 慢性的
EX01-08a	非-排斥	
EX01-08b	非-排斥	
EX01-10	排斥	急性细胞 IB
EX01-17	排斥	急性细胞 IA
EX01-18	排斥	急性细胞 IB
EX01-19a	非-排斥	
EX01-19b	非-排斥	
EX01-20*	非-排斥	
EX01-26	非-排斥	
EX01-27	排斥	急性细胞 IA
EX01-28	非-排斥	
EX01-29	排斥	AMR, 慢性的
EX01-31	排斥	AMR, 轻度
EX01-32	排斥	AMR, 慢性的
EX01-33	非-排斥	
EX01-35	排斥	急性细胞, 轻度, 血浆富含的
EX01-37	非-排斥	
EX01-38	非-排斥	
EX01-39	排斥	急性细胞, 轻度/AIN
EX01-40	非-排斥	
EX01-46	排斥	急性细胞/AMR
EX01-50	非-排斥	
EX01-51	排斥	AMR, 急性

表2: 验证群患者信息。每个患者通过排斥状态和排斥的性质来表征 (AMR - 抗体介导的排斥, * - RNA提取过程中拒绝的样品, † - 预-排斥样品)

患者 ID	状态	排斥原因
EX01-05	非-排斥	
EX01-09	非-排斥	
EX01-11	非-排斥	
EX01-13	排斥	边缘细胞
EX01-20	非-排斥	
EX01-21	排斥	细胞/AMR, 慢性的
EX01-22*	非-排斥	
EX01-27a	排斥	急性细胞, 慢性的
EX01-27b	排斥	急性细胞, 慢性的
EX01-29a†	排斥	边缘细胞/AMR, 慢性的
EX01-29b	排斥	边缘细胞/AMR, 慢性的
EX01-29c	排斥	边缘细胞/AMR, 慢性的
EX01-36	排斥	细胞, 血浆富含的
EX01-37	排斥	边缘细胞
EX01-39	排斥	急性细胞, 早期/轻度
EX01-43	排斥	AMR, 慢性的
EX01-46	排斥	AMR, 慢性的
EX01-47	非-排斥	
EX01-51	排斥	边缘细胞
EX01-52a†	排斥	细胞, 早期/轻度
EX01-52b	排斥	细胞, 早期/轻度
EX01-54	排斥	AMR, 急性
EX01-55	非-排斥	
EX01-56a	排斥	AMR, 急性
EX01-56b	排斥	AMR, 急性
EX01-57a†	排斥	急性细胞, 慢性的
EX01-57b	排斥	急性细胞, 慢性的
EX01-57c	排斥	急性细胞, 慢性的
EX01-59	非-排斥	
EX01-60	排斥	细胞
EX01-61	非-排斥	
EX01-64	排斥	急性细胞, 早期/轻度
EX01-65	非-排斥	
EX01-67	排斥	细胞
EX01-68	排斥	细胞/AMR 慢性的
EX01-70	非-排斥	
EX01-74	非-排斥	
EX01-77	非-排斥	

简而言之, 研究设计如下: 20 mL尿样以2000 x g离心20分钟。然后处理上清液以使用尿液临床样品浓度 (uCSC) 提取EV RNA, 如PCT申请公布号W0 2014/10757、W02015/021158、W02016/007755和W02016/054252中所述的。然后处理沉淀以提取RNA。RNA在无核酸酶的水中洗脱, 并按照制造商的指示, 使用VILO cDNA合成试剂盒进行逆转录。进行RNA分析 (图2)。

[0135] OpenArray (OA) Human Inflammation Panel通过TaqMan qPCR测定运行。总共有586个靶测定在被研究为一系列炎性疾病的靶标的基因上进行, 以及21个内源性对照测定。

[0136] 然后对每个样品的607个测定的原始数据进行统计分析、揭示排斥和非排斥的标

记的全体簇集、以及多变量逻辑回归分析。统计分析确定的从尿样的EV得到的三基因标记能够显著区分经历肾移植排斥的患者与未显示排斥适应症的那些患者。标记包括基因CXCL9、CXCL10和IL17RA。通过多变量-逻辑回归评估三基因标记的性能,如图3A和3B所示。标记的接受者操作特征(ROC)分析显示有效的曲线下面积(AUC)为0.792,图3B。

[0137] 因此,本文提出的研究已经在尿液外来体中鉴定了三基因标记,这对于评估肾移植排斥的患者是有用的。

[0138] 实施例2:用于诊断肾移植排斥的尿液外来体蛋白的发现

在本文提供的研究中,从对于临床适应症经历移植肾活检的患者中收集尿样。9名没有临床或亚临床排斥适应症的肾移植受试者与10名具有细胞或抗体介导的或临床排斥的肾移植受试者一起被使用,见表3,患者信息。

[0139] 表3. 患者信息。蛋白群患者信息。每个患者通过排斥状态和排斥的性质来表征(AMR - 抗体介导的排斥)

患者 ID	状态	排斥类型
EX01-01a	排斥	细胞
EX01-02b	非-排斥	
EX01-08a	非-排斥	
EX01-17	排斥	急性细胞 IA
EX01-18	排斥	急性细胞 IB
EX01-19a	非-排斥	
EX01-26	非-排斥	
EX01-29	排斥	AMR, 慢性的
EX01-31	排斥	AMR, 轻度
EX01-32	排斥	AMR, 慢性的
EX01-33	非-排斥	
EX01-35	排斥	急性细胞, 轻度, 血浆富含的
EX01-38	非-排斥	
EX01-39	排斥	急性细胞, 轻度/AIN
EX01-46	排斥	急性细胞/AMR
EX01-50	非-排斥	
EX01-51	排斥	AMR, 急性

来自尿液外来体的蛋白从至多10 mL尿液中分离,以供表达分析。使用外来体捕获亲和膜分离尿液外来体。简言之,将10 mL患者尿液或对照尿液加入到外来体捕获膜柱中,直至整个样品通过柱为止。然后柱用15 mL洗涤缓冲液洗涤,完整的外来体用400 μ L洗脱缓冲液洗脱。在一个实施方案中,使用邻近延伸测定(PEA)测定每个样品的EV洗脱液中的炎性蛋白。针对92种炎性蛋白的蛋白组学分析阵列,使用Proseek™ Multiplex Inflammation Panel (OLINK Proteomics,Uppsala, Sweden),对每个尿液外来体洗脱液运行。在另一个实施方案中,使用ELISA和/或蛋白印迹,和/或其它蛋白检测方法,对来自各个尿液-来源的EV样品的炎性蛋白进行定量。在此鉴定了尿液细胞外囊泡相关蛋白并列于表4中。

[0140] 表4. 在尿液EV中检测的可用作生物标志物的蛋白。

[0141] 在尿液EV中检测的可用作移植排斥的生物标志物的蛋白

IL-8	MCP-4	4E-BP1	CXCL1	TNF
VEGF-A	CCL11	IL-20	TSLP	CCL23
MCP-3	TNFSF14	SIRT2	CCL4	CD5
CDCP1	FGF-23	CCL28	CD6	MIP-1 α
CD244	FGF-5	DNER	SCF	Flt3L
IL-7	MMP-1	EN-RAGE	IL-18	CXCL6
OPG	LIF-R	CD40	TGFA	CXCL10
LAP TGF- β -1	FGF-21	FGF-19	IL-12B	ST1A1
uPA	CCL19	LIF	IL-24	STAMPB
IL-6	IL-15RA	MCP-2	ARTN	ADA
IL-17C	IL-10RB	CASP-8	MMP-10	TNFB
MCP-1	IL-18R1	CCL25	IL-10	CSF-1
IL-17A	PD-L1	CX3CL1	CXCL9	IL-20RA
CXCL11	β -NGF	TNFRSF9	CST5	HGF
AXIN1	CXCL5	NT-3	IL-2RB	CCL20
TRAIL	TRANCE	TWEAK	IL-1 α	OSM

除了EV mRNA CXCL9和CXCL10基因表达数据,CXCL9和CXCL10蛋白表达值也能够显著区分排斥和非-排斥尿液外来体样品(图4),进一步验证了本文描述的exoRNA标记。多变量逻辑回归显示CXCL9和CXCL10蛋白的诊断性能是非常有意义的(接受者操作特征(ROC) AUC = 0.827), (图4)。

[0142] 对18个尿液外来体样品的每一个中92种蛋白靶标的每一种的标准化蛋白表达数据通过带有Bonferroni校正的ANOVA进行分析。检测的92种蛋白中,以下8种在排斥和非-排斥样品之间有差异表达:MCP-4、MCP-1、CX3CL1、CXCL9、CCL11、PD-L1、ADA、CSF-1 ($P = 0.05$), (图5)。3种蛋白(包括MCP-1、MCP-4和CX3CL1)的蛋白表达水平在排斥和非-排斥外来体蛋白样品之间有高度显著性差异($P = 0.01$), (图6)。

[0143] 因此,本文提出的研究已鉴定了尿液EV蛋白特征,其能够很好地正确评估具有肾移植排斥的患者。

[0144] 因此,本文提出的研究已在尿液外来体中鉴定了可用于评估肾排斥患者的基因标记和蛋白生物标志物。来自尿液的细胞RNA的分析无法生成这样的标记(美国专利W02017/192945 A1)。

[0145] 其它实施方案

虽然本发明已结合其详细描述进行了说明,但上述描述意在说明而不是限制本发明的范围,该范围由随附权利要求书的范围定义。其它方面、优点和修改在随后的范围内。

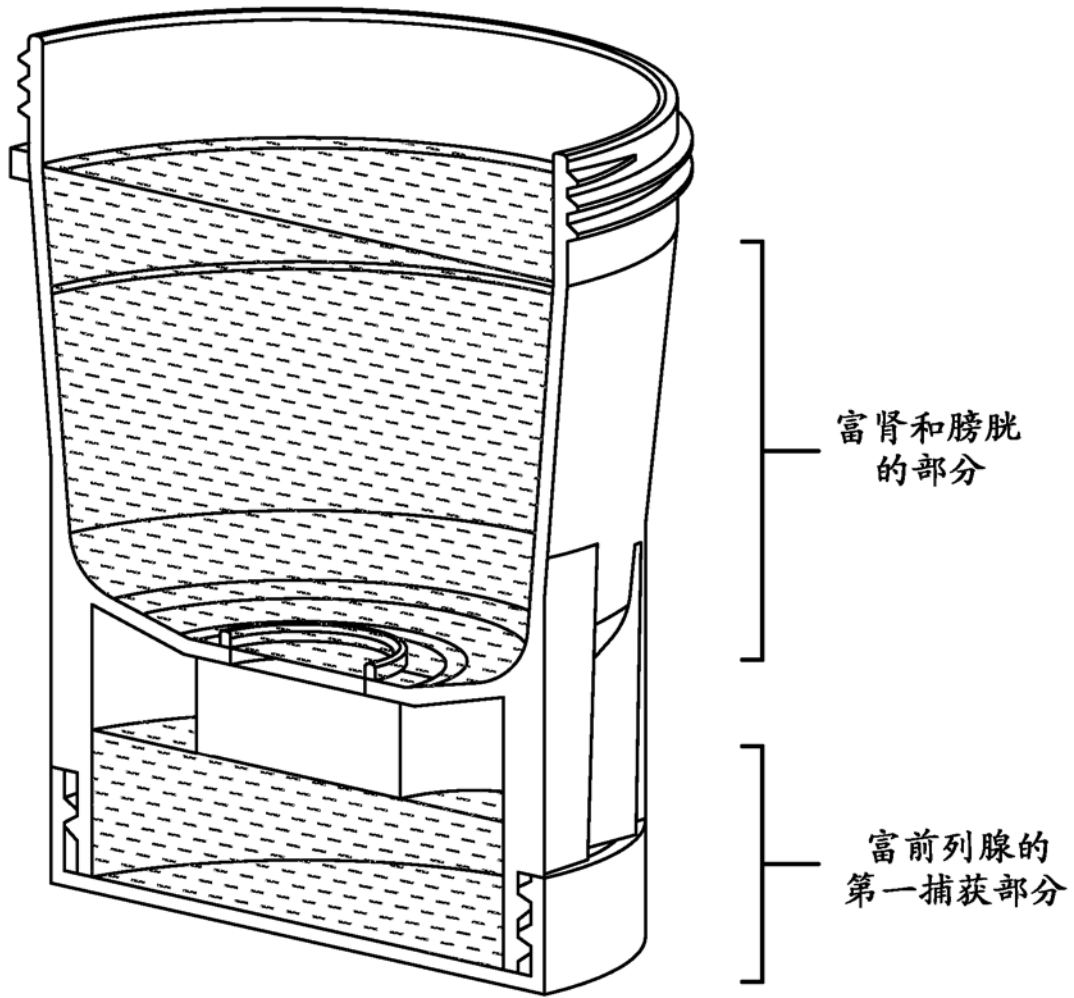


图 1

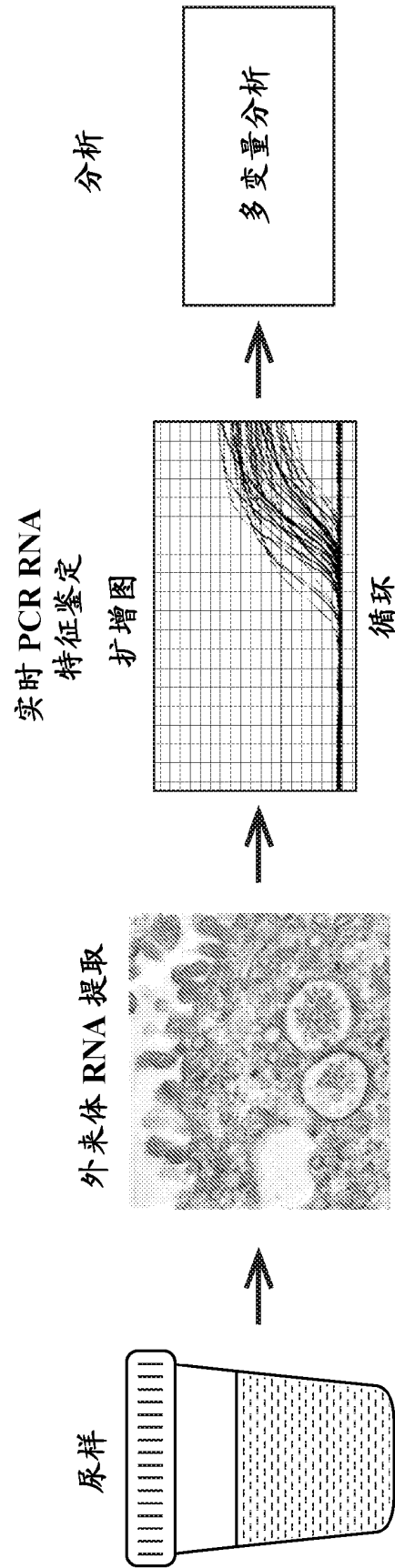


图 2

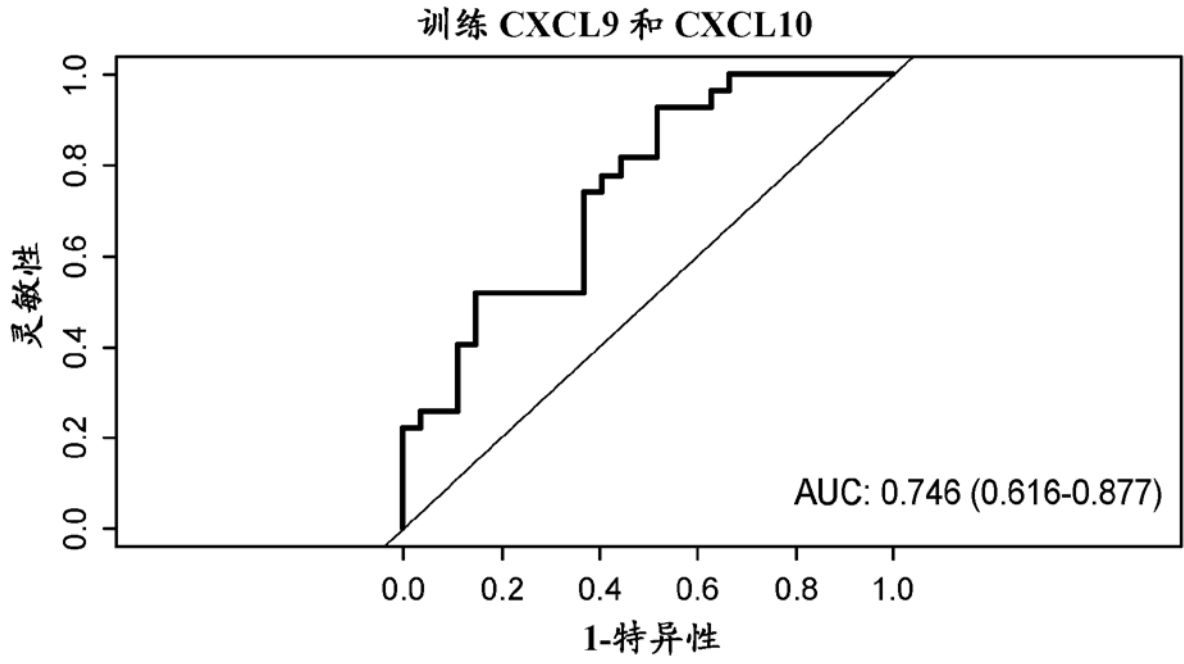


图 3A

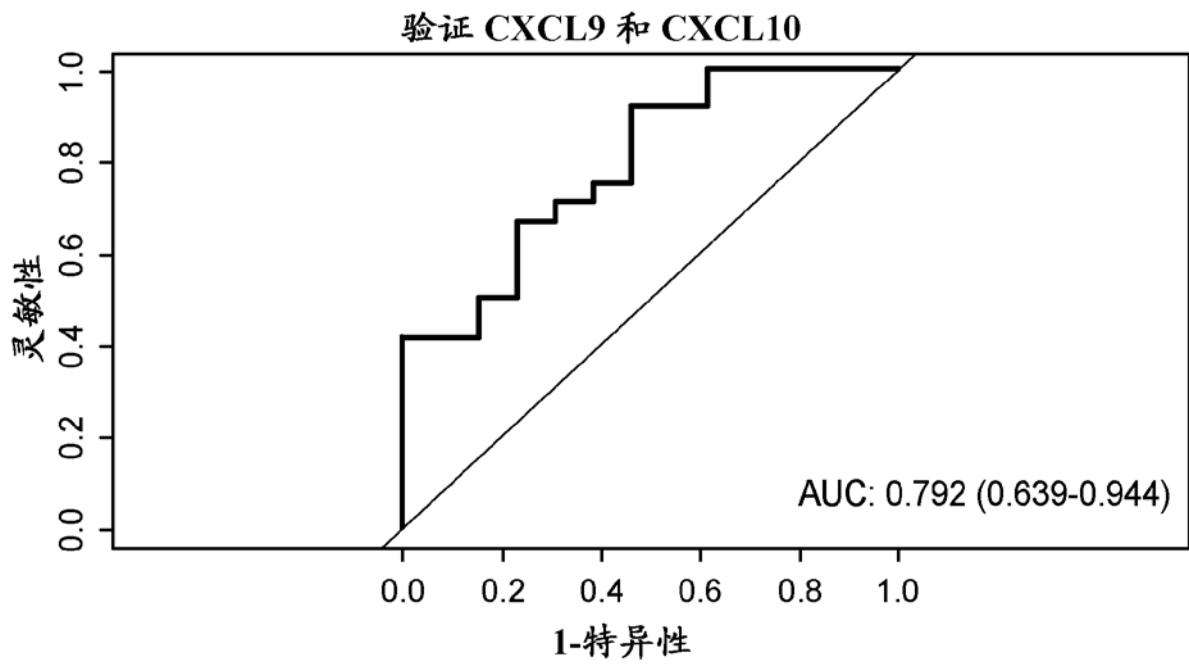


图 3B

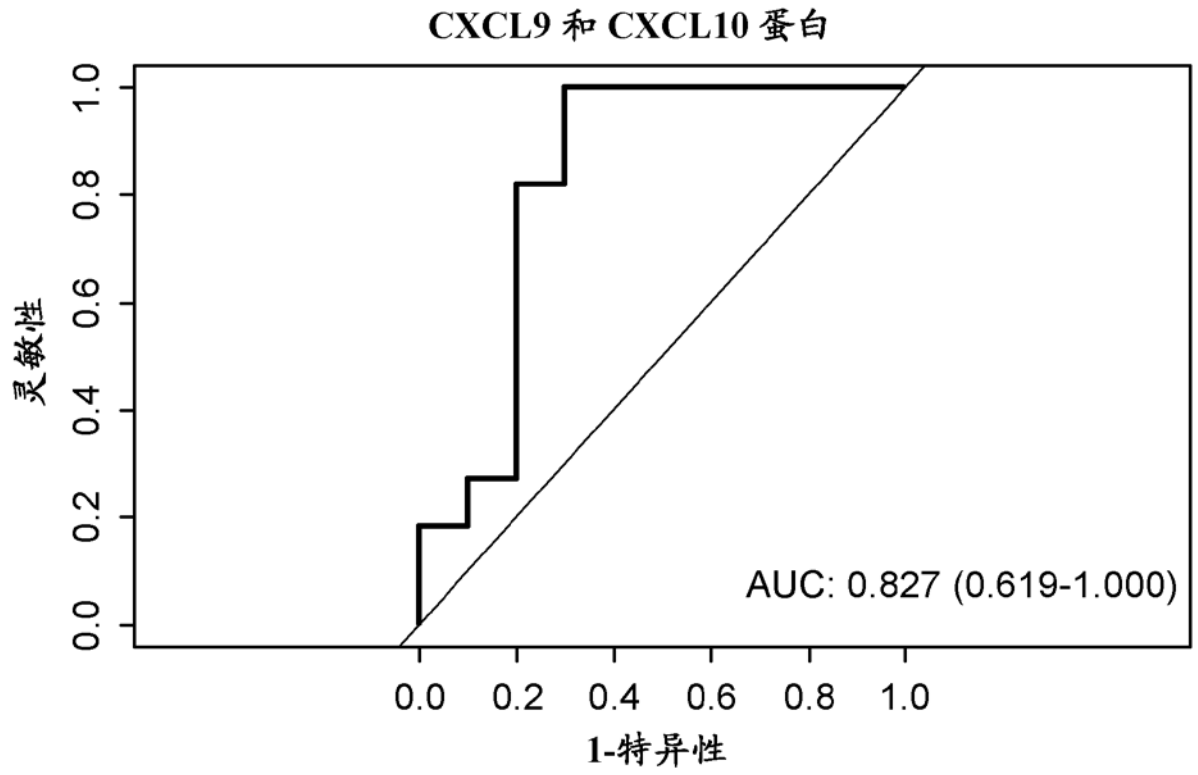


图 4

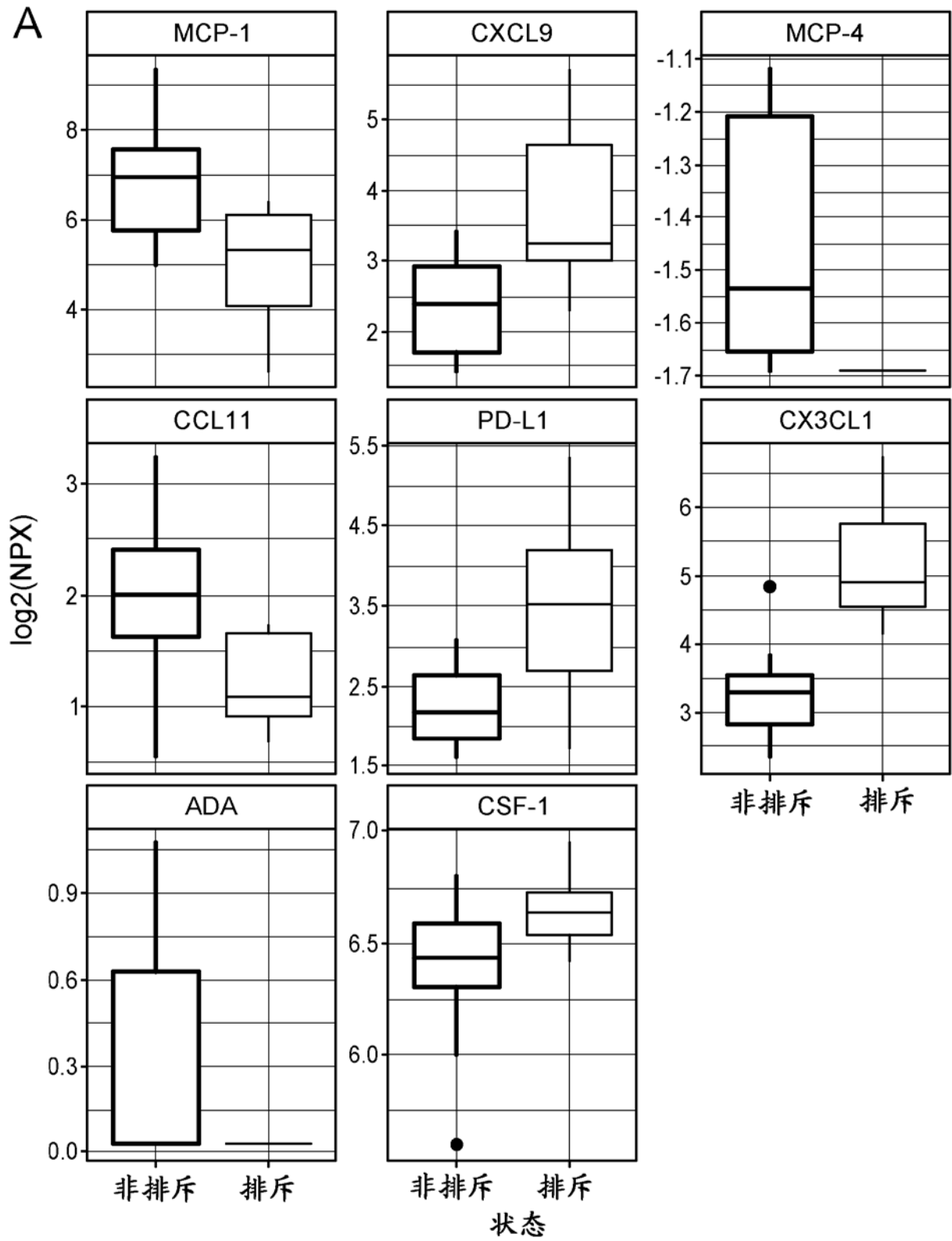


图 5

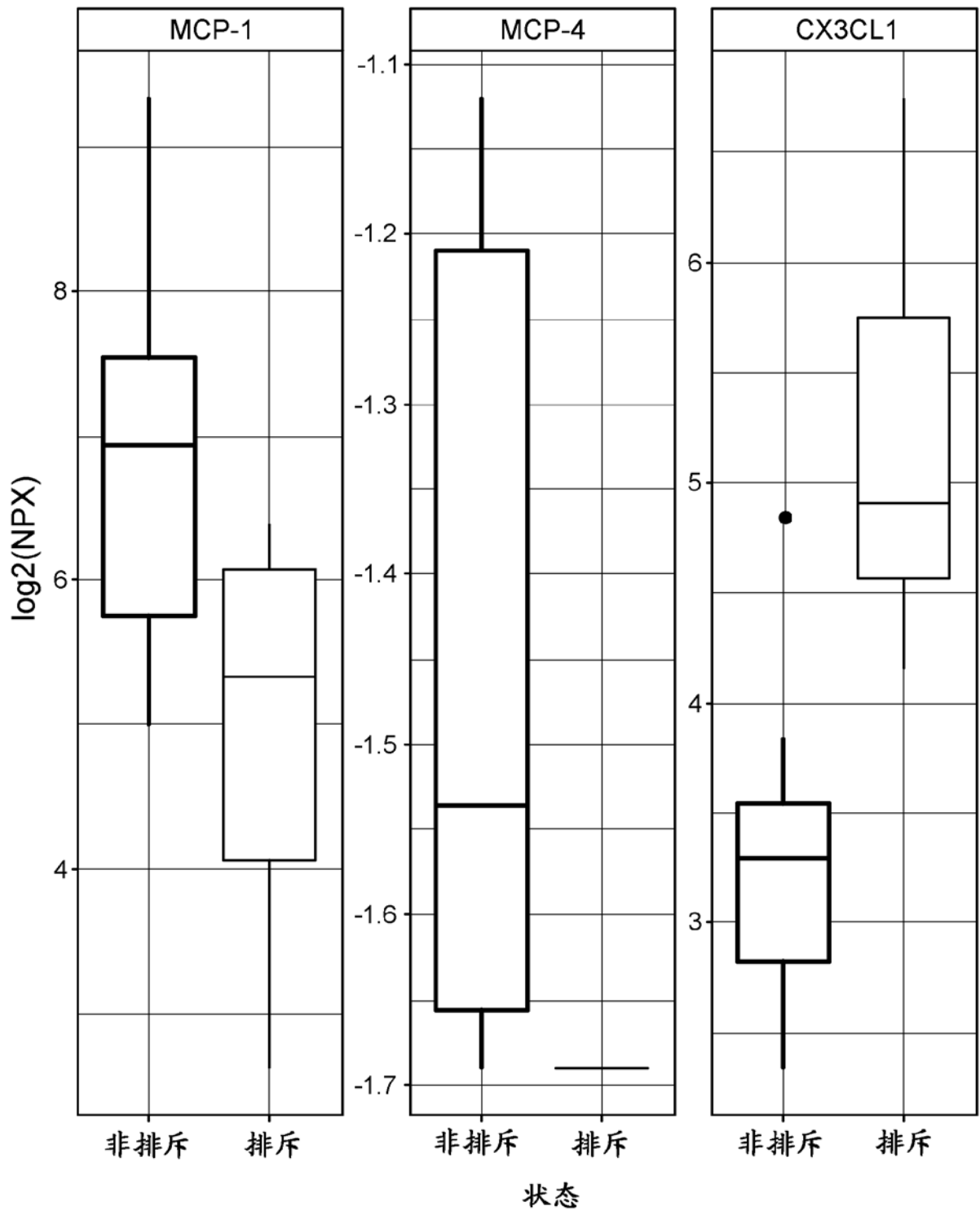


图 6

专利名称(译)	微泡核酸和/或蛋白及其作为肾移植排斥的标志物的应用		
公开(公告)号	CN110945145A	公开(公告)日	2020-03-31
申请号	CN201880032401.1	申请日	2018-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	外来体诊断公司 布赖汉姆妇女医院		
申请(专利权)人(译)	外来体诊断公司 布里格姆妇女医院		
当前申请(专利权)人(译)	外来体诊断公司 布里格姆妇女医院		
[标]发明人	J K O 斯科格		
发明人	J.赫利 C.科蒂基亚 R.基钦 V.塔蒂戈尔塔 J.K.O.斯科格 J.阿兹		
IPC分类号	C12Q1/6883 G01N33/53 G01N33/50		
CPC分类号	C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/6893 G01N2800/245 G01N2800/347 G01N1/28		
代理人(译)	黄登高		
优先权	62/507433 2017-05-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般涉及微泡生物标志物用于在患者中评估肾移植排斥的用途，所述生物标志物例如核酸(包括mRNA标记)和/或蛋白。本发明进一步涉及在已接受肾移植的患者中评估和/或监测肾移植排斥。本发明还涉及通过从改良的收集杯的上室采集尿样，或通过从标准杯采集30 ml，改进来自尿液外来体标志物的信号的方法。

