



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110446790 B

(45) 授权公告日 2023. 03. 31

(21) 申请号 201780084970.6

(22) 申请日 2017.11.17

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 110446790 A

(43) 申请公布日 2019.11.12

(30) 优先权数据  
62/428059 2016.11.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2019.07.29

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2017/062370 2017.11.17

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02018/102162 EN 2018.06.07

(73) 专利权人 外来体诊断公司  
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J.K.O. 斯科格

E. 卡斯特拉诺斯-里扎尔多斯  
V. 塔迪戈特拉 D. 格里姆 X. 张  
W. 余

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001  
专利代理师 初明明 黄希贵

(51) Int. Cl.  
C12Q 1/6851 (2006.01)  
C12Q 1/6886 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2014193999 A2, 2014.12.04  
WO 0071562 A1, 2000.11.30  
US 2016041153 A1, 2016.02.11  
CN 101627121 A, 2010.01.13  
US 6812023 B1, 2004.11.02  
审查员 李慧敏

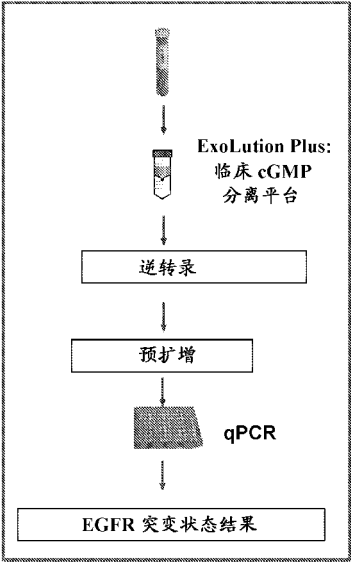
权利要求书2页 说明书40页  
序列表20页 附图8页

(54) 发明名称

使用外来体RNA和无细胞DNA检测血浆中的突变的方法和组合物

(57) 摘要

本发明通常涉及在生物样品中检测一种或多种生物标记的方法和试剂盒,所述生物标记例如表皮生长因子受体(EGFR)突变,如EGFR基因中的T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失,以有助于对疾病例如癌症的诊断、预后、监测或治疗选择。所述方法和试剂盒可用于帮助对肺癌,例如,非-小细胞肺癌(NSCLC)的诊断、预后、监测或治疗选择。



1. 检测表皮生长因子受体EGFR基因中的T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种的核酸表达水平的试剂在制备用于在有需要的受试者中非小细胞肺癌NSCLC的诊断、预后、监测或治疗选择的药物中的用途,所述诊断、预后、监测或治疗选择包括以下步骤:

(a) 从来自受试者的血浆样品中提取核酸,其中所述核酸包含至少一种外来体核酸和至少一种循环核酸;

(b) 在提取的核酸中,检测EGFR基因中的T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种的表达水平;和

(c) 将步骤(b)中检测的各表达水平与相应的预先定义的截止阈值进行比较,以确定在提取的核酸中在EGFR基因中的T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种的存在与否,

其中在提取的核酸中存在T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种指示受试者中存在NSCLC或受试者更高倾向发生NSCLC。

2. 权利要求1的用途,其中步骤(b)中检测的表达水平是循环阈值(Ct)值。

3. 权利要求1或2的用途,其中步骤(a)还包括在提取后进行逆转录反应。

4. 权利要求3的用途,其中逆转录反应包括使用一个或多个扩增对照。

5. 权利要求4的用途,其中扩增对照是一种核酸,其中所述核酸是DNA。

6. 权利要求3的用途,其中逆转录反应包括使用一个或多个抑制对照。

7. 权利要求6的用途,其中抑制对照是一种外源性核酸。

8. 权利要求7的用途,其中外源性核酸以已知量加入逆转录反应或提取步骤。

9. 权利要求1或2的用途,其中该用途还包括在步骤(a)之后和步骤(b)之前进行预扩增反应步骤。

10. 权利要求9的用途,其中预扩增反应步骤是多重预扩增反应步骤。

11. 权利要求9的用途,其中预扩增反应步骤是单重预扩增反应步骤。

12. 权利要求9的用途,其中预扩增反应步骤是在有利于突变EGFR核酸序列超过野生型EGFR核酸序列的预扩增的条件PCR条件下进行的。

13. 权利要求10或12的用途,其中多重预扩增反应包括EGFR的外显子19、EGFR的外显子20、EGFR的外显子21或其任何组合的野生型阻滞剂。

14. 权利要求13的用途,其中野生型阻滞剂是疏水性核酸、桥核酸、肽核酸、具有3'端终止子的寡核苷酸或其任何组合。

15. 权利要求1或2的用途,其中步骤(b)包括基于测序的检测技术、基于PCR的检测技术、基于下一代测序的检测技术或不含PCR的检测技术。

16. 权利要求15的用途,其中步骤(b)包括qPCR。

17. 权利要求16的用途,其中qPCR基于突变特异性扩增系统或突变-偏置扩增系统。

18. 权利要求17的用途,其中qPCR基于扩增阻碍突变系统ARMS。

19. 权利要求18的用途,其中ARMS qPCR步骤包括

包含修饰的核苷酸、碱基或序列的引物;

包含修饰的核苷酸、碱基或序列的探针;或

包含修饰的核苷酸、碱基或序列的引物和包含修饰的核苷酸的探针二者。

20. 权利要求19的用途,其中引物包含选自以下的碱基修饰:2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷和锁核酸(LNA),和在一个碱基处包含至少一个错配碱基以增加突变体特异性引物3'端的核酸相互作用,及其组合。

21. 权利要求1或2的用途,其中步骤(b)还包括检测一个或多个对照分子的表达水平。

22. 权利要求1或2的用途,其中相应的预先定义的截止阈值使用基于机器学习的建模、数据挖掘方法、统计分析或其任何组合来导出。

23. 权利要求1或2的用途,其中在提取的核酸中存在T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种被用于鉴定或预测患者对用抗-EGFR疗法治疗敏感还是抵抗。

24. 权利要求23的用途,其中抗-EGFR疗法包括用EGFR抑制剂治疗。

25. 权利要求1或2的用途,其中当检测到在提取的核酸中存在T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和一个或多个外显子19缺失的至少一种时,选择对受试者的治疗选项。

26. 权利要求25的用途,其中治疗选项是使用第二代或第三代酪氨酸激酶EGFR抑制剂或任何其它靶向T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的药物的治疗。

27. 权利要求1的用途,其中至少一种循环核酸包含坏死DNA、cfDNA或cfDNA与坏死DNA的组合。

28. 权利要求1的用途,其中至少一种外来体核酸包含外来体RNA、外来体DNA或外来体RNA与外来体DNA的组合。

## 使用外来体RNA和无细胞DNA检测血浆中的突变的方法和组合物

[0001] 本申请要求2016年11月30日提交的美国临时申请号62/428,059的权益,其内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含按ASCII格式以电子方式提交的序列表,其通过引用以其整体并入本文。在2017年11月17日创建的所述ASCII副本名为EXOS-029-001W0\_322142-2289\_SL.txt且为21,873字节大小。

### 技术领域

[0004] 本发明一般涉及生物标记分析领域,特别是从包括血浆样本在内的生物样品中确定基因组的变化。

### 背景技术

[0005] 对癌细胞中发生的遗传和表观遗传变化的越来越多的了解,提供一个通过分析肿瘤相关核酸序列和特征来检测、表征和监测肿瘤的机会。可以通过检测多种癌症相关生物标记中的任何一种来观察这些变化。各种分子诊断分析被用于检测这些生物标记并为患者、医生、临床医生和研究人员提供有价值的信息。到目前为止,这些分析主要是对源自手术切除的肿瘤组织或通过活检获得的组织的癌细胞进行的。

[0006] 然而,使用体液样品进行这些测试的能力通常比使用患者组织样品更合乎需要。使用体液样品的更少侵入方法在患者福利、进行纵向疾病监测的能力以及即使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。

[0007] 因此,对可靠地检测生物标记,例如血浆微泡中的生物标记,以帮助诊断、预后、监测、治疗选择以及与其它给定疾病或其它医学病症有关的其它领域的新的、微创的或非侵入性的方法,存在需要。

### 发明内容

[0008] 本发明属于生物技术的技术领域。更具体地说,本发明属于分子生物学的技术领域。

[0009] 在分子生物学中,可以从诸如血浆和其它生物流体的人类样品材料中分离分子,例如核酸,并且进一步用广泛范围的方法进行分析。

[0010] 人类生物流体含有细胞和由身体所有细胞脱落的无细胞来源的分子。来自无细胞来源的核酸包括来自细胞外囊泡(EV),和无细胞DNA(cfDNA),其很可能来自凋亡和坏死组织。小的外来体(即直径在30-200nm之间)是一类EV,其还包括凋亡小体和脱落微囊泡。作为癌症的生物标记,外来体和其它EV尤其令人感兴趣,因为它们是来自其来源细胞的遗传物质和蛋白质的稳定载体,但与来自垂死过程的凋亡小体不同,外来体通过所有的活细胞,包括肿瘤细胞,通过形成多囊体(MVB)或者从质膜中直接发芽,连续和主动地释放到生物流体

中。为了描述本发明,可以互换使用微囊、EV和外来体的单词。

[0011] 由于无细胞核酸例如包含在外来体和其它EV中的RNA (exoRNA)、包含在外来体和其它EV中的DNA (exoDNA) 和游离循环核酸 (DNA和RNA), 不仅由正常的体细胞,而且还由异常的癌细胞脱落,分析来自外来体和其它EV的核酸与来自人类生物流体样品的无细胞核酸的联合分离,可以揭示患者中癌细胞的存在和类型。

[0012] 非-小细胞肺癌 (NSCLC) 占有所有诊断的肺癌的~85%, 靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂疗法可用于其肿瘤中具有已知EGFR突变的患者。EGFR的外显子20上的T790M突变是获得对第一代EGFR抑制剂如吉非替尼、厄洛替尼 (erlotinib) 和其它与酪氨酸激酶结构域结合的分子 (如拉帕替尼 (lapatinib)、西妥昔单抗、帕尼单抗 (panitumumab)、凡德他尼 (vandetanib)、奈拉替尼 (neratinib) 和耐昔妥珠单抗 (necitumumab)) 耐药的主要机制。虽然这种基因改变也被发现于从未进行治疗的患者的肿瘤中,但大约60%对EGFR抑制剂治疗顽固的患者携带这种突变。因此,除了用作治疗前患者分层和第二代EGFR抑制剂如奥西替尼 (osimertinib) 的治疗结果的预测的生物标记,T790M还可用于监测耐药EGFR抑制剂的出现。

[0013] 由于发生频率高,EGFR内的其它基因组改变引起了很高的兴趣。例如,外显子21L858R突变在约43%的NSCLC EGFR变异的肺癌中存在,外显子19缺失和插入在49%的NSCLC EGFR变异的肺癌中存在。携带这些改变的患者是用TKI如吉非替尼和厄洛替尼治疗的候选者。

[0014] 从NSCLC获得组织活检是一项挑战,多达49%的患者没有用于EGFR分子分析的组织,因此监测作为液体活检的生物液体中的突变被证明是有用的。在本发明中,发明人将源自循环核酸或“循环NA”的垂死细胞过程 (如凋亡和坏死) 和源自EV衍生的核酸或“exoNA”的生活过程的信息组合。正因为如此,从相同体积的生物流体样品中共分离出exoNA和循环NA,导致了一种极为敏感的测定法。据了解,虽然本文提供的例子证明了exoNA和循环NA的共分离,但本文所提供的方法和试剂盒可用于共分离exoNA (例如,exoRNA和/或exoDNA) 和在生物流体样品中发现的任何DNA和RNA (例如cfDNA、坏死DNA或在样品中发现的任何其它循环DNA或RNA,包括通过富集不同部分 (如血小板) 而分离出来的那些) 的任何组合。

[0015] 患者中EGFR的外显子19、20和/或21的一个或多个的修饰的存在和数量,特别是EGFR中T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的存在和数量,可用于指导或选择治疗选项,以及监测疾病复发、分子残留病和其它应用。如本文所用的,“修饰”包括一个或多个碱基上的突变、一个或多个插入和一个或多个缺失。

[0016] 在这里,发明人描述了一种基于PCR的测定法对从人类生物液体中分离出的exoNA和循环NA的应用,该测定法检测EGFR中的T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失,具有高的灵敏性和特异性。

[0017] 本发明是一种涉及从样品提取到利用exoNA和循环NA的变异鉴定的完整工作流程的方法。本发明在预扩增反应中采用突变体富集策略以选择性地扩增突变体序列。在扩增阻碍突变检测系统 (ARMS) - 三重qPCR步骤中,突变特异性引物的另一个修饰包括修饰碱基的存在,例如2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄基、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤 (2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷和锁核酸 (LNA), 和

在一个碱基处包含至少一个错配碱基以增加突变体特异性引物的3'端的核酸相互作用。在某些实施方案中,至少一个错配碱基是突变体特异性引物的第四到最后一个碱基、倒数第三个碱基、倒数第二个碱基或最后一个碱基。将最先进的机器学习和数据挖掘技术应用于由实时PCR仪器生成的qPCR数据,以区分阳性和阴性样品或量化阳性或阴性样品的强度。

[0018] 本公开内容提供检测生物样品中的一个或多个生物标记的方法,以有助于对疾病例如癌症的诊断、预后、监测或治疗选择。本文提供的方法和试剂盒可用于检测来自血浆样品中的一个或多个生物标记。本文提供的方法和试剂盒可用于检测来自血浆样品的细胞外部分的一个或多个生物标记。

[0019] 本文提供的方法和试剂盒可用于检测生物样品中的表皮生长因子受体(EGFR)突变。在某些实施方案中,EGFR突变是EGFR中外显子19、20和/或21的一个或多个修饰,包括外显子20上的T790M突变。在某些实施方案中,EGFR突变是致敏突变和其它EGFR突变,例如,EGFR的外显子21中的L858R,一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失。

[0020] 本公开内容提供用于检测生物样品中的EGFR T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的方法和试剂盒。在某些实施方案中,生物样品是血浆。

[0021] 本公开内容提供一种反应,目的是捕获和浓缩EV,分离相应的核酸,使用定量PCR和其它基于PCR或无PCR的方法作为下游分析平台例如BEAMING或NGS同时检测循环NA和exoNA中的T790M、L858R突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的存在。

[0022] 一般来说,本公开内容的方法和试剂盒包括以下步骤:

[0023] 1) 从生物流体样品分离exoNA和循环NA:

[0024] a. 使外来体和其它EVs以及循环NA结合于IEX、尺寸排阻柱、珠和/或其它固体表面;

[0025] b. 采用裂解条件以及其它变性方法从基质中释放;

[0026] c. 用硅胶柱、珠和其它基于表面的方法从裂解液中分离总核酸;

[0027] 2) 分离的总exoNA,包括循环NA的逆转录(RT):

[0028] a. 利用单一的RT酶和寡核苷酸或它们的混合物合成第一链;

[0029] b. 使用一种抑制对照,外源RNA掺杂剂。

[0030] c. 使用其它对照(即阳性和阴性对照、提取对照等)。

[0031] 3) 完全分离的和逆转录的材料预扩增:

[0032] a. 利用对以下物质特异性的PCR的预扩增反应:

[0033] i. EGFR外显子20中的T790M和/或EGFR外显子21中的L858R,和/或EGFR外显子19中的一个或多个缺失和/或插入;

[0034] ii. 捕捉碎裂物质(从循环NA和碎裂exoNA)的小扩增子;

[0035] iii. 其它基因组位置的多重对照扩增;

[0036] iv. 抑制对照和其它对照(例如,提取对照);

[0037] v. 包含疏水性核酸和其它阻断技术以富集核酸分子的突变部分;

[0038] 4) 预扩增反应中T790M和/或L858R和/或一个或多个外显子19缺失和/或外显子19插入和对照扩增子的检测和定量:

[0039] a.一部分预扩增反应被用作多重qPCR反应的模板,用来检测T790M和/或L858R和/或一个或多个外显子19插入和/或外显子19缺失,和其它对照(例如,抑制对照、提取对照、野生型对照等)。

[0040] b.突变特异性引物在扩增阻碍突变检测系统(ARMS)-三重链qPCR步骤中的附加修饰的存在,例如2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷,和锁核酸(LNA's),和在其中一个碱基处包含至少一个错配碱基,以增加突变体特异性引物3'端的核酸相互作用。

[0041] c.除先前要求的以外,还包括了在突变特异性引物的碱基之一的额外错配。在某些实施方案中,至少一个错配碱基是突变体特异性引物的第四到最后一个、倒数第三个、倒数第二个或最后的碱基。

[0042] 在某些实施方案中,本文提供的方法对T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的检测和定量采用了进一步的操作和分析。在某些实施方案中,该方法还包括以下步骤:

[0043] 5) 机器-学习模型和统计学分析:

[0044] a.为了鉴别或量化患者的疾病结果,并将其推广到未见过的患者,对最先进的机器学习模型进行了k倍交叉验证的临床数据培训。

[0045] b.对于每个样品,使用几个特征从qPCR步骤中训练模型,例如,但不限于CT值、 $\Delta$ CT值、原始Rn值以及ROX归一化dRn值。

[0046] c.在每个交叉验证步骤中,使用内部优化步骤来寻找模型的最优参数。

[0047] d.引导(Bootstrapping)被用于重复步骤(a)-(c)n次,以导出对模型在不同训练测试分段上如何更好地执行时的稳定性估计。

[0048] e.发明人确定内部控制的各种边界条件,以便在样品分类之前为质量控制建立过滤器,以排除表现出虚假行为的样品。

[0049] 在某些实施方案中,本文描述的方法和试剂盒通过将胞外囊泡捕获到表面并随后溶解EV以释放其中包含的核酸,特别是但不排除RNA,来分离EV部分。

[0050] 先前用来从生物样品的EV部分分离和提取核酸的程序依赖于使用超速离心,例如,以小于10,000x g旋转1-3小时,然后除去上清液,洗涤沉淀,溶解沉淀并纯化核酸,例如,在柱上的RNA。这些以前的方法显示出一些缺点,例如缓慢、繁琐、受批次之间的可变性影响,且不适合于可量测性。在此所用的分离和提取方法克服了这些缺点并提供了一个用于分离和提取的基于自旋的柱,该柱是快速、可靠的且易于扩展到大容量。

[0051] 所述方法和试剂盒采用以下在PCT公布号WO 2016/007755和WO 2014/107571中描述的提取程序,从生物样品中分离和提取核酸,例如exoNA和无细胞NA,这些文献的每一篇的内容通过引用以其整体结合到本文中。简言之,EV部分被结合到膜过滤器上,清洗过滤器,然后,试剂被用来在膜上执行核酸的裂解和释放,例如RNA和cfDNA。然后执行提取,接着进行条件调整。然后核酸,例如exoNA和循环NA,结合于二氧化硅柱,洗涤,然后洗脱。

[0052] 在某些实施方案中,生物样品是体液。体液可以是受试者身体的任何地方(例如外周部位)分离出来的液体,包括但不限于,例如血液、血浆、血清、尿液、痰液、脊髓液、脑脊

液、胸腔积液、乳头抽吸液、淋巴液、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的液体、泪液、唾液、乳汁、来自淋巴系统的液体、精液、脑脊液、器官内系统液体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水及其组合。例如,体液是尿液、血清或脑脊液。

[0053] 本公开内容的方法和试剂盒适用于源自人类受试者中的样品。本公开内容的方法和试剂盒适用于源自非-人受试者的样品,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)。

[0054] 本文描述的方法为从EV中提取核酸作准备。在某些实施方案中,提取的核酸是RNA。提取的RNA可包括信使RNA、转移RNA、核糖体RNAs、小RNA(非蛋白质编码RNA、非信使RNA)、微RNAs、piRNAs、exRNAs、snRNAs和snoRNAs、循环RNA或其任何组合。

[0055] 在上述任何一种方法中,核酸都是从细胞外囊泡部分分离出来的,或者是从细胞外囊泡部分提取的。

[0056] 在上述任何一种方法中,核酸是无细胞核酸,在此也称为循环核酸。在某些实施方案中,无细胞核酸是DNA或RNA。

[0057] 在某些实施方案中,一个或多个对照颗粒或一个或多个核酸可在微囊分离和/或核酸提取之前加入到样品中,以用作评估微囊纯化和/或核酸提取的效率或质量的内部控制。在此描述的方法提供了有效的分离和对照核酸以及微囊部分。这些对照核酸包括来自Q-β噬菌体的一种或多种核酸、来自病毒颗粒的一种或多种核酸,或任何其它对照核酸(例如,至少一个对照靶基因),其可能是通过重组DNA技术自然发生或工程改造的。在某些实施方案中,对照核酸的数量在加入到样品中之前就是已知的。对照靶基因可使用实时PCR和/或任何其它基于PCR或无PCR的下游方法(例如液滴数字化PCR、OD测量等)定量。对照靶基因的定量可被用来决定细胞外囊泡纯化或核酸提取过程的效率或质量。

[0058] 在某些实施方案中,对照核酸是来自Q-β噬菌体的核酸,在此称为“Q-β对照核酸”。用于本文描述的方法的Q-β对照核酸可以是天然存在的病毒对照核酸,或可以是重组或基因改造的对照核酸。Q-β是光滑病毒科的成员,其特征是由编码四种病毒蛋白的3个基因组成的线性单链RNA基因组:外壳蛋白、成熟蛋白、裂解蛋白和RNA复制酶。当Q-β颗粒本身用作对照时,由于其大小与平均微囊相似,可以采用与本文所述用来分离EV的相同纯化方法从生物样品中很容易地纯化Q-β。此外,低复杂性的Q-β病毒单链基因结构有利于将其用作以扩增为基础的核酸分析的对照。Q-β颗粒包含要检测或测量的对照靶基因或对照靶序列,用于定量样品中Q-β颗粒的数量。例如,对照靶基因是Q-β外壳蛋白基因。当Q-β颗粒本身被用作对照时,在将Q-β颗粒加入到生物样品中之后,使用本文描述的提取方法,从Q-β颗粒中提取核酸和从生物样品中提取核酸。当来自Q-β的核酸,例如来自Q-β的RNA,被用作对照时,使用本文描述的提取方法提取Q-β核酸以及从生物样品提取核酸。Q-β对照靶基因的检测可通过RT-PCR分析法测定,例如,与所关注的生物标记(例如,T790M EGFR突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失,每一个单独或与一个或多个其它生物标记联合)同时进行。可以使用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颗粒的数量或检测到的拷贝数和Q-β核酸的添加量,例如Q-βRNA,以确定分离和/或提取过程的质量。

[0059] 在某些实施方案中,将10-10,000个拷贝,例如50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、1,000或5,000个拷贝的Q-β颗粒或Q-β核酸,例如Q-βRNA加入到体液样品中。



在某些实施方案中,100拷贝的Q-β颗粒或Q-β核酸,例如Q-βRNA被加入到体液样品中。当Q-β颗粒本身被用作对照时,Q-β颗粒的拷贝数可基于Q-β噬菌体感染靶细胞的能力来计算。因此,Q-β颗粒的拷贝数与Q-β噬菌体的菌落形成单位有关。

[0060] 在某些实施方案中,本文描述的方法和试剂盒包括一个或多个过程中对照。在某些实施方案中,过程中对照是指示血浆质量(即血浆样品质量的指标)的内部参考基因的检测和分析。在某些实施方案中,参考基因是血浆-固有的转录本。在某些实施方案中,参考基因(以及它们相应的可替换别名)选自EML4、RPL4、NDUFA1、β-肌动蛋白、EGFR的外显子7、ACADVL;PSEN1;ADSL;AGA;AGL;ALAD;ABCD1;ARSB;BCKDHB;BTD;CDK4;ERCC8;CLN3;CPOX;CST3;CSTB;DDB2;DLD;TOR1A;TAZ;EMD;ERCC3;ERCC5;ERCC6;ETFA;F8;FECH;FH;FXN;FUCA1;GAA;GALC;GALT;GBA;GBE1;GCDH;GPI;NR3C1;GSS;MSH6;GUSB;HADHA;HMBS;HMGCL;HPRT1;HPS1;SGSH;INSR;MEN1;MLH1;MSH2;MTM1;MTR;MUT;NAGLU;NF1;NF2;NPC1;OAT;OCRL;PCCA;PDHA1;PEPD;PEX12;PEX6;PEX7;PGK1;PHKA2;PHKB;PKD1;PLOD1;PMM2;CTSA;PPOX;PTEN;PTS;PEX2;PEX5;RB1;RPGR;ATXN1;ATXN7;STS;TCOF1;TPI1;TSC1;UROD;UROS;XPA;ALDH3A2;BLMH;CHM;TPP1;CYB5R3;ERCC2;EXT2;GM2A;HLCS;HSD17B1;HSD17B4;IFNGR1;KRT10;PAFAH1B1;NEU1;PAFAH2;PSEN2;RFX5;SOD1;STK11;SUOX;UBE3A;PEX1;APP;APRT;ARSA;ATRX;GALNS;GNAS;HEXA;HEXB;PCCB;PMS1;SMPD1;TAP2;TSC2;VHL;WRN;GPX1;SLC11A2;IFNAR1;GSR;ADH5;AHCY;ALDH2;ALDH9A1;BCKDHA;BLVRB;COMT;CRAT;CYP51A1;GART;GGCX;GRINA;GSTM4;GUK1;IGF2R;IMPDH2;NR3C2;NQO2;P4HA1;P4HB;PDHB;POLR2A;POLR2B;PRIM2;RPL4;RPL5;RPL6;RPL7A;RPL8;RPL11;RPL23;RPL19;RPL22;RPL23A;RPL17;RPL24;RPL26;RPL27;RPL30;RPL27A;RPL31;RPL32;RPL34;RPL35A;RPL37A;RPL36AL;ITSN1;PRKCSH;REEP3;NKIRAS2;TSR3;ZNF429;SMAD5;STX16;C16orf87;LSS;UBE2W;ATP2C1;HDGFRP2;UGP2;GRB10;GALK2;GGA1;TIMM50;MED8;ALKBH2;LYRM5;ZNF782;MAP3K15;MED11;C4orf3;RFWD2;TOMM5;C8orf82;PIM3;TTC3;PPARA;ATP5A1;ATP5C1;PLEKHA1;ATP5D;ATE1;USP16;EXOSC10;GMPR2;NT5C3;HCFC1R1;PUS1;ATP5G1;ECHDC1;ATP5G2;AFTPH;ANAPC11;ARL6IP4;LCLAT1;ATP5G3;CAPRIN2;ZFYVE27;MARCH8;EXOSC3;GOLGA7;NFU1;DNAJB12;SMC4;ZNF787;ZNF280D;BTBD7;THOC5;CBY1;PTRH1;TWISTNB;SMAD2;C11orf49;HMGXB4;UQCR10;SMAD1;MAD2L1BP;ZMAT5;BRPF1;ATP5J;RREB1;MTFP1;OSBPL8;ATP5J2;RECQL5;GLE1;ATP5H;STRADA;ERLIN2;NHP2L1;BICD2;ATP5S;HNRNPD;MED15;MANBAL;PARP3;OGDH;CAPNS1;NOMO2;ALG11;QS0X1;ZNF740;RNASEK;SREBF1;MAGED1;HNRNPL;DNM2;KDM2B;ZNF32;MTIF2;LRSAM1;YPEL2;NEURL4;SF3A1;MARCH2;PKP4;SF3B1;VPS54;NUMB;SUMO1;RYK;IP6K2;JMJD8;C3orf37;IP6K1;ERBB2IP;LRRC37A2;SIAH1;TSPAN17;MAPKAP1;WDR33;ARHGAP17;GTDC1;SLC25A25;WDR35;RPS6KA4;UHRF1BP1L;RPS4X;GOSR1;ALG8;SDCBP;KLHL5;ZNF182;ZNF37A;SCP2;ZNF484;L3MBTL3;DEPDC5;CACYPB;SPOP;METTL13;IFRD1;GEMIN7;EI24;RWDD1;TULP4;SMARCB1;LMBRD2;CSDE1;SS18;IRGQ;TFG;BUB3;CEPT1;COA5;CNOT4;TTC32;C18orf25;CISD2;CGGBP1;LAMTOR4;BCAP29;SLC41A3;SEPT2;TMEM64;MXI1;USP20;NUPL1;TPST2;PICALM;CCBL2;THAP7;TFIP11;C6orf1;PPP1CA;WDR89;ZNF121;FNIP1;C6orf226;CCT3;NIPA2;CUL4A;TCP1;STK16;RCHY1;CKAP5;RPS5;GEMIN2;CCT6A;PPP2CB;CCT7;VWA8;BRD9;KIAA0930;ZCCHC11;C12orf29;KIAA2018;VPS8;TMEM230;ANKRD16;SSBP3;ZNF655;C20orf194;FAM168B;DALRD3;SSBP4;KDM1A;RPS6;ZNF766;TTC7B;RNF187;IBA57;ERCC6L2;

RAP1A;TNK2;RAP1B;GLT8D1;SPRTN;ATP11C;HERPUD1;RPS7;PDLIM5;FYTTD1;SEPT7;  
CDK5RAP2;TRAPPC2;PCGF6;CHCHD7;OLA1;NAA30;ARHGEF10L;BTBD1;RPS8;MSL1;MCRS1;  
ZNF302;CTNNBIP1;DNAJC21;AKTIP;FOXP4;SEC61G;U2AF2;CCDC66;GOSR2;CTBP1;MYPOP;  
SLC3A2;DCTD;ABI1;CTU2;RGMB;COA6;UBE2NL;C16orf88;RPS9;CCNC;KRIT1;SEH1L;FXR1;  
AGPHD1;ALG10B;C2orf68;GDPGP1;PTRHD1;SRRD;EIF2AK4;MAD1L1;EXOC7;SLTM;CXorf40B;  
EXOC6;SUPT20H;AKT1;CUTA;DBNL;CARS;USP21;DDX19B;ETFB;EMC6;ILK;FAM96A;TM9SF1;  
ZNF638;MRPL22;RPS11;FAM13A;MPG;DNAJC25;TAF9;RPS13;RFFL;SP3;TMCC1;ZNF2;MAEA;  
GOPC;SIRT3;ERMAP;C14orf28;ZHX1;C2orf76;CCDC58;OS9;RAB28;VMA21;C5orf45;OPA3;  
RPS15;SORBS3;TPM1;CMC4;VPS13A;POLR3H;BRCC3;SERBP1;CORO1B;FPGS;VPS13C;NARG2;  
GCOM1;POLR2M;FAHD1;SERF2;NME1-NME2;NME2;NAE1;HAX1;RPS16;PUM1;RPS20;ZSCAN26;  
ZNF805;IQCB1;RPS21;GPHN;ARF1;TM2D2;CANX;KALRN;LIN52;LRRC24;ZNF688;TNRC6B;  
CD82;ZNF197;CBWD5;EXOC1;MINK1;YIPF5;BRMS1;ARPC4;RPS23;RPS14;ABCF1;CSNK1A1;  
ADAR;U2AF1;AP2M1;IRAK1;TAF5L;DUT;RAB12;ANO6;NDEL1;ARFIP1;CELF1;VRK3;FAM108B1;  
RPS24;RPS25;CCM2;TCAIM;KCTD21;C6orf120;PLEKHG1;GLTPD1;WDR45;ZFAT;ZNF16;  
METTL17;ZNF181;AP2B1;AP1G1;ARHGAP5;COX19;ZNF451;RAB24;CTNS;SRSF7;TP53BP2;  
PLAA;PLD3;ELP6;ERGIC1;TRMT11;CCDC90A;INF2;CRELD1;DHRS12;ZNF613;DNAJB14;DDX59;  
C19orf12;MRI1;YTHDC1;FDX1L;TMEM150A;TIPRL;CSNK1G3;CPT1A;KLF10;TMPO;NR2C1;  
UBE2V1;SLC35A2;ZNF174;ZNF207;STK24;MINOS1;ZNF226;PQBP1;LCMT1;HNRNPH2;USP48;  
RRM1;RPAIN;FBX07;TMEM259;CYFIP1;FAIM;GPR155;MTERFD3;AMD1;NGRN;PAIP2;SAR1B;  
WIPI2;CSTF1;BABAM1;PPM1B;PHF12;RHOT1;AMZ2;MYO19;ACOT9;BBS9;TRPT1;NOP2;TIAL1;  
UBA52;DMAP1;EIF2B4;NHP2;ITPRIPL2;RPL14;C18orf32;SRA1;UFD1L;VPS26A;BOLA3;SDHC;  
GTF3C2;HHLA3;EXOC4;AGAP1;FOXK1;ARL5A;GGPS1;EIF3B;THYN1;STAU1;USP14;RUFY3;  
GON4L;AGPAT3;SIL1;BTF3;PARL;EEF1B2;GATSL3;ZNF630;NPM1;NCKAP5L;HSD17B10;REV1;  
DIXDC1;SLC38A10;NARF;ALG13;ATP6V1E1;NDUFAF5;ATP6V0B;NPRL3;KIAA0317;ETNK1;  
DNAJB2;SEC14L1;CCNL2;PICK1;DPH2;USP9X;IAH1;CREBZF;PRMT5;ZMYM5;TIRAP;YIF1B;  
UNC45A;CHTF8;TYW5;SNAPC3;NBP10;SDCCAG3;DEDD;C4orf29;CDC42;OXLD1;GPX4;STRN4;  
FKRP;ZNF808;C19orf55;ZNF674;ZNF384;INTS6;MLLT4;TCERG1;ARL16;MAPK3;FAM133B;  
MOSPD3;MLH3;NRF1;PQLC2;CEP44;H2AFY;C16orf13;FAM63A;PAPD5;DCUN1D4;PRDM15;  
U2AF1L4;HAGH;COA3;YARS2;PHF11;ASB1;MTMR12;RUFY1;SIDT2;RHBDD2;ERAP1;EFTUD1;  
TMEM70;LINS;CRCP;ACP1;ZXDC;METTL21D;PPAN-P2RY11;INCENP;UEVLD;ABCE1;TROVE2;  
PGP;CEP63;PPP4R1;CEP170;ANKZF1;PSPC1;WHSC1;ZNF205;FAM98B;CAST;TRAPPC5;TMEM80;  
PSAP;SUMF2;ABHD12;ACBD5;ZNF565;GEMIN8;DLGAP4;SMIM8;ZNF706;COASY;MINA;AGAP3;  
SLC9A6;MAZ;NCBP2;ATPAF1;FEZ2;NSL1;SMC2;TATDN3;FRS2;EIF4G2;CHD2;ENGASE;CRTC3;  
SNUPN;POT1;TTC14;KDM5A;XRN1;PIGY;PARP2;NGDN;TRAK1;MFSD12;SHPRH;ZSWIM7;  
GTPBP10;SEC24B;STAG2;TPM3;MSMP;SMAP1;ZNF557;NET1;DPH3;MUTYH;PHACTR4;HIPK3;  
CLCC1;SCYL1;UBL5;TNFRSF1A;TOP2B;ACSS2;TMUB2;CLTA;UBTF;QSER1;CDC14B;ATG9A;  
SREK1;SENP7;SEC31A;SPPL2B;RNF214;SLC25A45;NCOR2;ZFYVE19;RBM23;POMT1;DPH5;  
IRF2BP2;PNKD;BCLAF1;HNRNPC;PHF16;TSEN34;PPCS;SLC39A7;MTMR14;UBXN2B;APH1A;  
WTH3DI;URGCP;AGAP6;ALG9;MIER1;SRSF1;FAM127B;CDC16;TMEM134;UBN1;TBCE;MED24;

FAM177A1;KTN1;PAICS;TRAPPC6B;HNRNPUL2;TMTC4;FNDC3A;KIAA1191;FKTN;TMEM183B;OCIAD1;CREBBP;TAX1BP1;BCS1L;CUL4B;KIAA1147;KIAA0146;U2SURP;ZNF629;UNK;FTO;WHAMM;SNED1;BEND3;GPR108;INTS1;ZNF697;PLEKHM3;USP45;USP6NL;ZNF823;TNRC18;RGP1;TMEM223;METTL23;SETD5;BAHCC1;UNC119B;MGA;C肌动蛋白;TMEM218;C15orf57;DNLZ;COMMD5;JMJD6;NXF1;THOC2;CPSF4;PRKDC;ZNF623;ACD;TCTN1;PIH1D2;C11orf57;ZGPAT;CHMP1A;ZNF133;CEP57L1;RABEP1;TMEM214;NAA60;TMEM219;EARS2;RB1CC1;ZBTB40;ANKRD12;STRN3;DNAAF2;WBP1L;THADA;PLOD3;DDT;DDTL;MZT2A;C11orf83;NADKD1;CTNND1;FOXN3;MAP1LC3B2;MYSM1;C17orf89;AAMP;UQCRHL;TRAPPC13;FAM195B;TXNRD1;ACLY;RPP38;ACO2;HNRNPF;CTNNB1;LIG4;COPA;ZBTB21;ZNF621;DLG1;GRSF1;CRTCL;ZNF419;CHCHD4;DDX17;SGSM2;HTATIP2;CDK10;BAG6;USP5;TMBIM6;C1orf43;PCBP2;TMEM251;JKAMP;AKT1S1;C12orf44;RPP14;FAM89B;BET1L;MID1IP1;FAM160A2;FAM210A;INO80C;ATXN7L3;ZNF862;CCDC43;ZNF506;TINF2;COMMD7;CCNK;KAT6A;POM121C;BCAS3;ULK3;ZNF30;MTFR1L;ZNF146;FTSJD1;RPL22L1;GXYLT1;PTAR1;HIGD1A;C8orf59;EIF5AL1;REPIN1;WDR83;C4orf33;SYS1;IKBK;C7orf25;SBN02;IMMT;TMEM192;PDS5A;SENP6;DROSHA;C19orf60;SPATS2L;RAP1GDS1;RC3H2;KIAA0232;KDELRL2;PLEKHB2;CENPN;ERLIN1;TMEM55B;MED7;PID1;MOB4;SLC9B1;PACS2;COMMD9;CXXC1;NRD1;ACOX3;PHF21A;FOXRED2;SIKE1;HNRNPR;TTI2;PCTP;ALPK1;ZFAND5;TBC1D8;PPAPDC1B;IFT43;SNX18;ZNF160;TUBGCP5;ZNF554;OTUD4;PSMA4;RRAS2;GIGYF2;RPP30;FAM118A;PCMTD2;ACVR1;FBR5;TMEM177;RUSC1;ASH2L;CORO1C;ARMC5;ZFYVE16;FAM135A;ZNF142;MYBBP1A;ZBTB10;UBE4B;KIF13A;NUDT19;FBX045;NUDT7;HECTD4;ZNF250;C6orf136;ADAM10;TMEM87A;SLC35E2B;MECP2;NAA16;SUPT5H;UBE2K;DDX54;TLK2;ZSCAN30;FAM208A;FPGT-TNNI3K;BRD2;NACA;ECE1;TBC1D14;FANCI;FGGY;C17orf51;SEPT9;ARHGEF7;METTL15;ENTPD6;CDC27;THUMPD3;LSM14A;C17orf85;ELK1;NBEAL1;AEBP2;IRAK4;MTRF1L;CLCN7;PAPD4;DHX36;SZRD1;JMJD7;PLA2G4B;FANCL;LIN54;KANSL3;WDR26;GDI2;ADD1;LAMP2;HCCS;CCBL1;ABCD3;MICAL3;SET;GTF3C5;TTC13;NCOA7;BSCL2;BCKDK;SMEK2;ADK;ARIH2OS;MT01;ZBTB1;PPP6C;PARK7;BCOR;ADPRH;HDGF;CASK;OSGIN2;POLG;THTPA;AP1B1;PIGG;CFLAR;CNBP;PCID2;HMOX2;SMARCA1;ACSF3;POLD2;AURKAIP1;AUTS2;GPBP1;LRRC8A;TMEM129;UBAP2L;CBX5;MAD2L2;MED18;ZNF84;C14orf2;TSEN15;METTL21A;ERLEC1;CRY2;CRLS1;PAN2;SPRYD7;ASAHI;ING4;NMRK1;PEX26;MFN2;ATXN3;TMEM14B;STXBP5;SPG21;CEACAM19;AP4S1;RWDD3;TFRC;ORMDL1;VPS53;UBP1;NUDCD1;KCTD6;VGLL4;ZNF717;SLC39A13;DIS3;GNE;TPRN;LYRM1;LACC1;AP1AR;SMARCA1;PSMG4;MAPKB1;USP8;NUDT22;REPS1;LUZP6;DCAKD;SMARCA4;SRRT;GTPBP3;TOMM40;MARK3;INPP1;ENTPD4;NSDHL;TEX264;DNAJC2;KRBOX4;SYCE1L;KIAA1841;AES;GSPT1;ATP6V0A1;ZNF680;CLK3;ZNF562;SHC1;TBCEL;ATF7;MYO9B;EPN1;KARS;COL4A3BP;HSPBP1;FAM108A1;RFC5;SMARCC2;SPTAN1;SRP9;HRAS;SSFA2;HAUS2;THAP5;VRK2;ZNF195;AP1M1;SPAG9;CALU;EIF4E;STYX;C14orf93;LSM5;PSMB5;CCDC149;DNMT1;RTCA;AIFM1;CAB39;PPIP5K1;PWWP2A;SUGT1;ZNF720;TGFB1;MEF2A;C7orf73;PLCD1;SUN1;HYOU1;FAM58A;PTPN12;SATB1;CIZ1;ATG10;ZCCHC9;SAP30L;ACP2;TMEM106B;EIF2AK1;PSMG3;MAP4;LRRFIP2;NT5C2;CCNJ;TBC1D5;IQSEC1;ZDHHC4;C7orf50;TBCCD1;CDV3;AZI2;C3orf58;GSE1;PARN;HS2ST1;TOMM6;TRMT10A;DERL1;FAM204A;DEK;ARFRP1;IPO11;

CCDC152;FIP1L1;ELMOD3;PDHX;MFAP3;DCTN1;MAPK9;FAM160B1;FNDC3B;CRELD2;DNAJA3;NEDD1;ZNF397;ZDHHC3;AGFG1;FKBP2;GIT2;TAF12;LDHA;RBBP4;MKNK1;HDHD1;C12orf73;SMIM13;C5orf24;GDAP2;RPS27A;PPP1R21;PIP5K1A;INPP5K;DCTN4;FAM53C;PTPRK;EEF1E1;EIF2AK2;XPR1;MSRA;ATL2;C8orf40;VDAC3;YHAZ;HMBX1;NEIL2;ECD;RPN2;SPATA2;FDPS;RNF185;PHPT1;METTL20;SLC46A3;KIAA1432;MADD;URM1;UCK1;NDUFB11;RUSC2;ABL2;ATG7;PUF60;TRMT1;NIF3L1;CPSF7;PTGES3L-AARSD1;TMUB1;TPRA1;R3HCC1;FBXO28;FAM178A;RPL28;RPS6KC1;CMPK1;ATF6B;ZNF507;OTUD5;FASTKD2;TNPO2;FZR1;ISOC2;CCDC124;RCOR3;SEC13;SGMS2;ATXN7L3B;AKIRIN1;ANP32E;CISD3;ACAD10;APOL1;LYSMD1;TLK1;GPR107;LANCL1;LRRFIP1;MCTS1;ANAPC5;MEMO1;POLR1B;ANAPC7;ILF3;ATXN1L;BCAP31;TTLL11;CNST;TBL1X;TRAF3IP1;PRKRA;DAXX;ATP13A2;TP53BP1;RAB11FIP3;CLASP1;APLP2;RNASEH2B;ARCN1;SMC6;EMC8;MGRN1;LMAN2L;ARFGAP3;SQSTM1;GTF2H1;TXNL4B;DMTF1;THOC6;PPP3CB;ALG5;PNPLA4;CTIF;CD164;AIMP1;MORF4L2;MGEA5;EDC3;SPNS1;DKC1;ECSIT;C6orf203;INTS12;FLYWCH2;MON1A;SLC35B3;ADCK1;RPUSD3;ADCK4;RRNAD1;RAD51D;ZNF669;NFYC;ITPK1;CLP1;KIAA0141;EFTUD2;ULK2;EHBP1;TGFBRAP1;GHDC;TNRC6C;FBRSL1;SAR1A;HNRPLL;ATG13;CHID1;ERI2;C1orf122;IL11RA;C17orf49;EYS;API5;DAGLB;MPC2;GSTK1;DIS3L;EIF5A;ZNF438;CTDNEP1;SLC25A39;PPHLN1;TPCN1;ZBTB14;MAPRE2;NFRKB;TMEM106C;TCHP;WIBG;COPS2;BSDC1;C12orf65;TRAFFD1;LOC729020;C15orf61;PSMA1;LEMD2;TMEM30A;C2orf74;TBC1D7;CDYL;TCTN3;PTPMT1;BANF1;WRAP53;AMFR;AGAP5;CTPS2;TMX2;NAT10;COPB1;UBAC2;DET1;DNAJC7;CD58;DENND4A;PHB2;IMPA1;SMCR7;C11orf95;MYL12B;DTWD1;NFKBIL1;MTHFD2L;ZNF814;CCDC85C;ITGAV;COG2;GPN1;SLC44A2;USP27X;COG6;ZNF619;SKIL;RRP12;MKRN1;AKD1;RELA;VPS37A;HBS1L;INTS9;DOHH;PRMT3;KIAA1671;LAMTOR2;SLC35C1;FAM185A;NGLY1;ETV3;DSN1;ZNF566;ZNF576;KDM8;IPP;MKLN1;CBWD1;SIN3A;ABHD11;ZNF652;OXSM;TSEN2;TEF;NONO;NFE2L2;SETDB1;TMEM205;C4orf52;PGAP2;SCAF4;SPECC1L;EHMT1;TCP11L1;RBM17;ZDHHC7;KIAA0226;GLG1;SAE1;HOMER3;XPC;MEF2BNB;SH2B1;MTFR1;SARS2;SCAPER;SLC12A4;RDH13;TJAP1;FCHO2;HSDL1;TDRD3;RPAP3;FAN1;PARP9;DIP2A;GSK3B;MOGS;TATDN1;ZNF414;ZNF407;TBC1D15;WRB;PIP4K2C;TCF7L2;SRP54;LEPRE1;C1orf86;PQLC1;KDM3A;KDM4C;RBM19;KDM5C;SLC25A5;ANXA4;SCOC;ANXA6;ANXA7;ANXA11;MTHFSD;BIVM;BOD1;SYNCRIP;PLBD2;BUD13;RIOK2;CANT1;MPND;EBNA1BP2;EVI5L;EPS15;TXNDC16;ACOT13;C15orf40;RNF170;SPG11;SETD6;SETDB2;TRAPPC9;POLR3B;NUDT2;ARMC10;CHFR;NPTN;NDFIP2;JMJD4;WDR25;COG5;TNIP2;RBM34;TEX10;DUS3L;PPP2R5C;CLK1;PDCD6IP;TMEM189;RBMXL1;COX11;TYW3;RPTOR;HTATSF1;EWSR1;FBXL17;RAB2B;ZSCAN12;ZNF580;MYEOV2;TBCK;ZNF746;DCAF11;DCAF4;GTF2I;WDR81;KCNMB3;C10orf2;COPS7A;CHAMP1;PPP6R3;GPR75-ASB3;PLIN3;DHX16;C1orf27;WDR46;TRAF3IP2;FLNB;BRD8;THAP4;GPN3;STAU2;MTF2;TMED7-TICAM2;EIF4ENIF1;C16orf52;ASXL1;ENDOV;ZFHX3;BCAT2;SLC25A26;RBMX;PET117;ACIN1;DCAF17;SMIM12;LYRM4;TMEM41B;DTYMK;TMEM14C;NFKB1;SLC25A11;CD320;MKS1;DAG1;STARD3;IDE;ELAC2;BIRC2;ECI2;ERCC1;NDUFV1;TADA2A;PNPLA6;RBM28;LCORL;NDUFS2;UTP14A;CEP120;C22orf39;FHIT;MTIF3;HAUS4;DHX40;PIGX;SHMT2;HDAC8;WDR13;MPP1;SLC16A1;EIF2B3;FAM122B;TRAPPC1;AFF1;FAM104B;XIAP;RBM6;XPNPEP1;RAB35;RHBDD1;LEMD3;ATXN10;LPP;

VAR2;SMYD3;TMED5;NSMCE4A;ATP5SL;LHPP;ANKRD50;TIMM17B;TRMT2B;TBC1D17;NDUFB4;ME2;NSUN5;CUL7;SLC35A1;TSPAN3;ARMCX5;CNDP2;TMEM48;IFT46;TXLNG;TMEM135;FAM21C;SCO2;STIM2;TJP2;CDK16;CDK17;ATAD3A;PGAM5;CXorf56;CHD8;FUS;LPPR2;SRGAP2;LAS1L;ZNHIT6;MIB2;GPR137;PIN4;LCOR;MFSD5;ATRAID;ZFAND1;LARP4;RBM41;SMPD4;UBXN6;FAM3A;STRBP;PET100;CAMTA2;UBAP1;MCFD2;TRIQK;PAPD7;PPARD;FGFR10P2;VPRBP;NUDT16;CXorf40A;KXD1;RBFA;SETD9;MASTL;VANGL1;BAG1;RAB3GAP1;RRM2B;GOLGA3;MCPH1;NEO1;TECPR2;TK2;RAB40C;ZNF668;ZNF347;ZNF764;ZNF641;TSFM;PPARGC1B;SLC38A6;GGA3;GOLGA4;SEC23B;DPY19L3;ZNF555;YTHDF2;TFCP2;AAAS;CRBN;NKRF;MRRF;DGCR2;BANP;BRD7;SMG7;POLL;NCOA3;PCBP4;ZBED6;ARL13B;RABEPK;SAMD8;ARL1;ABHD16A;PPP2R2A;SUCLG2;CINP;RIF1;IFT27;KLF11;RANGRF;SRPR;SYCP3;MNAT1;ECI1;SF1;ZC4H2;ZFX;SYNJ2;MINPP1;SUFU;ATP6AP1;ATR;HADH;TIPARP;PIGT;CTTN;ZBTB33;PAFAH1B2;ZNF408;UHMK1;VDAC2;PEX11B;ESYT1;TMLHE;UBR2;CD99L2;GNL3L;PRMT7;KLHDC4;FLAD1;FBXL20;WDR44;PACSIN2;UQCC;NDUFS5;WINK1;NDUFC1;KIAA0430;RNF4;NCAPH2;NDUFA2;ZDHHC8;ACOX1;ZCCHC6;ZNF75D;FMR1;ARHGDI1;NIT1;MYNN;PFDN6;BAK1;DNAJC19;C1D;ATG16L1;FBXO11;DGCR8;TAF6;NCOR1;IKBKB;ZNF317;NCK1;DHX35;SMAD7;MRPS35;ORC4;HYI;FAM193B;ZMYM2;YAF2;IL6ST;SRSF11;SLC33A1;IPO8;ARPC1A;BCL2L1;GSTO1;SRSF10;CTCF;TNPO3;PSMD1;SIRT5;EML2;MSL3;RBBP5;SIRT6;SIRT2;TMEM127;VIPAS39;C9orf3;MRPS18A;NUP62;EXD2;DID1;NDUFA11;UCKL1;PPP2R4;DDX3X;NSUN2;KANS1;LIMS1;SLC1A4;REST;TTC27;SLC30A6;CHMP3;FAM65A;SCRN3;NEK4;FBXL5;ENY2;TUBD1;DHRS4L2;PEX19;POGZ;EIF4G1;MATR3;MEPCE;MR1;PPIE;TMEM184B;ANKRD28;PTP4A2;COG4;NASP;CCDC107;YIPF6;DENND1B;APTX;SERPINB6;USB1;RAB9A;SRSF2;MICU1;CHMP5;CLINT1;CAMTA1;DICER1;SEPHS1;ZNF865;TOPORS;MLLT10;VAPB;THAP3;HSDL2;ANKHD1;ZFP91;MLL;GCLC;IRF3;BCL2L2-PABPN1;KIF16B;MARK4;GLRX3;B4GALT3;HYPK;PDK2;PGM3;SIAE;SESN1;DOPEY1;SH3GL1;NDUFB5;UQCRB;NDUFB6;GCFC2;SAFB;HMGN3;RNF14;RNF7;ZNF778;GORASP2;ZNF513;C18orf21;EIF2D;CORO7-PAM16;PIGO;RBM15;PLRG1;SEC22C;ASB3;ASB6;AKR1A1;TRMT1L;PRDX1;C10orf137;ZMYND11;RPS10-NUDT3;UBE2E1;HSPE1-MOB4;UBE2G2;UBE2H;CTDP1;CUX1;SYNJ2BP-COX16;PIGV;CHURC1-FNTB;WBSCR22;MTA1;NDUFC2-KCTD14;IL17RC;NDUFC2;COMMD3-BMI1;CHURC1;UBE4A;COX16;PPT2;MBD1;SPHK2;MDM4;ZHX1-C8ORF76;SRP19;ZNF670;SCARB2;PPP5C;ZNF664;PRPS1;BIVM-ERCC5;CCPG1;PSMC2;RBAK;RBM10;EIF4A1;RBAK-LOC389458;KIFAP3;RFC1;ZNF587;LIPT1;ANO10;TNFAIP8L2-SCNM1;SCNM1;

TCEB1;URGCP-MRPS24;NPEPL1;BAG4;ISY1-RAB43;BNIP1;TTF1;KLF9;USMG5;MAVS;CAPZB;POLR1D;CHTOP;AKIP1;SH3GLB1;IGSF8;PRKAG1;NSFL1C;GTF3C3;ARID4B;MAP2K5;KAT5;RAB11A;TGOLN2;STRADB;FAM115A;DHPS;HNRPD;PTPN2;M6PR;RNF40;PRMT1;ATRN;BACE1;VWA9;BZW1;C1QBP;ZNF48;CAMK2D;CASP6;CASP7;CASP9;CCNT1;CCNT2;PITRM1;ATAD2B;ODF2;ANAPC13;TWF1;WDR20;PIK3R1;EIF1AD;ZSWIM8;MIF4GD;MFSD11;NCOA6;ANAPC16;MAP4K4;RIN2;TMEM147;RBM39;RAB2A;AHCYL1;LOC100289561;ZNF691;TRIM26;BRF1;NUP93;ZNF322;ZNF790;DEF8;RNF41;ARFGAP2;AP2A2;RNF146;ARFIP2;ELP2;CARKD;ZBTB17;ZKSCAN3;PPP6R2;AKAP1;MPPE1;ASCC2;ZFAND6;EIF3L;ZNF410;SNX1;AKT2;PLD2;NFKBIB;PDE8A;TAF1C;PIM1;INPP5F;HIP1;RANBP6;PES1;NARS2;TIGD6;HINFP;NUB1;CLCN3;GLRX2;CLEC16A;PDIK1L;MTMR2;CD2BP2;GFOD2;LETMD1;RAB6A;SETMAR;LAMTOR3;RGL2;C7orf49;POMGNT1;BTF3L4;CEP57;SMUG1;CHST12;TOB1;TRA2B;TPD52L2;HDLBP;PRPSAP2;PPP3CC;KIAA0586;APEX1;HBP1;TRRAP;C7orf55-LUC7L2;LUC7L2;IMMP2L;CHMP2B;STX5;GFPT1;RAD23B;TMEM126A;FOXP1;DLST;PRPF4;TXN;PPP1CC;SEL1L;CTAGE5;ASAP1;TRIM3;NUDT9;SP1;USP4;ASPSCR1;APPL2;SLC30A5;PAPOLA;RAB5B;RAB5C;TAOK2;PCMT1;USP15;AP4E1;LSM4;GEMIN5;SEC24A;CEBPG;NT5C;TNIP1;URI1;ACSS1;BBS4;CDC5L;RPL15;ZNF444;SLC52A2;GMD5;AP4B1;YME1L1;UXS1;MED27;TBC1D1;CYB5D2;CREB3L4;PNPLA8;PSMC3IP;PIK3CB;ANKRD26;C9orf72;ATF2;NAA10;TRIM65;CERS6;ARL8A;CSE1L;TMC01;ZNF620;ANKRD11;SNX12;ARAF;ETS2;STK3;PTGES2;CHD1L;UBE2L3;MCMBP;LRRC39;NOL8;ELOVL1;SLMO2;KDM2A;LRRC42;RAB18;CPSF3L;KAT6B;WDR92;GOLGB1;MAN2C1;SSBP1;C9orf69;SLC25A1;NOP16;PCGF5;MPP5;PPFIBP2;RPL10;C1orf85;TUBGCP2;R3HCC1L;NR1H2;FAM193A;DPP3;STOML1;KIAA0391;CSNK2A3;PRDM11;ANAPC10;CCT4;USP39;CNOT10;TMEM161A;GAPDH;RIT1;PAF1;SMG6;LOC100862671;POLD1;BTRC;RNF34;SRI;DDX21;CLCN6;CCDC51;FBXW7;NDUFB3;COX14;ITCH;DDX56;POM121;DDX6;CUL3;DIS3L2;HNRNPH1;SCFD1;ABCG2;CD63;TRMT2A;CCDC132;ANKFY1;COPS4;SERINC4;POLR3E;HARS;MIS12;NDUFA12;SPATA20;IDH3B;FAM173B;SMS;TARS;FBXO18;FASTK;CDK8;WDR4;ZNF155;SLC9A8;RDX;SRP68;CDK9;CALCOCO2;NOL10;PSMD9;TSN;SFSWAP;DCTN2;LPIN1;AARSD1;ADAM15;NSRP1;PDPK1;AP3D1;TBRG4;BRE;MORF4L1;CNOT1;MZF1;LARP7;ARMC8;PSME3;SNX17;PEMT;PDCD6;EIF3C;TOR1AIP1;UBOX5;FAM189B;ITPA;SRP72;CCDC61;ARSG;ING1;IFT20;AMBRA1;PAAF1;ILF2;EIF6;SLC12A9;ZNF839;CLOCK;SLIRP;HSD11B1L;SHOC2;CHD1;TMEM254;ANKRD46;FAM73A;RXRB;MAP4K3;PSMD5;CDK2AP1;UBE3B;WWP2;MCM3;PPP2R5D;PSMB6;PSMD11;CAMKK2;TAF11;RPL13A;LATS1;DAAM1;MED23;STOM;RNF111;WTAP;MED4;JOSD2;MARCH6;MCU;ARHGAP12;BCL2L13;NTAN1;STRIP1;TFAM;MEAF6;HAUS6;TRAPPC6A;TRAPPC3;UCHL3;NOSIP;IST1;ZFAND2B;MAX;VPS72;PCED1A;RAP2C;FAM173A;TTC19;EMC1;C21orf2;PEX11A;DNAJC10;LOC100129361;PPME1;HERC3;STX10;PPP1R12C;RQCD1;ZNF138;MTCH1;NSA2;LOC441155;PYCR2;SLC35A3;ABCB7;MKRN2;FBXO38;COPZ1;APEX2;AP3B1;PSMD6;DYNC1I2;MED21;DCLRE1A;PRELID1;RSRC1;RCN2;IKZF5;ZNF700;CDK2AP2;RRAGC;GTF2H3;AAR2;CUEDC1;KHDRBS1;AAGAB;TARS2;SEC11A;CEP164;RMND1;MEGF8;SLC39A1;HSP90AB1;STK25;PUS3;RAB4A;DOCK7;EPC1;LRRC14;RPS6KB1;TRAP1;C16orf91;MRFAP1;SHISA5;ABHD10;QARS;USP10;STX4;CHD4;WDR33;MBD4;PPP1R3E;YOD1;C18orf8;

USF1;ESF1;UNKL;SEC16A;KPNB1;ELF2;LONP1;CHUK;CIRBP;TBCB;AP1S1;AP3S1;CLNS1A;CLPTM1;CREBL2;MAPK14;CSNK1G2;CSNK2B;CSTF3;CTS0;CTS2;DAD1;DGKQ;DARS;DHX9;DHX15;DECR1;DNASE2;DYNC1H1;DPAGT1;DPH1;DRG2;DYRK1A;ECH1;EEF1G;EIF2B1;EIF2S3;EIF4B;ELAVL1;ENO1;EP300;FBL;EXTL3;XRCC6;BLOC1S1;GDI1;GTF2B;GTF2H4;GTF3C1;HDAC2;HSBP1;DNAJA1;NDST1;ICT1;IL13RA1;ING2;INPPL1;EIF3E;AARS;ACVR2A;PARP1;AKR1B1;APEH;TRIM23;ARF4;ARF5;ARF6;RHOA;ARVCF;ATF4;ATP5B;ATP5F1;ATP6V1C1;ATP50;AUH;POLR3D;BPGM;BSG;CAT;CBFB;CDK7;CENPB;CENPC1;CLTB;SLC31A1;COX4I1;COX5B;COX6B1;COX7A2;COX7C;CSNK1D;CSNK2A1;CTNNA1;CTPS1;CTSB;CTSD;CYC1;DBT;DDB1;DLAT;DR1;DUSP7;E2F4;EEF2;EIF5;ELK4;STX2;ESD;ETV6;EYA3;FAU;FKBP3;FKBP4;FNTA;FNTB;FTH1;KDSR;GAB1;GABPB1;GARS;GCLM;GNAQ;GNB1;GNS;GOLGA1;GOT2;GTF2E2;GTF2F1;GTF3A;H2AFX;H2AFZ;HTT;HIVEP1;HMGB1;HNRNPA1;HNRNPA2B1;HNRNPK;HSPA4;HSPD1;HSPE1;IARS;ID2;ID3;ACO1;IRF2;ITGAE;ITGB1;ITPR2;JAK1;KPNA1;KPNA3;KPNA4;TNPO1;IPO5;LIG3;LRP1;LRP3;LRP6;LRPAP1;MAGOH;MAN2A1;CD46;MDM2;MAP3K3;MGAT2;MGMT;MIF;MAP3K11;MPI;MPV17;MSH3;MAP3K10;MTAP;MTRR;MTX1;MVD;NUBP1;NBN;NCBP1;NDUFA4;NDUFA6;NDUFS4;NDUFS8;NFX1;NFYA;NME3;NRAS;NTHL1;NUP88;NVL;TBC1D25;OAZ2;ODC1;OGG1;ORC5;OSBP;PEBP1;FURIN;PAK2;PBX2;PCNA;PDE6D;PER1;PEX10;PEX13;PFDN1;PFDN4;PFDN5;PFKL;PHB;SLC25A3;PHF1;PIGA;PIGC;PIGF;PIK3C2A;PIK3C3;PI4KA;PMM1;PNN;POLA2;POLR2E;POLR2G;PPAT;PPP1R7;PPP1R8;PPP1R10;PPP2CA;PPP4C;PREP;PRKACA;PRKCI;MAPK1;MAPK6;MAPK7;MAPK8;MAP2K1;MAP2K3;PRPSAP1;PSMA2;PSMA3;PSMA6;PSMA7;PSMB1;PSMB3;PSMB4;PSMB7;PSMC1;PSMC3;PSMC6;PSMD2;PSMD3;PSMD4;PSMD7;PSMD8;PSMD10;PSMD12;PSMD13;PSME2;PTBP1;PTPN1;PTPN11;PTPRA;RAD1;RAD17;RAD51C;RAF1;RALB;RANBP1;RANGAP1;RARS;RASA1;ARID4A;RCN1;NELFE;RECQL;UPF1;REV3L;RFC2;RFC4;RFNG;RFX1;RGS12;RING1;RNASEH1;RNH1;RORA;RPA1;RPA2;RPA3;MRPL12;RPN1;RXRA;SBF1;ATXN2;SDHB;SDHD;MAP2K4;SRSF3;SGTA;SKI;SMARCA2;SMARCC1;SMARCD1;SMARCE1;SNAPC1;SNAPC4;SNRNP70;SNRPB;SNRPB2;SNRPC;SNRPE;SNRPF;SNRPG;SNX2;SP2;UAP1;SPG7;SPTBN1;SRM;SRP14;SRPK1;SSB;SSR1;SSR2;SSRP1;STAT3;STIM1;STRN;SUPT4H1;SUPT6H;SUPV3L1;SURF1;SUV39H1;ADAM17;TAF2;TAF4;MAP3K7;TAPBP;TBCC;TCEB3;TCF12;TDG;TERF1;THOP1;SEC62;TRAPPC10;TOP1;TPP2;TPR;TPT1;NR2C2;TSPYL1;TSSC1;TSTA3;TTC1;TUFM;HIRA;TYK2;UBA1;UBE2A;UBE2B;UBE2D2;UBE2D3;UBE2G1;UBE2I;UBE2N;UBE2V2;UNG;UQCRC1;UQCRC2;USF2;UVRAG;VBP1;VDAC1;XP01;XRCC4;YY1;YWHAB;ZNF7;ZNF35;ZNF45;ZNF76;ZNF91;ZNF131;ZNF134;ZKSCAN1;ZNF140;ZNF143;ZNF189;ZNF202;USP7;STAM;CUL5;MLL2;TAF15;NRIP1;TMEM187;AXIN1;HIST1H2BC;PIP4K2B;ULK1;EEA1;ANXA9;STX7;VAPA;ZNF282;DUSP11;CUL1;TTF2;SMARCA5;OFD1;PPM1D;RANBP3;PPFIA1;PARG;NDST2;IKBKAP;HAT1;DGKE;CAMK1;AGPS;BLZF1;MAPKAPK5;PRPF18;DEGS1;DENR;YARS;RRP1;KHSRP;AKR7A2;NOP14;RUVBL1;USO1;CDK13;RFXANK;SSNA1;NCOA1;TNKS;EIF3A;EIF3D;EIF3F;EIF3G;EIF3H;EIF3I;EIF3J;BECN1;MRPL40;B4GALT4;MBTPS1;EDF1;CTSF;SNX4;SNX3;EED;RNMT;RNGTT;GPAA1;RIPK1;CRADD;TNFSF12;ADAM9;CDS2;RIPK2;FADD;SNAP23;NAPG;NAPA;MTMR1;RIOK3;TNFRSF10B;DYRK4;SUCLG1;SUCLA2;CREG1;TRIM24;DPM1;DCAF5;DPM2;SAP30;CES2;TMEM11;HDAC3;KAT2B;SGPL1;FUBP1;ZNF259;MCM3AP;EIF2B5;EIF2S2;CPNE3;BUD31;

PRPF4B; TIMELESS; HERC1; MBD3; MBD2; ST13; FUBP3; TOP3B; WASL; ATP6V0E1; SLC25A14; RPS6KB2; RNF8; UBA3; UBE2M; BTAF1; AIP; CLK2; RHOB; ATIC; ATOX1; BYSL; CCNG1; CDKN1B; AP2S1; COX8A; CRY1; CS; TIMM8A; DUSP3; ECHS1; EIF2S1; EIF4EBP2; FDX1; FEN1; GMFB; GPS1; GTF2F2; HSPA9; IDH3G; IREB2; NDUFB7; NINJ1; OAZ1; PRKAR2A; RAB1A; RAB5A; SDHA; SNRPD3; TARBP2; UXT; PIGQ; FIBP; EBAG9; RAB11B; UBE2L6; MFHAS1; CYTH2; MED14; SOCS6; ZNF235; TRIP12; TRIP11; JMJD1C; MED17; MED20; PIGL; PMPCB; GTPBP1; NFE2L3; MTRF1; ACTL6A; ACVR1B; ARHGAP1; ARL3; ASNA1; BAD; BCL9; BNIP2; BPHL; BRAF; PTTG1IP; CAD; CALR; CASP3; CD81; CDC34; COX6C; COX15; CREB1; CTBS; DDX5; DDX10; DFFA; RCAN1; DVL2; DVL3; E4F1; PHC2; ENDOG; ENSA; EPRS; ERH; ESRRRA; ACSL3; ACSL4; BPTF; FARSA; FDFT1; FLOT2; FRG1; GALNT2; GOLGA2; GPS2; ARHGAP35; GTF2A2; HNRNPAB; HNRNPU; HUS1; IDI1; FOXK2; MGST3; MOCS2; NARS; NDUFA1; NDUFA3; NDUFA10; NDUFB1; NDUFB2; NDUFB10; NDUFS3; NDUFS6; NFATC3; YBX1; PARK2; PET112; PEX14; PIGH; PSPH; RABGGTA; RABGGTB; RPS6KA3; SCO1; SNRPA; SNRPD2; SREBF2; TAF1; TBCA; TOP3A; TRAF6; TTC4; RAB7A; PRRC2A; DDX39B; PABPN1; C21orf33; BAP1; CDC23; HERC2; PIAS2; MTMR6; MTMR4; ATP6V0D1; PRPF3; FAM50A; RRP9; PRKRIR; ATG12; PDCD5; HGS; NEMF; PCSK7; COX7A2L; SCAF11; AP4M1; ZW10; ETF1; MTA2; NOLC1; MAPKAPK2; ITGB1BP1; COPB2; ZNHIT3; MED1; B4GALT5; CNOT8; VAMP3; SNAP29; TXNL1; PPIG; KIF3B; TM9SF2; CIAO1; POLR2D; HS6ST1; NMT2; PEX16; SNRNP40; DDX23; SYMPK; EIF2AK3; SH3BP5; EIF4E2; ATG5; ROCK2; STX8; PIGB; CLTC; FXR2; MPDU1; TMEM59; CIR1; APBA3; ATP6V1G1; SPAG7; MRPL33; SEC22B; PRDX6; VPS9D1; SEC24C; ACTN4; MRPL49; DDX1; DHX8; MTOR; KRAS; MARS; MYO1E; NDUFA5; NDUFA7; NDUFA9; NDUFAB1; NDUFB8; NDUFB9; NUCB2; OXA1L; PCYT1A; PFN1; PGGT1B; PIK3R2; POLR2K; POLRMT; PPID; PRCP; PWP2; ABCD4; SFPQ; SIAH2; TLE1; TRIM25; NUP214; ZRSR2; SLC27A4; ZMYM4; RBM8A; OXSR1; WDR1; GOLGA5; MVP; THRAP3; MED12; MED13; NUP153; CCS; DOPEY2; THOC1; SART1; ABL1; ATF1; BMI1; CHKB; CRK; CRKL; DDOST; ERCC4; GAK; GFER; GLUD1; GNB2; RAPGEF1; PDIA3; HCFC1; HINT1; ZBTB48; HSPA5; JUND; SMAD4; NCL; NFIL3; NKTR; NUP98; PDCL; PHF2; RALA; ROCK1; SLC20A1; STAT2; YES1; CCDC6; MLF2; SMC3; ZRANB2; MED6; ACOT8; GNPDA1; MED16; PIGK; RANBP9; UBA2; CFL1; DMXL1; DOM3Z; GTF2E1; HSF1; DNAJC4; IDH3A; IFI35; IFNGR2; INPP5A; INPP5B; LAMP1; LMAN1; ALDH6A1; MRE11A; RBL2; RHEB; SRSF4; SOLH; SOS1; TAF13; TARBP1; ZNF354A; TCF20; TERF2; NELFA; EVI5; REEP5; TAF1B; SOX13; FARSB; ABCC5; DNMT1; ABCF2; COX17; SCAMP2; SCAMP3; ERAL1; TSSC4; PDCD7; GIPC1; ARPC3; ACTR3; PPIF; CTDSP2; ARPC2; RAD50; ACTR1B; ACTR1A; ZNF263; PDIA6; ARIH1; NAMPT; AKAP9; G3BP1; CEBPZ; TRIM28; ATP6AP2; LPCAT3; RCL1; CNIH; RBM5; LHFPL2; ALYREF; TXNDC9; MPHOSPH10; NME6; NUTF2; USPL1; EIF1; FLOT1; PSMD14; PRDX2; PRKD3; SLC35B1; DCAF7; AP3S2; MRPS31; POP7; SRRM1; STAM2; SF3B4; ZMPSTE24; AKAP8; PURA; STUB1; STAG1; SIGMAR1; CWC27; SAP18; SMNDC1; BCAS2; EIF1B; DNAJA2; APC2; KATNB1; ACAT2; CAPRIN1; NBR1; MCM7; MDH2; MAP3K4; MFAP1; MIPEP; MLLT1; MTHFD1; NAB1; HNRNPM; NAP1L4; PRCC; RNF6; TSPAN31; TBCD; TSNAX; UQCRFS1; UQCRH; CLPP; LAGE3; ARID1A; ALKBH1; CDC123; H1FX; PCNT; CDC42BPB; HDAC6; SNAPC5; DSCR3; SMYD5; RRAGB; AGFG2; TUBA1B; IK; IRF9; BPNT1; PIAS3; LUC7L3; TAB1; MAN2A2; TMEM50B; CAPZA2; DYNC1LI2; NEDD8; NFYB; NUCB1; NUMA1; ORC2; PA2G4; PCBP1; PCM1; PIK3CA; PIN1; PITPNA; POLE; POLR2H; POLR2I; POLR2J; PPP2R5B; PPP2R5E; PRKAA1; PRKAB1; PKN2; DNAJC3; PSME1;



RAD21;RANBP2;DPF2;SRSF6;ITSN2;TAF10;TESK1;TSG101;VARS;XRCC1;ZKSCAN8;SHFM1;ANP32A;SMC1A;NPEPPS;PCGF3;CDIPT;PGRMC2;ARIH2;TUBGCP3;CFDP1;RAN;TIMM23;LYPLA1;EMG1;TIMM17A;ZER1;HMG20B;MERTK;SLC30A9;PIBF1;PIIH;ZNHIT1;TIMM44;ZBTB18;TADA3;UBE2E3;EIF3M;SEC23A;CREB3;LRRC41;VTI1B;ENOX2;APPBP2;CIB1;CHERP;IP07;NOP56;SSSCA1;RNASEH2A;ANP32B;LAMTOR5;AGPAT1;SPTLC1;ARFGEF2;ARFGEF1;RABAC1;SLU7;SIVA1;MRPL28;NPC2;TXNRD2;DRAP1;DNPH1;PRPF8;PAIP1;TBL3;MXD4;HEXIM1;RBCK1;STAMPB;POLR3F;POLR3C;IVNS1ABP;TAF6L;ATP5L;GNAI3;LGALS8;POLH;PSMC4;TRIM27;RSC1A1;SARS;DYNLT1;DYNLT3;TFE3;SLBP;YEATS4;ELL;NCOA2;SPHAR;EXOC5;NPRL2;MTX2;YKT6;PMVK;FARS2;CGRRF1;RRAGA;DCTN6;GNAI3;MAP4K5;GMEB1;CCT8;POLD3;HSPA8;SLC12A7;NUDC;PTGES3;MAP3K2;ZBTB6;POP4;VAMP5;ZNF460;RPP40;SDCCAG8;CLPX;SRCAP;JTB;MAN1A2;TXNL4A;NUDT3;GLO1;EHMT2;COPS8;RNPS1;SUB1;SMPDL3A;DIAPH2;PSKH1;SURF6;SYPL1;TALDO1;TCEA1;YWHAE;IFRD2;LZTR1;LMO4;DDX18;QKI;ZFPL1;WDR3;MALT1;RALBP1;PRDX3;AFG3L2;KDELRL1;SF3A3;HNRNPA0;SEC61B;SERINC3;PNRC1;PSMF1;TMED2;STIP1;CKAP4;YWHAQ;TMED10;ASCC3;UQCR11;COPS6;GCN1L1;COPS5;METAP2;SF3B2;ILVBL;SNRNP27;TMED1;LIAS;CALM1;MYO9A;PPA2;RAC1;RBBP6;RNF5;RPE;SDF2;ST3GAL2;SKIV2L;SKP1;SUMO3;SNRPD1;SOS2;ZNF33A;ZNF33B;ZNF12;ZNF17;ZNF22;ZNF24;ZNF28;ZBTB25;RNF113A;NPM3;SLC35D2;ADRM1;NUDT21;CPSF6;RTN4;DDX52;WWP1;CYB561D2;TMEM115;DUSP14;TOPBP1;RER1;HNRNPUL1;KRR1;FAF1;POLR3A;CLASRP;KPTN;PWP1;CDC37;FICD;LSM6;ATP5I;RPL10A;UBL3;SSR3;TCEB2;TEP1;TFDP1;TMF1;TRIO;UTRN;VCP;ZNF41;VEZF1;ZNF175;ZXDA;ZXDB;SLMAP;ZMYM6;TESK2;NUP50;C14orf1;STRAP;CEP250;WBP4;ABCB8;SEC23IP;SUPT16H;POLI;PROSC;AKAP10;MRPL3;RPL35;PRAF2;SEC63;HPS5;RNF139;DCTN3;XPOT;CHP1;PXMP4;DUSP12;SNF8;ATXN2L;SYNRG;PNKP;B4GALT7;VPS45;LYPLA2;COPE;STXBP3;TUSC2;CBX3;EXOC3;GABARAP;RNF13;TWF2;GABARAPL2;STAT1;NUPL2;ZNF236;OGFR;ATF6;PAXIP1;CASC3;RALY;BRD3;DDX42;TARDBP;COMMD3;CCT5;DGAT1;ELL2;PGLS;ABCB10;MACF1;ADAT1;PRDX5;AP3M1;APPL1;CD3EAP;DNPEP;ARL2BP;AHSA1;CCRN4L;CD2AP;COG2;FAM50B;AATF;SERGEF;CCNDBP1;FBXL3;FBXL4;FBXL6;FBXW2;FBXO22;FBXW8;FBXO3;FBXO8;FKBP8;TIMM10B;EIF2C1;GRHPR;GTF3C4;HNRNPH3;HARS2;MID2;NUBP2;MSRB2;POMZP3;PRDM2;RYBP;SCAP;SNW1;XRN2;ZNF212;HACL1;RHBDD3;ZNF346;FTSJ1;KEAP1;G3BP2;FBXW11;KIN;KPNA6;LETM1;PLA2G15;PIGN;DNAJB9;GTPBP4;NUFIP1;FBXO9;TTC33;BLOC1S6;PEF1;PFAS;PFDN2;CDK14;PITPNB;ANP32C;ICMT;PRDM4;ZMYND8;H2AFV;RAB3GAP2;RLF;RSU1;SF3B3;SEC22A;SNAPIN;STAT5B;TIMM10;TIMM13;TIMM8B;TIMM9;ATP6V0A2;PRPF6;TXN2;UCK2;WBP1;WBP2;YWHAG;ZNF281;EIF3K;DNAJC15;N6AMT1;C16orf80;VPS4A;HTRA2;NXT1;TBK1;SAP30BP;VPS51;MAT2B;POLM;GNL2;RBM15B;CPSF1;TRA2A;SAC3D1;CCDC106;EEF2K;SNX15;PRRC2B;UBIAD1;SNX8;SNX11;ATG4B;PAXBP1;NME7;GMPPB;GMPPA;SEC61A1;TIMM22;ALG6;TFPT;KCNJ14;NENF;CNOT7;ZNF225;ANAPC2;ANAPC4;ABT1;DPP7;PREB;NRBP1;FTSJ2;USP25;UBQLN1;STOML2;ST6GALNAC6;UBQLN2;BAZ1A;BAZ2A;BAZ2B;DHX38;CCDC22;SNRNP200;DEXI;SACM1L;MRPS28;WDR37;DCPS;OSTM1;ASF1A;SNX24;SPCS1;ANAPC15;UNC50;MRPS18B;C19orf53;MKL2;ACAD9;MRPL42;NOB1;NTMT1;ASTE1;FAM32A;MRPL13;ZNF770;C16orf72;ZC3H7A;ZBTB44;SETD2;MRPL18;NDUFAF4;CCDC59;METTL5;CHMP4A;GTPBP8;

CRIPT;MRPL15;TIMM21;LGALSL;ORMDL2;DYNLRB1;CNIH4;TMEM208;SSU72;AP2A1;TMEM258;NDUFA8;PPP2R1A;VAMP2;HSD17B8;UBL4A;GNPAT;EIF2B2;RAPGEF2;RBX1;TMEM5;CNPY2;C11orf58;MGAT4B;DNAJC8;SUC0;EXOSC2;NOM01;TRAM1;CAPN7;ETHE1;BRD4;ISCU;TGDS;C22orf28;TMEM50A;KLHDC2;PDSS1;PATZ1;EDC4;PPIL2;PISD;MTCH2;ZNF318;TBC1D22A;ZNF324;HIBCH;GNL3;FAM162A;AKAP8L;RNF11;ACAD8;DIEXF;PELP1;SND1;GHITM;VPS41;UQCRQ;ZBTB11;AFF4;INVS;SNX5;TUBGCP4;CHMP2A;RNF115;KLHL20;LSM1;LSM3;DINT1;ZNF330;TNRC6A;GOLIM4;PRPF19;UTP20;RABGEF1;TOR1B;MCAT;CNOT3;ZNF232;TMOD3;ZKSCAN5;LATS2;BRD1;ER01L;ZNRD1;DNTTIP2;MAGED2;PIK3R4;UBXN4;MDN1;FAM120A;FAF2;PSME4;ATP11B;ZNF592;SH3PXD2A;CTR9;TTC37;MDC1;SAFB2;SLC25A44;TTI1;PHF14;KDM4A;UBE3C;EMC2;KIAA0100;KIAA0355;AQR;TMEM63A;CEP104;SART3;USP34;SETD1A;LAPTM4A;SLK;MLL4;MLEC;KIAA0195;EIF4A3;TM9SF4;MTSS1;SPCS2;BMS1;PTDSS1;SERTAD2;MAML1;SNX19;TATDN2;MRPL19;TOMM20;EFCAB14;URB2;TSC22D2;ARHGEF11;ZBTB24;PLEKHM1;C2CD5;ZNF518A;EPM2AIP1;C2CD2L;FARP2;CEP350;LRIG2;PJA2;TOMM70A;SEC24D;FCHSD2;URB1;ZC3H11A;TOX4;DDX46;ZBTB39;OSBPL2;ZBED4;FIG4;KIAA0196;AP5Z1;DENND4B;SUPT7L;FAM20B;RNF10;ZBTB5;JOSD1;HELZ;KIAA0020;N4BP2L2;PDAP1;SCAF8;ZFP30;DOLK;AAK1;LMTK2;ICK;R3HDM2;ZNF510;PPP6R1;MLXIP;TRAPPC8;MON1B;MORC2;ZHX2;KIAA0907;BAHD1;DHX30;TCF25;PDCD11;PCNX;HMGXB3;RALGAP1;WDFY3;RAB21;SPEN;FBX021;EXOSC7;KDM4B;USP33;PHLPP2;ZNF292;XPO7;MON2;PDXDC1;FRYL;PDS5B;ZHX3;KIAA0754;PIKFYVE;ZNF609;TBC1D9B;GGA2;WAPAL;SETX;SETD1B;FTSJD2;ERP44;RRP1B;MYCBP2;AVL9;PPRC1;ZC3H13;SARM1;CDK12;MRPS27;CUL9;FAM179B;SMG1;TAB2;PLXND1;ATG2A;RAD54L2;SMC5;MAST2;ZZEF1;ANKLE2;ZC3H3;GRAMD4;CIC;TBC1D9;WDR43;SNX13;MPRIP;NUP205;EFR3A;RTF1;TTLL12;METAP1;ZCCHC14;CEP68;PHF3;LARP4B;RCOR1;FAM168A;PMPCA;PLEKHM2;ZC3H4;RRS1;PRRC2C;TBC1D12;DNAJC9;KIAA0556;RPRD2;ATP11A;DNMBP;POFUT2;CLUH;NUP160;CSTF2T;ATMIN;KIF13B;FKBP15;SIN3B;NCAPD3;DNAJC13;MAN2B2;KIAA1033;USP22;DPY19L1;SZT2;WDR7;VPS39;DNAJC16;KHNYN;ANGEL1;USP24;FNBP4;KIAA1109;LARP1;PPP1R13B;PUM2;UFL1;RRP8;KIAA0947;SMG5;MAU2;NCSTN;NUDCD3;MED13L;ZDHHC17;ADNP;LARS2;PPWD1;ZFYVE26;TMEM131;GLTSCR1L;POFUT1;SUZ12;SCRIB;MORC3;SKIV2L2;R3HDM1;ELP5;PANX1;VPS13D;SAMM50;HECTD1;NIPBL;YIPF3;TECPR1;DCAF12;ABHD14A;EP400;C3orf17;DCAF13;TMEM186;AASDHPPT;POLR1A;CCDC28A;AHCTF1;CAMSAP1;CNOT6;NELFB;ZDHHC5;MTMR9;ATL3;NOL11;PTPN23;NIPSNAP3A;HEATR5A;FAM98A;SLC22A23;KBTBD2;SYF2;PNISR;KIAA1429;NECAP1;DHRS7B;IBTK;TBC1D10B;RNF167;C2CD3;DAK;ZZZ3;RPAP1;LRIG1;UPF2;PTCD1;GLCE;OPA1;UBXN7;LTN1;POLDIP2;GPATCH4;HERC4;CCDC9;CCZ1;LDLRAP1;PRPF31;EPC2;GAPVD1;TRPC4AP;IRF2BP1;C10orf12;NAT9;ZNF337;NOC2L;RSL1D1;GTPBP5;SEN3;TRUB2;WWC3;ZNF777;BRPF3;COQ2;GPKOW;MMADHC;RRP7A;DESI1;SGSM3;GLTSCR1;DCAF8;WARS2;UBXN1;GTF2A1;ZNF593;AZIN1;MBTPS2;PCF11;CDC40;ZBTB7A;UBR5;EIF5B;TRIM33;LAP3;NBAS;WDPCP;TXNDC12;TXNDC11;POP5;RPS27L;POMP;TMA7;NOP58;NMD3;TRMT6;ATP6V1H;MTERFD1;SLC35C2;PELO;GET4;MRPL2;DERA;MRPL4;APIP;CUTC;FCF1;NDUFA13;ERGIC3;MRPS17;MRPS7;TAF9B;UBE2D4;HEBP1;ATP6V1D;ADIPOR1;UTP18;ABHD5;NDUFAF1;PHF20L1;TFB1M;UBE2J1;RBMX2;LACTB2;SUV420H1;TRAPPC12;RMDN1;MRPS2;COQ4;

UTP11L;SBDS;C14orf166;DERL2;FAHD2A;EXOSC1;SF3B14;ISOC1;EMC9;MRPL11;MRPL48;TMBIM4;TPRKB;PPIL1;MED31;FAM96B;MRPS16;MRPS18C;FIS1;PAM16;MRPS23;MRPS33;GOLT1B;BOLA1;VPS36;PTRH2;TVP23B;GLOD4;CDK5RAP1;STYXL1;RBM7;RPL26L1;COMMD2;IER3IP1;NAA20;ZFR;TEL02;RLIM;TMEM66;COPG1;RAB10;INSIG2;CHCHD2;DYNC1LI1;HSD17B12;COMMD10;WDR830S;TRAPPC4;RAB4B;PIAS1;NOL7;HEMK1;SDF4;MRT04;LSM7;NAA38;PDGFC;CPSF3;VPS28;TRAPPC2L;TRIP4;DBR1;POLK;MAN1B1;DDX41;SNX9;VPS29;NLK;BIRC6;FAM8A1;NAGPA;TUBE1;SELT;TAOK3;HP1BP3;PCYOX1;HSPA14;RSL24D1;SS18L2;DNAJB11;POLR3K;ATPIF1;WBP11;RAB14;ZNF274;ZNF639;SRRM2;ZDHHC2;DDX47;TAC01;ACP6;WWOX;AKAP7;C9orf114;CTDSPL2;TRIAP1;C11orf73;CWC15;TRMT112;UFC1;RTFDC1;GLRX5;RNF141;GLTP;RTEL1;NCKIPSD;EMC4;TMEM9;CXXC5;ANKRD39;C20orf111;CCDC174;ZC3HC1;C9orf156;PDZD11;VTA1;TMEM69;MRPL37;RNF181;MRPL51;PBDC1;MRPL27;ZCCHC17;KBTBD4;SCLY;C9orf78;KLF3;TM7SF3;SCAND1;BFAR;COA4;BCCIP;ERGIC2;RSF1;TIMMDC1;KDM3B;ARMCX3;TDP2;KRCC1;ZNF644;MRPL35;WAC;MRPS30;GDE1;CRNKL1;STX18;POLA1;RWDD2B;SEPSECS;USP18;NUP54;PTOV1;CPSF2;POLE3;CHRA1;MRPL39;TMED9;HAUS7;ARID1B;MPHOSPH8;POGK;CNOT11;FOXRED1;MIER2;INO80;ZTRANB1;UBE2Q1;TRIM44;WDR5;ZC3H7B;MED29;BMP2K;VEZT;ZCCHC8;RNPC3;ALKBH4;C17orf59;CNNM3;CDKN2AIP;KCTD9;KLHL24;TRIT1;FTSJ3;CNNM2;DYM;KLHL28;GATAD2A;ANKRD10;ZCCHC10;OTUB1;TRPM7;GIN1;MCM9;FBXL12;ANKRD49;WDR55;PGPEP1;TASP1;ZNF3;CC2D1A;TMEM104;QRICH1;THUMP1;ZCCHC2;DPP8;ST7L;CWC25;UHRF1BP1;ALKBH5;PNRC2;MTMR10;SLC39A4;LRRC40;PKX;TBC1D22B;CDKAL1;CHD7;FAM208B;FOCAD;BTBD2;YTHDF1;HEATR2;OSGEP;ZSCAN32;UBE2R2;CHCHD3;IMPAD1;RAB20;WRAP73;TRMT10C;EXD3;KANS1;MARCH5;ADPRHL2;COMMD4;CECR5;FAM206A;MRPL16;SDHAF2;SLC48A1;TRNAU1AP;FAM120C;C1orf109;PARP16;SSH3;INTS8;C4orf27;THG1L;SLC25A38;SLC35F6;ZNF416;CLN6;PINX1;C1orf123;VPS13B;PRPF40A;DDX27;GID8;HIF1AN;TMC03;PAK1IP1;LAMTOR1;ZNF446;TRMT61B;CDC37L1;C19orf24;PIH1D1;PPP2R3C;STX17;NPLOC4;PRPF39;C14orf119;DENND4C;GPATCH2L;PHIP;USP47;PTCD3;TRMT12;VPS37C;IWS1;NRDE2;MRPL20;RUFY2;SCYL2;TMEM248;RNF31;TRMU;ARGLU1;C10orf118;MED9;YEATS2;WDYHV1;GPATCH1;SAMD4B;WDR6;LUC7L;WDR70;ATG2B;GPATCH2;SLFN12;AGGF1;RBM22;MAGOHB;PLEKHJ1;MANSC1;WDR60;VAC14;TMEM39B;IARS2;PRPF38B;AKIRIN2;GPN2;ARHGEF40;HEATR1;TRIM68;CCDC94;LARP1B;SRBD1;IPO9;ELP3;WDR74;GSPT2;NLE1;THAP1;MTPAP;LMBR1L;SDAD1;WDR11;ARMC1;DARS2;TMEM33;TSR1;PNPO;SHQ1;MRPS10;INTS10;RMDN3;RNMTL1;SMG8;RNF220;RIC8B;SLC4A1AP;NADSYN1;DNAJC17;ASUN;RPRD1A;MAP1S;N4BP2;GOLPH3L;ATF7IP;DHX32;ARL8B;ZFP64;DNAJC11;HMG20A;TBC1D13;TMEM57;VPS35;ARFGAP1;PANK4;USP40;COA1;SMU1;UBA6;AP5M1;NUP133;SLC38A7;OGFOD1;CCAR1;AGK;TMEM184C;CCDC25;WDR12;TTC17;TYW1;TMEM39A;WDR41;ADI1;THNSL2;TMEM19;NUDT15;IMP3;PHF10;QRS1;ZNF654;CWF19L1;EXOC2;BRF2;PBRM1;CCDC91;RNF121;BRIX1;DDX19A;RFK;C6orf70;RSAD1;FGD6;TMA16;C5orf22;ABCF3;UFSP2;LIN7C;RSBN1;BLOC1S4;LMBRD1;SYNJ2BP;LSG1;METTL2B;DCP1A;COPRS;ST7;PI4K2A;TMEM63B;RRN3;UTP6;BDP1;RNF130;FBXO6;IMPACT;VIMP;EMC3;CAND1;UBAP2;TMEM242;EAPP;PPP2R2D;BRK1;ITFG2;CISD1;PLGRKT;USE1;TEX2;ZC3H15;TMEM165;ACTR10;ASH1L;TMC06;LRRC59;KIAA1704;

CSGALNACT2;WSB2;NOP10;SLC35E3;ZNF395;VPS33B;RNF114;CMAS;BIN3;FAM114A2;DHTKD1;COG1;MAML3;TRPV1;SLC25A40;MKKS;PCDHGB5;CLN8;NANS;UBB;DAZAP1;BRWD1;TERF2IP;SLC38A2;YIPF1;GAR1;SSH1;RBM27;KCTD5;FBX042;MRPS21;FBXW5;ETAA1;ANKIB1;MIOS;SMCR7L;TOLLIP;TMX3;HEATR5B;DHX29;EXOSC4;ELP4;PUS7;CCDC93;ASNSD1;MRPL50;FAM35A;TOMM7;WDR5B;DDX49;ING3;TRMT13;VSI10;GTPBP2;LIN37;C19orf10;SMG9;ALG1;UBFD1;TMEM234;PPP1R37;MOSPD1;YLPM1;RNF20;GPCPD1;FAM214A;WDR45B;METTL3;GSK3A;CHST7;DIABLO;INPP5E;POLE4;LARS;UGGT1;UGGT2;KCMF1;TM9SF3;UBQLN4;WRNIP1;GRIPAP1;BDH2;TMEM167B;PNO1;SH3GLB2;STARD7;EMC7;C1GALT1;EXOSC5;MCCC1;NCLN;FEM1C;DUSP22;CMC2;MRPS22;YAE1D1;C11orf30;MFF;SDR39U1;XAB2;CCDC47;C5orf15;NIT2;OTUD7B;PARP6;RNPEP;FAM20C;PRDM10;PPAN;PSMG2;ADPRM;MRPL1;TOMM22;CHPT1;CCNL1;MNT;CIAPIN1;C16orf62;ANKMY2;RARS2;RALGAPB;ZMIZ1;RALGAPA2;NKIRAS1;ENTPD7;PCNP;PITHD1;PARP11;UTP3;AVEN;C12orf4;C12orf5;MAN1C1;PDSS2;SETD8;REX04;NUP107;MRPL47;ATP13A1;DDX24;SCYL3;SEPN1;ATP10D;TUBGCP6;LYRM2;SNX14;YIF1A;GALNT1;MCOLN1;CSRP2BP;TMEM9B;MRS2;CLK4;RAB22A;ANKHD1-EIF4EBP3;REX01;KIAA1143;GATAD2B;LRRC47;ZNF512B;ZNF490;USP31;PRR12;ATXN7L1;NLN;ESYT2;KIDINS220;MTA3;AARS2;INTS2;XPO5;ARHGAP31;SERINC1;UBR4;NUFIP2;MIB1;ZNF398;KLHL42;PDP2;USP35;KLHL8;TMEM181;ARHGAP21;CRAMP1L;KIAA1430;WDFY1;ZNF687;WDR48;FNIP2;PITPNM2;SLAIN2;RANBP10;KIAA1468;VPS18;ZBTB2;SH3RF1;PHRF1;RDH14;FLYWCH1;ALS2;ZSWIM6;KIAA1586;DDX55;CWC22;GBA2;DENND1A;KIAA1609;ANO8;METTL14;EPG5;NCOA5;PPM1A;DHRS4;DEAF1;UBC;RAP2A;ZNF1X1;MBNL1;ZNF253;NDUFV2;KAT2A;NMT1;ZNF8;MTMR3;MRPS12;POLR2L;PPA1;PPIA;MRPL23;TNFAIP1;TRAF2;KDM6A;XRCC5;ZNF273;TMX4;GATAD1;KIAA1967;LSM2;CCNB1IP1;C6orf47;SLC30A1;SRPRB;ENOPH1;RPRD1B;ZNF77;PRUNE;SCAF1;SELK;RBM25;WIZ;RRAGD;SNX6;TRIM39;C21orf59;ZFYVE1;SEN2;PDLIM2;KLHL12;GPBP1L1;C12orf10;UTP14C;ZNF500;VPS11;SAV1;CCDC90B;FASTKD5;GUF1;SPCS3;RINT1;RIC8A;MIIP;EEFSEC;TRAPPC11;ZFAND3;SRR;PPP1R11;ZNF148;POLR2F;ZNF277;ITM2B;TIA1;FBXW4;ABHD4;MRPL17;UBE20;HEATR6;NSUN3;CERS2;GPATCH3;HPS4;GALNT11;ZNF335;MRPS14;PCIF1;FKBPL;RBM26;GOLPH3;MCCC2;SNX16;MAGEF1;TMBIM1;DUS1L;MRPL46;XYLT2;EIF4H;C11orf24;ZFYVE20;PDF;C17orf75;OSGEPL1;MMS19;DNAJC1;TFB2M;TOR3A;HERPUD2;NOC3L;RNF25;NSD1;LMBR1;XPO4;HS1BP3;IKZF4;ZMAT3;KLHL25;GZF1;C5orf28;TMEM168;ATG3;POLR1E;SUDS3;TTC31;NARFL;ZDHHC6;PCNXL4;ACTR6;MRPS25;DNMT3A;VPS52;GIGYF1;VPS16;ANAPC1;SNRNP35;DGCR14;COPS7B;NUCKS1;ACBD3;TNS3;FAM160B2;PARP12;ZNF574;SFXN1;IPPK;CCDC14;C6orf106;C11orf1;RMND5B;CERK;LMF1;OSBPL11;RMND5A;MPHOSPH9;ARV1;NMNAT1;MAP1LC3B;PORCN;MARCH7;YTHDC2;TUT1;MRPS11;RFX7;PAPOLG;C12orf43;ACTR8;CASD1;CCDC71;MRPL44;VPS33A;NOL6;KRI1;UPF3B;UPF3A;RSRC2;INTS3;FRY;ANKRA2;SPATS2;ZNF649;SELRC1;UBE2Z;C8orf33;CAPN10;ZNF747;FUND2;DDRKG1;MRPS34;MRPL34;CDK11A;MRP63;YIPF2;PRR14;C19orf43;CUEDC2;METRN;DDX50;DDA1;NUP37;SPATA5L1;PDCL3;ERI3;C7orf26;NABP2;SECISBP2;NOC4L;METTL16;FASTKD3;TMEM109;C2orf49;ASB8;DCTPP1;C1orf50;CCDC86;C11orf48;WDR18;WDR77;SLC25A23;SMIM7;ALG12;C9orf16;TAF1D;DHX58;TMEM185B;FAM134A;PHF23;PPDPF;DHRS11;GNPTAB;NOL12;LENG1;

C1orf35;RBM42;ZNF343;FBXL15;DCAF10;NDUFS7;PGS1;IRF2BPL;LRFN3;HAUS3;CYP2R1;PAGR1;C2orf47;GCC1;ATP13A3;ABHD8;NKAP;CDC73;CARS2;MRPL24;C10orf76;MUL1;RNF219;ADIPOR2;FAM118B;TANGO6;SNRNP25;C6orf211;OCEL1;ARMC7;OSBPL9;ROGDI;CHMP6;SRD5A3;PANK3;HECTD3;NLRX1;FN3KRP;C22orf29;ZDHHC14;MSANTD2;NAA35;YRDC;MANEA;OGFOD3;BBS1;PRKRIP1;NOL9;TBL1XR1;ZNF768;THAP9;PALB2;TEFM;AAMDC;BBS10;SNIP1;ASB13;ASB7;KATNBL1;TXNDC15;CCDC82;KLHL36;FBX031;HPS6;TTC21B;PTCD2;CAMKMT;METTL8;ZMYM1;GEMIN6;NHEJ1;ZBTB3;TMEM180;CSPP1;RPAP2;CBLL1;RABEP2;UBA5;TGS1;GGNBP2;ZNF672;NUP85;EIF2C3;PYROXD1;ACTR5;MRM1;KIAA0319L;SLC35E1;OBFC1;ZCCHC4;C10orf88;RMI1;FAM192A;PHC3;WWC2;NAA25;UBTD1;TMEM62;PANK2;FBXL18;GFM1;KLHL18;ZNF606;MZT2B;VCPIP1;RPF1;THOC7;CENPT;USP36;CTC1;MUS81;WDR19;CHD9;PROSER1;CCDC92;TM2D3;NAA50;COQ10B;ACSF2;C17orf70;SIK3;SLC35F5;FAM214B;C16orf70;EDEM3;ITPKC;GRPEL1;MED28;DNAJC5;WDR82;WDR61;TNKS2;THUMP2;NDFIP1;CYB5B;ZNF34;WDR59;KLHL15;INTS5;EEPD1;DUSP16;SH3BP5L;SETD7;ACAP3;KIAA1715;MAP2K2;RAI1;TMX1;ILKAP;SLC25A32;CLPTM1L;PTDSS2;HM13;ITFG1;SGPP1;WBSCR16;C1orf21;CSRNP2;MRPS26;ANKRD13C;CCDC130;PLA2G12A;CTNBL1;APOL2;TRIM8;SNX27;C6orf62;ISCA1;TRIM56;SBF2;MED25;SHARPIN;ARPC5L;RAB1B;QTRT1;SLC25A28;HDHD3;NECAB3;MRPS15;SF3B5;INO80B;RAB33B;HUWE1;MRPL9;RILP;COG3;GUCD1;ZMIZ2;FAM103A1;SELO;RIOK1;GRWD1;L3MBTL2;LONP2;RBM4B;BBS2;GORASP1;MRPS5;MRPL32;FRMD8;ATAD3B;TAF3;RSPH3;TMEM120A;SNX25;MRPS24;RNF26;STK40;C10orf11;EIF2A;TM2D1;ITFG3;SRSF8;MRPL14;MRPL43;RBM48;MAGT1;HDHD2;TMEM222;SLC10A7;KBTBD7;ANKRD27;ENKD1;CEP192;PCBD2;ZNF394;ATRIP;WDR75;USP42;TOMM40L;UTP15;PHAX;SLC7A6OS;FAM175B;KAT8;RNASEH2C;RPF2;SON;ANKRD17;CHD6;PCNXL3;ZCCHC7;SETD3;SGK196;TMEM117;WDR24;ZNR1;TRAF7;MAF1;MED10;SLC37A3;DCUN1D5;POLR3GL;C9orf64;CHCHD5;C9orf89;POLDIP3;YIPF4;NOA1;COQ5;NICN1;PRADC1;BTBD10;TMEM79;NTPCR;TMEM175;ZDHHC16;ING5;UTP23;LLPH;MIEN1;MNFI;PDCD2L;MRPL45;BRMS1L;VPS25;LSMD1;ACBD6;DNAJC14;LZIC;APOPT1;TMEM101;ELOF1;GFM2;COG8;HPS3;C5orf4;MKI67IP;BAZ1B;PINK1;HOOK3;MSANTD4;SYVN1;ZNF333;FAM120B;CC2D1B;ZNF527;PPIL3;MRPS6;MRPL41;MRPL38;MRPL36;C14orf142;JAGN1;ZC3H8;MAK16;GNPTG;USP38;HIATL1;SMEK1;GLYR1;DPY30;FAM126A;USP32;HINT2;MCEE;LOXL3;USP30;FUT10;PCGF1;MPV17L2;TUBA1C;MFSD9;TXNDC17;LMNB2;PHF5A;LRCH3;KLHL22;CCDC142;CBR4;ZC3H10;PARP10;ZBTB45;SYAP1;SPPL2A;ADO;GTDC2;FAM73B;ATAD1;TBGR1;NFATC2IP;CEP89;ZNF341;FAM136A;TMEM87B;CIRH1A;PPP1R15B;FIZ1;DIRC2;SPRYD3;TMEM209;C8orf76;C12orf52;ATG4C;MUM1;WDR73;LACTB;ABHD13;LTV1;SERAC1;TIGD5;PRPF38A;ALKBH6;LSM10;ATG4D;PPP1R16A;PYURF;UBL7;TMEM128;TMEM141;TMEM60;C9orf37;POLR2C;CSRNP1;HIAT1;SYNE1;SARNP;EAF1;ALG2;ZCCHC3;PNPT1;RRP36;ZCRB1;NEK9;RBM18;SURF4;PIGS;LMF2;PPP1R3F;PURB;DGCR6L;BTBD6;MRPS36;C22orf32;MICALL1;KIAA1731;ZNF622;IMP4;METTL18;PGAP3;C9orf123;CDK11B;TPGS1;MFN1;INTS4;TRIM41;TP53RK;N4BP2L1;MMAB;CCDC97;GADD45GIP1;ADCK2;ZNF830;RFT1;MGME1;VPS26B;NACC1;MBD6;ESCO1;SMYD4;ATG4A;WDFY2;DNMT1P1;RBM33;TMEM203;EGLN2;MRPL53;SNAP47;TADA1;THEM4;GLMN;ANKH;KLHDC3;NAA15;TSR2;UBE2J2;LOH12CR1;

SMIM11;FAM207A;RPUSD1;ZNF354B;MYO18A;SLC36A1;SCAMP4;PIGU;SLC44A1;ZSWIM1;  
B3GALT6;MED30;TMEM41A;CDKN2AIPNL;SLC35A4;DYNLL2;UBE2F;SRXN1;B3GAT2;ROMO1;  
DTD1;FAM210B;OVCA2;SPSB3;SOCS4;PRRC1;ELMO2;LRPPRC;WIPF2;RSPRY1;ZNF526;ZNF721;  
SAT2;HELQ;MED22;RAD52;NUP35;SPTSSA;PYG02;FAM122A;KLC4;KIAA2013;FAM105B;SAMD1;  
C19orf52;CEP95;PRMT10;TTC5;OXNAD1;MTG1;G6PC3;TMEM183A;MARS2;NOM1;MVB12A;  
GTF3C6;KTI12;FAM195A;SAAL1;CASC4;C12orf57;MFSD3;MALSU1;ACYP2;BATF2;NUS1;GLI4;  
CDAN1;CYHR1;TECR;HINT3;TAF8;HAS3;PPP1R14B;MPLKIP;NDNL2;RHOT2;SLC25A46;ALKBH8;  
WDR85;ZNF653;GINM1;LEO1;ANKRD54;MITD1;TAMM41;HIGD2A;MSI2;SPPL3;PPIL4;ALKBH3;  
FGD4;MTFMT;PPM1L;TSTD2;EHD4;ORMDL3;WDR36;PPTC7;RPIA;SLC39A3;ANGEL2;HN1L;  
MAPK1IP1L;L3HYPDH;TEX261;LRRC28;FOPNL;ZC3H18;FLCN;CYB5D1;TBC1D20;TMEM42;  
NACC2;FAM76B;ZNF18;ZNF480;ZNF420;ZNF558;ZNF570;BROX;LSM14B;PUS10;SEPT10;  
CCDC12;SPICE1;THAP6;ZMAT2;APOA1BP;MBNL2;FAM91A1;DENND5B;ZNF564;IMMP1L;ZFC3H1;  
LRRC45;TSNARE1;CCNY;UBLCP1;UPRT;FUK;ZUFSP;OARD1;NSMCE1;FAM200A;ZSCAN25;  
SFT2D1;MAP2K7;NAPRT1;CSNK1A1L;VTI1A;MRPL30;OMA1;FRA10AC1;UBALD1;MRPL10;  
CCDC127;NUDCD2;C6orf57;ZBTB49;SLC15A4;ATPAF2;KIFC2;ABTB2;ZNF511;MTPN;CRYZL1;  
ZNF23;ZSCAN21;ZNR2F2;SGMS1;RPP25L;SVIP;RPUSD2;C12orf23;CHMP7;ZNF585B;ARRDC1;  
ORAI3;ZNF561;TADA2B;TRMT61A;SLC36A4;ARL14EP;C12orf45;TARSL2;SPATA2L;LSM12;  
ZNF491;ZNF440;C1orf131;KCTD18;METTL6;GRPEL2;ZNF786;NDUFAF6;TMEM68;HGSNAT;  
ARHGAP42;KBTBD3;CWF19L2;C12orf66;LYSMD4;ZSCAN29;ZNF785;TMEM199;ZNF417;  
C19orf25;B3GALNT2;ZNF362;MROH8;COMMD1;KANSL1L;XXYL1;SCFD2;TRMT44;SRFBP1;  
SNRNP48;ZNF579;ZNF383;SDE2;RNF168;MIER3;TCEANC;ARID2;UBE2E2;NANP;DENND6A;  
RWDD4;CCDC111;HIPK1;SEN5;STT3A;PATL1;EFHA1;CPNE2;NT5DC1;C6orf89;HIBADH;  
BRAT1;RICTOR;YTHDF3;TMEM256;MFSD8;D2HGDH;TAB3;TMEM18;UHRF2;TANGO2;N4BP1;  
TCEANC2;EID2;NPHP3;ZNF461;LRRC57;CNEP1R1;PUSL1;TMEM161B;ZNF791;TAPT1;  
KIAA1919;LN2;AGXT2L2;MED19;COG7;CRYBG3;CPNE8;PIGP;ZFP1;C2orf69;ZNF367;AAED1;  
KDELC2;TTL;CACUL1;ZFP1;MLL3;MLX;C11orf31;PGBD3;TRIM35;HSCB;CBWD2;RC3H1;  
TNFSF12-TNFSF13;SUGP1;MMAA;MRPL54;PSENEN;RUNDC1;FAM149B1;MMGT1;DCUN1D3;  
CCDC117;ZNF584;KCTD20;PRR14L;ANKRD52;DIP2B;INO80E;HEXDC;RTTN;ZNF776;SLC9A9;  
C3orf33;DCBLD1;NSMCE2;PDZD8;BLOC1S2;TTC9C;FAM126B;C3orf38;RABL3;COX18;  
SREK1IP1;KRTCAP2;NDUFAF2;PPP4R2;CCDC50;TMEM167A;NOP9;UBR1;ADCK5;N6AMT2;  
GPATCH11;ZNF575;EMC10;DDX51;UBR7;TXLNA;EXOC8;ZADH2;CRIPAK;C5orf51;CDK5RAP3;  
CHMP4B;ZNF800;GATC;INADL;NR2C2AP;MIDN;NUDT14;CYP20A1;P4HTM;PDE12;PPM1G;TUBB;  
GGT7;ERC1;FAM134C;SLC35B2;ZNF598;MRPL52;GMCL1;DRAM2;PIGW;ZNF616;ZBTB80S;  
ZNF678;ZDHHC21;MTDH;ARL5B;AGPAT6;STT3B;GPR180;ZACN;MRPL55;GCC2;ZNF445;EXOSC8;  
MRPL21;AUP1;C17orf58;OGT;QS0X2;LYRM7;DNAJC24;BCDIN3D;GRASP;UBXN2A;CRTC2;  
METTL2A;TMTC3;DPY19L4;AASDH;TMED7;ZSCAN22;ZSCAN2;COQ6;USP12;ZNF227;ZNF428;  
MTERFD2;C9orf85;CMC1;ZNF595;NSUN6;TMED4;BRICD5;PDDC1;C15orf38;MRPS9;TPRG1L;  
TRNT1;TICAM1;HEATR3;ZNF326;CYP2U1;C9orf142;ARRDC4;HNRNPA3;DND1;ISCA2;SPTY2D1;  
RPS19BP1;PHLPP1;RNF126;C7orf55;TSC22D3;GNPNAT1;COX20;C1orf52;CCZ1B;GANC;ARSK;

E2F6;LYSMD3;GANAB;APOOL;RSBN1L;C19orf54;RPL7L1;CCDC84;FAM174A;NHLRC2;ZNF710;HDDC3;ATP9B;ZNF773;MIA3;TMEM110;ACACA;FAM120AOS;NUP43;SS18L1;DHX57;NELFCD;NSUN4;NDUFAF3;CARM1;TMEM189-UBE2V1;CCDC137;NACA2;PHF17;FAHD2B;TMEM179B;CCDC23;FAM86A;SLC25A35;RP9;POLR1C;CHCHD1;RAPH1;TMEM81;RBM12B;MBLAC1;MRFAP1L1;COMMD6;C19orf70;CLYBL;MRAP;RNF216;GTF2H5;FAM199X;ERICH1;ZDHHC24;TSEN54;CYP4V2;C1orf174;BLOC1S3;METTL10;ZNF543;ZNF789;ZNF517;SFXN4;及其任何组合。在某些实施方案中,通过另外的qPCR反应对参考基因进行分析。

[0061] 在某些实施方案中,过程中对照是用于逆转录酶和/或PCR反应性能的对照。这些过程中对照包括但不限于,参考RNA(在这里也称为ref.RNA),它是在RNA分离之后和逆转录之前加入的。在某些实施方案中,ref.RNA是对照,诸如QB。在某些实施方案中,ref.RNA通过额外的PCR反应进行分析。

[0062] 在某些实施方案中,根据T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19缺失和/或一个或多个外显子19插入的检测进一步分析提取的核酸,例如RNA和循环NA。

[0063] T790M突变已被确认为管家基因突变。这种所谓的管家基因突变不仅被认为是在治疗过程中通过选择性压力出现的,而且在罕见的情况下(<5%)也可以在TKI未治疗的肿瘤中发现,可能导致对这些药物的原发性耐药性(见例如Gazdar et al.,“Activating and resistance mutations ofEGFR in non-small-cell lung cancer:role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors”.Oncogene,vol.28Suppl 1:S24-31(2009),Suda et al.,“EGFR T790M mutation:adouble role in lung cancer cell survival?”J Thorac Oncol,vol.4:1-4(2009);Mulloy et al.,“Epidermal growth factor receptor mutants from human lung cancers exhibit enhanced catalytic activity and increased sensitivity to gefitinib”.Cancer Res.,vol.67(5):2325-30(2007),和Vikis et al.,“EGFR-T790M is a rare lung cancer susceptibility allele with enhanced kinase activity”.Cancer Res.,67(10):4665-70(2007),其内容通过引用并入本文)。更敏感的分子方法的出现也有助于从从未治疗患者的肿瘤中检测到这种突变,并且也可能导致对TKIs的原发性耐药性。最后,与未检测到T790M的治疗前患者相比,治疗前患者中T790M的存在与无进展生存率显著相关(见例如,Pao et al.,“Acquired resistance oflung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain”.PLoS Med.,vol.2(3):e73(2005),Maheswaran et al.,“Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells”.N Engl J Med,vol.359(4):366-77(2008),和Isobe et al.,“Clinical significance ofBIM deletion polymorphism in non-small-cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation”.J Thorac Oncol,vol.9(4):483-87(2014),其内容通过引用并入本文)。

[0064] 携带其它EGFR突变(例如外显子21、L858R和外显子19插入和缺失)的患者在包括随机III期试验在内的前瞻性试验中已显示出更好的射线照相反应率[Fukuoka et al.2011;“Biomarker analyses and final overall survival results from a phase III,randomized,open-label,first-line study of gefitinib versus carboplatin/paclitaxel in clinically selected patients with advanced non-small-cell lung

cancer in Asia (IPASS)”, Journal of Clinical Oncology, vol.29 (21):2866-74 (2011)]. 对于L858R和外显子19插入和缺失,在安全性和有效性数据总结 (SSED) P160045和P150044中,吉非替尼和厄洛替尼显示出显著的治疗益处,分别在[accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf16/p1060045b.pdf](http://accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf16/p1060045b.pdf)和[accessdata.fda.gov/cdrh\\_docs/pdf15/p150044b.pdf](http://accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf15/p150044b.pdf)上获得。

[0065] 在某些实施方案中,附加分析使用基于机器学习的建模、数据挖掘方法和/或统计分析执行。在某些实施方案中,对数据进行分析,得出截止值,以确定或预测患者的疾病结局。在某些实施方案中,数据被分析以在患者群体中对患者进行分层。在某些实施方案中,对数据进行分析以识别或预测患者是否对用EGFR疗法治疗有抗性,例如,通过非-限制性的例子,用EGFR抑制剂治疗。在某些实施方案中,数据用于检测受试者的无进展存活进展。

[0066] 在某些实施方案中,当检测到T790M突变、L858R突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失时,对数据进行分析以选择针对受试者的治疗选项。在某些实施方案中,治疗选项是用EGFR抑制剂治疗。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是酪氨酸激酶抑制剂或酪氨酸激酶抑制剂或任何其它分子药物包括免疫治疗药物的组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是第一代酪氨酸激酶抑制剂或第一代酪氨酸激酶抑制剂的组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是第二代酪氨酸激酶抑制剂或第二代酪氨酸激酶抑制剂的组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是第三代酪氨酸激酶抑制剂或第三代酪氨酸激酶抑制剂的组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是第一代酪氨酸激酶抑制剂、第二代酪氨酸激酶抑制剂和/或第三代酪氨酸激酶抑制剂的组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是厄洛替尼、吉非替尼、另一种酪氨酸激酶抑制剂,或其组合。在某些实施方案中,EGFR抑制剂是下一代酪氨酸激酶抑制剂(即第四代酪氨酸激酶抑制剂)或另一个靶向T790M的分子药物或EGFR内的任何突变或遗传改变。在进一步的实施方案中,以上EGFR抑制剂与增强患者对抗肿瘤细胞的自身免疫反应的免疫治疗药物联合使用。

[0067] 现将详细描述本发明的各个方面和实施方案。将理解,在不偏离本发明范围的情况下可对细节进行修改。此外,除上下文另有要求外,单数词应包括复数,复数词应包括单数。

[0068] 所有已确定的专利、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早于这样的公开内容。有关这些文件的日期或内容陈述的所有声明均以申请人所掌握的资料为基础,并不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

## 附图说明

[0069] 图1是从样品提取到变异调用的T790M检测分析工作流程的示意图示。

[0070] 图2是描述了图1所示的T790M检测分析的分析性能的曲线图。每个数据点代表多达14个独立的实验。已使用log10刻度绘制数据,但显示T790M的拷贝/mL以获得视觉帮助。

[0071] 图3是显示图1所示的T790M检测分析的临床性能的图表。

[0072] 图4是描述大的和短的扩增子(有或没有碱基修饰)的比较的图表,以检测高度降解的DNA中的突变。



[0073] 图5A和5B是一系列图表,描述了包括碱基修饰的ARMS引物和不包括碱基修饰的ARMS引物的比较。

[0074] 图6是一个图表,它展示了本文描述的分析法适应递增量的来自正常健康血浆的exoNA和循环NA的能力。

[0075] 图7是展示L858R和De119检测分析性能的图。如图所示,野生型样品和突变体样品之间有明显的分离。

### 具体实施方式

[0076] 本公开内容提供在生物样品中检测一个或多个生物标记,例如表皮生长因子受体(EGFR)突变的方法,以帮助用于疾病例如癌症的诊断、预后、监测或治疗选择。在某些实施方案中,癌症是肺癌。在某些实施方案中,癌症是非-小细胞肺癌(NSCLC)。

[0077] 本文提供的方法和试剂盒可用于在生物样品中检测EGFR耐药性和/或致敏突变。在某些实施方案中,EGFR突变是EGFR基因的外显子20上的T790M突变。在某些实施方案中,突变是一种激活突变,包括但不限于EGFR基因的外显子19中的一个或多个插入突变,EGFR基因的外显子19中的一个或多个缺失突变,EGFR基因的外显子21上的L858R突变。本文提供的方法和试剂盒从血浆共同分离细胞外NA和无细胞NA,而细胞外NA和无细胞NA被逆转录。在逆转录步骤,加入扩增对照(DNA)和在对照中的RNA掺杂物,以确保逆转录和随后的扩增发生。在下一步骤,执行预扩增反应。在某些实施方案中,预扩增反应是多重预扩增反应。在某些实施方案中,预扩增反应是包括野生型阻滞剂的多重预扩增反应。在某些实施方案中,多重预扩增反应包括用于EGFR的外显子19、外显子20,和/或外显子21的野生型阻滞剂,这有利于来自循环NA和cDNA中的突变分子的扩增。在某些实施方案中,野生型阻滞剂是疏水性核酸、桥核酸、肽核酸、具有3'端终止子的任何寡核苷酸,阻止有效检测野生型分子或其组合的任何其它修饰。在某些实施方案中,预扩增步骤是在有利于突变的EGFR序列(而不是野生型序列),例如突变的EGFR外显子19序列,突变的EGFR外显子20序列和/或突变的EGFR外显子21序列的条件下进行的。在某些实施方案中,预扩增反应是单重预扩增反应。在某些实施方案中,预扩增反应和逆转录是在单一步骤中进行的。在下一步骤中,使用基于测序的检测技术例如NGS分析核酸。在某些实施方案中,基于测序的检测技术包含基于PCR的技术。在某些实施方案中,基于测序的检测技术也包括qPCR。在某些实施方案中,qPCR是基于扩增阻碍突变系统(ARMS)的。

[0078] 本文提供的方法和试剂盒可被用来指导具有这种突变的NSCLC患者的治疗,因为这种突变所述患者对第一代酪氨酸激酶抑制剂(TKI)产生耐药性。

[0079] 本文提供的方法和试剂盒与目前的肺癌诊断相比有几个优点。目前检测患者样品中的T790M的方法已例如在Thress et al. (“EGFR mutation detection in ctDNA from NSCLC patient plasma: A cross-platform comparison of leading technologies to support the clinical development of AZD9291”. Lung Cancer, vol. 90 (3): 509-15 (2015))和在Karlovič et al. (“Assessment of EGFR Mutation Status in Matched Plasma and Tumor of NSCLC Patients from a Phase I Study of Rociletinib (C0-1686)”. Clin. Cancer Res., vol. 22 (10): 2386-95 (2016))中有描述。下表显示了在NSCLC患者中检测T790M的这些方法的灵敏性和特异性的实例:

[0080]

	方法	灵敏性	特异性	阳性患者数	阴性患者数	总患者数
Thress <i>et al.</i>	Cobas®	41%	100%	7/17	6/6	23
	Therascreen	29%	100%	5/17	6/6	
	ddPCR	71%	83%	12/17	5/6	
	Beaming	71%	67%	12/17	4/6	
	Cobas	73%	67%	30/41	16/24	65
	Beaming	81%	58%	33/41	14/24	
Karlovič <i>et al.</i>	Cobas	64% (PPA)	98% (NPA)	21/33	61/62	95
	Beaming	73% (PPA)	50% (NPA)	33/45	9/18	63

[0081] 下表显示了AURA3临床试验 (NCT02151981) 的所有三个靶标的敏感性和特异性 (由 J.Laskin 在 International Association for Study of Lung Cancer, “Detection of EGFR mutations from plasma ctDNA in the osimertinib Phase III trial (AURA3): comparison of three plasma assays”, 2017 中提供, 可从 [library.iaslc.org/search-speaker?search\\_speaker=51233](http://library.iaslc.org/search-speaker?search_speaker=51233) 获得)。

[0082]

来自具有有效 cobas 组织 T790M-阳性结果和 匹配的血浆样品的给予奥西替尼的患者亚组的一致数据						
	EGFR T790M		EGFR Ex19Del		EGFR L858R	
试验	PPA	NPA*	PPA	NPA	PPA	NPA
AS-PCR (n=226)	51% (115/226)	NA	85% (132/155)	99% (70/71)	59% (40/68)	100% (158/158)
ddPCR (n=208)	57% (118/208)	NA	72% (102/142)	100% (66/66)	69% (44/64)	99% (141/143)
NGS (n=227)	65% (148/227)	NA	81% (126/156)	99% (70/71)	62% (42/68)	98% (156/159)

[0083] \*由于只获得T790M阳性组织, 所以没有评估对于T790M的特异性。NA: 不适用; NPA: 阴性百分比一致性 (特异性); PPA: 阳性百分比一致性 (灵敏性)。

[0084] 目前肺癌的诊断是由病理学家进行的, 采样肿瘤组织具有明显的内在局限性, 例如肿瘤组织只是一时的应急方法, 容易受到肿瘤异质性造成的选择偏差, 因而难以获得。在某些情况下, 一些患者得不到足够的肿瘤组织样品和/或获取组织样本会引起并发症, 如气胸。然而, 迄今为止, 参考的非标准的患者分层方法一直是组织活检。

[0085] 本文提供的试剂盒和方法利用了观察整个疾病过程和肿瘤环境的能力, 因为有几个过程会导致核酸 (胞外NA) 释放到任何特定的生物流体中。例如, 这些过程有细胞凋亡和坏死。凋亡或坏死细胞可能通过不同的机制 (即凋亡囊泡或作为循环核小体) 释放无细胞核酸。此外, EVs通过活细胞直接从质膜或通过携带核酸进入循环 (exoNA) 的多囊体通路而被主动释放。与目前在患者样品中检测T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的方法相比, 本文提供的方法和试剂盒能够分析肿瘤内同时发生的所有过程。

[0086] 这些方法和试剂盒是新的: 虽然从组织活检的DNA中检测T790M、L858R, 和一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失已常规执行, 除了外来体NA部分, 检测循环NA中的T790M、L858R, 和一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失也是完全新的。这些方法和试剂盒与目前的方法相比也不明显, 因为直到最近人们才认识到, 生物流体中含有可用于诊断测定的肿瘤源性NA。

[0087] 本文提供的工作实施例描述了用于检测EGFR中的T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的完整工作流程,所述EGFR从样品提取到突变调用中使用无细胞NA和细胞外NA作为样品输入材料。虽然工作实施例提供了一个示例性实施方案,但据了解,熟练的技术人员可以修改那里使用的方法,以产生用于检测T790M、L858R,和一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的通用方法。一般来说,如下检测T790M、L858R、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失的存在:

[0088] 1) 存在于细胞外NA和循环NA中的T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失通过使用任何适当的分离手段从血浆或其他生物流体中共分离,包括通过非限制性实例,亲和结合柱或珠、离子交换结合柱或珠,或离心、超离心或聚乙二醇(PEG)沉淀。

[0089] 2) 分离的核酸被逆转录,在这个步骤中,已知量的对照核酸被加入到反应中,作为抑制对照。任何外源性核酸或合成核酸都可以在本文提供的方法中使用。合适的对照包括,通过非限制的例子,来自Q-β噬菌体、病毒颗粒的一种或多种核酸、任何其它外源性核酸序列,以及任何任何其它作为外部掺杂剂(spike-in)的非人类核酸序列。掺杂剂可以是全颗粒(例如,Qβ或其它病毒颗粒、脂质体或蛋白复合物)或仅仅是其核酸。当核酸分离前掺杂剂出现在生物流体中时,整个颗粒是更适合的,而不受脂质复合物、蛋白质复合物或其它保护的“游离”核酸掺杂剂更适合于在核酸纯化后加入样品中。

[0090] 3) 在现阶段,逆转录(RT)反应可以是预扩增的。预扩增步骤发生在野生型钳夹(clamp)或阻滞剂的存在下,产生有变异偏倚的分子群。用于这个步骤的合适的野生型钳夹包括(通过非限制的例子)一个或多个疏水性核酸、一个或多个桥核酸、一个或多个肽核酸、具有3'端终止子的任何寡核苷酸(例如,反向碱基、C3-间隔基、磷酸盐等),或其组合。在某些实施方案中,预扩增步骤发生在任何有利于扩增突变序列而非野生型序列的PCR条件下。在某些实施方案中,不需要预扩增步骤,该方法直接进入下面的qPCR步骤。

[0091] 4) qPCR步骤发生在多重反应中(内源性对照、T790M和/或L858R和/或外显子19插入和/或缺失和抑制对照)。T790M和/或L858R和/或外显子19插入和/或缺失可使用任何合适的检测方法检测,包括那些有利于扩增突变分子而非野生型分子的那些。在某些实施方案中,T790M、L858R,和外显子19插入和/或缺失使用ARMS方法检测。反向引物的3'碱基与突变序列完全匹配(T790M和/或L858R和/或外显子19插入和/或缺失)并且与野生类型模板不匹配。3'端附近的碱基修饰包括修饰的碱基例如2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄基、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷,和锁核酸(LNA's),并包括在碱基之一处的至少一个错配碱基,以增加突变体特异性引物3'端的核酸相互作用。此外,还考虑到突变体特异性引物的一个碱基上有一个额外的错配。在某些实施方案中,至少一个错配碱基是突变特异性引物的第四到最后、倒数第三个、倒数第二个或最后的碱基。

[0092] 5) 为了鉴别或量化患者的疾病结果,使用最先进的机器学习和数据挖掘技术,以根据来自qPCR步骤的几个特征修整模型,例如,但不限于CT值、 $\Delta$ CT值、原始Rn值以及ROX归一化dRn值。

[0093] 6) 确定内部对照的各种边界条件,以便在样品分类之前为质量对照建立过滤器,以排除表现出虚假行为的样品。

[0094] 在某些实施方案中,如下检测T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失的存在:

[0095] 1) 存在于细胞外NA和循环NA中的T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失通过使用亲和结合柱从血浆或其它生物流体中共分离。

[0096] 2) 分离的核酸使用第一链cDNA合成试剂盒进行逆转录。在这个步骤中,4000个拷贝的QB(合成的RNA,外源掺杂剂)被加入到反应中作为抑制对照。

[0097] 3) 使RT反应预扩增。预扩增步骤发生在野生型阻滞剂(疏水性核酸)的存在下,产生一个突变偏倚的分子群。

[0098] 4) qPCR步骤出现在多重反应(内源性对照,T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失和抑制对照)中。T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失使用ARMS方法检测。反向引物的3' 碱基与突变序列(T790M、L858R,和/或外显子19插入和/或缺失)完全匹配且与野生型模板不匹配。3' 端附近的碱基修饰包括修饰的碱基例如2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷,和锁核酸(LNA's),并包括在碱基之一处的至少一个错配碱基,以增加突变体特异性引物3' 端的核酸相互作用。此外,还考虑到突变体特异性引物的一个碱基上有一个额外的错配。在某些实施方案中,至少一个错配碱基是突变特异性引物的第四到最后、倒数第三个、倒数第二个或最后的碱基。

[0099] 5) 为了鉴别或量化患者的疾病结果,使用最先进的机器学习和数据挖掘技术,以根据来自qPCR步骤的几个特征修整模型,例如,但不限于CT值、 $\Delta$ CT值、原始Rn值以及针对任何被动参考(或无被动参考)的归一化dRn值。

[0100] 6) 发明人确定内部对照的各种边界条件,以便在样品分类之前为质量控制建立过滤器,以排除表现出虚假行为的样品。

[0101] 方法和试剂盒被设计以鉴定和检测T790M突变,这是EGFR基因的外显子20中发现的2369C到T的突变;L858R突变,这是EGFR基因外显子21中的2573T到G的突变;和EGFR基因的一个或多个外显子19的插入和/或缺失。本文提供的方法和试剂盒被设计以检测短的扩增子(例如,<200个碱基对),因为循环的游离NA是高度碎裂的。本文提供的方法和试剂盒包括对照分析法(野生型分析法)以限定可扩增的EGFR的量。本文提供的方法和试剂盒使用抑制对照来评估样品中是否存在酶抑制剂。本文提供的方法和试剂盒还包括使用野生型特异性阻滞剂以进一步防止野生型扩增。

[0102] 所述方法和试剂盒包括在引物中使用经修饰的核苷酸。3' 端附近的碱基修饰包括修饰的碱基例如2-氨基嘌呤、8-氨基-2'-脱氧腺苷、三甲氧基苄、C-5丙炔基-脱氧胞苷、C-5丙炔基-脱氧尿苷、2-氨基-2'-脱氧腺苷-5'-三磷酸、2,6-二氨基嘌呤(2-氨基-dA)、反向dT、反向二脱氧-T、羟甲基dC、异-dC、5-甲基dC、氨基乙基-吩噻嗪-脱氧胞苷,和锁核酸(LNA's),并包括在碱基之一处的至少一个错配碱基,以增加突变体特异性引物3' 端的核酸相互作用,以增加T<sub>m</sub>。双链稳定碱基修饰的加入对PCR有积极的影响,从而使其能够在较高的温度下进行,在此范围内已知Taq聚合酶显示出最大的活性。

[0103] 据了解,在此提供特定引物和探针序列的同时,本公开内容的方法和试剂盒也可以使用构成表1所示序列的引物和/或探针序列,也可以使用表1所示序列的修饰版本的引

物和/或探针序列。这些引物和/或探针序列的修饰版本可包括,通过非限制性例子,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组合。

[0104] 据了解,虽然这里提供了用于阳性对照和抑制对照的特定序列,但本公开内容的方法和试剂盒也可以使用构成这些序列的对照序列,或为这些序列的修饰版本的对照序列。这些对照序列的修饰版本可包括,通过非限制性例子,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组合。

[0105] 此外,据了解,这里提供的阳性对照序列和抑制序列的对照都是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的用作阳性对照的合成基因序列。例如,在某些实施方案中,阳性对照序列可以是EGFR基因、EGFR基因的片段,或从EGFR基因衍生的序列,包括,通过非限制性例子,EGFR基因的修饰版本。同样,本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的用作抑制对照的基因序列。例如,在某些实施方案中,抑制对照序列可以是Q- $\beta$ RNA序列、Q- $\beta$ RNA序列的片段,或从Q- $\beta$ RNA序列衍生的序列,包括,通过非限制性例子,Q- $\beta$ RNA序列的修饰版本,以及可用来掺杂到任何给定的生物流体的任何其它非-人序列(即任何病毒/细菌序列)。任何这些对照序列的修饰版本可包括,通过非限制性例子,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组合。

[0106] 本文描述的方法和试剂盒通过将细胞外囊泡捕获到表面并随后将微囊泡溶解以释放其中所含的核酸,特别是RNA来分离EV。EV可能是由真核细胞脱落,或者从质膜上萌发到细胞的外部。这些膜囊泡大小不均匀,直径范围从约10nm-约5000nm。这些微囊包括微囊泡、微囊-样颗粒、前囊体、dextrosomes、纹膜小体、胞外小体、肿瘤小体、凋亡小体、逆转录病毒样颗粒和人内源性逆转录病毒(HERV)颗粒和任何其它涉及此类细胞外结构的术语。由囊泡的胞吐作用释放的小微囊泡(直径约10-5000nm,且更常见30-200nm)在本领域中称为“微囊”。

[0107] 微囊是高质量核酸的丰富来源,由所有细胞分泌,并存在于人类的所有生物流体中。微囊中的RNA实时提供了原发肿瘤、转移瘤和周围微环境的转录组的快照。因此,通过分析准确评估微囊的RNA谱,为疾病的诊断和实时监测提供了指南。这一进展由于目前分离外来体的标准而停滞不前,这是一种缓慢、乏味、可变且不适合诊断环境的方法。

[0108] 本文提供的分离和提取方法和/或试剂盒使用一种基于自旋柱的纯化工艺,使用一种结合微囊的亲膜。分离和提取方法在PCT公布号WO 2016/007755和WO 2014/107571中有进一步的描述,其各自的内容在此完整描述。本公开内容的方法和试剂盒考虑了并行运行大量临床样品的能力,在一个柱上使用0.2到8mL的体积。分离的RNA是高度纯的,由囊泡膜保护,直到溶解,完整的囊泡可以从膜上洗脱。分离和提取程序能够从任何给定的血浆输入中提取所有的mRNA,并且与超离心或直接裂解相比,mRNA/miRNA的产量相等或更好。相反,本文提供的方法和/或试剂盒丰富了miRNAs的微囊结合部分,它们易于扩展,并且易于自动化操作,以适应大量的输入材料。这种扩大规模的能力使人们能够对有趣的、低丰度转录本进行研究。与市场上的其它商业可获得的产品相比,本公开内容的方法和试剂盒提供了独特的能力,如本文所提供的实施例所示。

[0109] 在提取核酸之前从生物样品中分离微囊是有利的,原因如下:1)从微囊中提取核酸,提供了选择性地分析通过分离疾病或肿瘤特异性微囊而获得的疾病或肿瘤特异性核酸,而不是液体样品中的其它微囊的机会;2)与直接从液体样品中提取核酸而不首先分离微囊相比,含有核酸的微囊产生的核酸种类的产率高得多,且具有较高的完整性;3)可扩展性,例如,为了检测低水平表达的核酸,可以通过使用本文描述的方法从更大体积的样品中浓缩微囊来提高灵敏度;4)更纯净或更高质量/完整性的提取核酸,因为在核酸提取步骤之前,排除了在生物样品中自然发现的蛋白质、脂质、细胞碎片、细胞和其它潜在的污染物和PCR抑制剂;5)可以采用核酸提取方法的更多选择,因为分离的微囊部分的体积可以小于起始样品的体积,因此使得使用小体积柱过滤器从这些部分或颗粒中提取核酸成为可能;和6)微囊的分离可以支持自动化,这是有利的,因为它可以防止人为错误,并提供放大能力。

[0110] 本领域已描述了从生物样品中分离微囊的几种方法。例如,在Raposo et al.的论文(Raposo et al.,1996)、Skog et al.的论文(Skog et al.,2008)和Nilsson et al.的论文(Nilsson et al.,2009)中描述了差速离心的方法。离子交换和/或凝胶渗透色谱法在美国专利号6,899,863和6,812,023中有描述。蔗糖密度梯度或细胞器电泳的方法在美国专利号7,198,923中有描述。Taylor和Gercel Taylor的论文(Taylor和Gercel-Taylor,2008)描述了一种磁活化细胞分选(MACS)方法。Cheruvanky et al.的论文(Cheruvanky et al.,2007)描述了一种纳米薄膜超滤浓缩的方法。Miranda et al.的出版物描述了一种Percoll梯度分离方法(Miranda et al.,2010)。此外,微囊可以通过微流控装置从受试者的体液中识别和分离(Chen et al.,2010)。在核酸生物标记的研究开发和商业应用中,从生物样品中以一致、可靠和实用的方式提取高质量的核酸是可取的。

#### [0111] 核酸提取

[0112] 本文公开的方法使用高浓缩的微囊部分从所述微囊泡中提取高质量的核酸。通过本文所述的方法获得的核酸提取可用于需要或优选高质量核酸提取的各种应用,例如用于诊断、预后或监测疾病以及用于任何医学病症例如癌症的其它应用。本文提供的方法和试剂盒可用于检测T790M EGFR突变、L858R EGFR突变、EGFR的一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失,用于诊断非-小细胞肺癌(NSCLC)。

[0113] 分离的微囊的质量或纯度可直接影响提取的微囊核酸的质量,进而直接影响用于疾病诊断、预后和/或监测的生物标记检测的效率和灵敏性。鉴于准确和灵敏的诊断试验在临床领域中的重要性,需要从生物样品中分离高浓度的微囊部分的方法。为了满足这一需要,本发明提供了从生物样品中分离微囊的方法,用于从生物样品中提取高质量的核酸。如本文所示,通过在此描述的方法从生物样品中分离出高浓缩的微囊部分,其中高质量的核酸随后从高浓缩的微囊部分中提取出来。这些高质量的提取核酸可用于测量或评估是否存在有助于疾病或其它医学病症的诊断、预后和/或监测的生物标记。

[0114] 如本文所用的,术语“生物样品”指含有生物材料例如核酸和蛋白的样品。在某些实施方案中,生物样品可以适当地包括来自受试者的体液。体液可以是受试者身体的任何地方(例如外周部位)分离出来的液体,包括但不限于,例如血液、血浆、血清、尿液、痰液、脊髓液、脑脊液、胸腔积液、乳头抽吸液、淋巴液、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的液体、泪液、唾液、乳汁、来自淋巴系统的液体、精液、器官内系统液体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水和细胞培养上清液及其组合。在某些实施方案中,体液是血浆。合适地,可以使用约0.1mL-约100mL液

体的样品体积。体液的适当样品体积是例如,在约0.1ml到约30ml液体的范围内。液体的体积可能取决于几个因素,例如使用的液体类型。例如,血清样品的体积可以为0.1mL-约8mL,例如约0.2mL-8mL。血浆样品的体积可以是约0.1mL-约4mL,例如0.5mL-4mL。尿液样品的体积可以为约10mL-约30mL,例如约20ml。生物样品也可包括粪便或盲肠样品,或从中分离的上清液。

[0115] 术语“受试者”旨在包括被证明或预期具有含核酸的颗粒的所有动物。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。明显异常可以由本人或是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。

[0116] 如本文所用的,术语“核酸”指的是DNA和RNA(包括它们的所有变体,例如微RNA、长RNA等)。核酸可以是单链的,也可以是双链的。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RNAs、微RNA和HERV元件。

[0117] 在一个方面,有用的引物和探针包括与表1中提供的引物或探针具有大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列。还考虑了这样的引物和探针修饰并且可根据标准技术制备。

[0118] 术语“%同一性”在两个或更多个核苷酸序列或氨基酸序列的上下文中,指的是相同或具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸的两个或多个序列或子序列,当比较和比对以用于最大对应时,如使用以下序列比较算法之一或通过目视检查来测量的。例如,%同一性是相对于要比较的序列的编码区域的整个长度。

[0119] 对于序列比较,通常一个序列用作参考序列,测试序列与该序列进行比较。当使用序列比较算法时,测试序列和参考序列被输入到计算机中,如果需要,指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。然后,序列比较算法根据指定的程序参数计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。可使用搜索算法例如BLAST和PSI-BLAST(Altschul et al.,1990,J Mol Biol 215:3,403-410;Altschul et al.,1997,Nucleic Acids Res 25:17,3389-402)确定百分比同一性。

[0120] 在某些实施方案中,高质量核酸提取是一种能检测到18S和28S rRNA的提取方法。在某些实施方案中,提取的18S和28S rRNAs的定量可用于确定核酸提取的质量。在某些实施方案中,18S和28S rRNA的定量比值为约1:1-约1:2,例如,约1:2。理想情况下,通过本文所述方法获得的高质量核酸提取液的RNA完整性数对于低蛋白生物样品(如尿液)也将大于或等于5,对于高蛋白生物样品(如血清),则大于或等于3,以及从20ml低蛋白生物样品或1ml高蛋白生物样品中提取出大于或等于50pg/ml的核酸。

[0121] 高质量的RNA提取是可取的,因为RNA降解会对提取的RNA的下游评估产生不利影响,例如在基因表达和mRNA分析,以及在非-编码RNA例如小NA和微RNA的分析中。本文描述的新方法使人们能够从生物样品中分离的微囊提取高质量核酸,从而能够对微囊中的核酸执行准确的分析。

[0122] 从生物样品分离微囊后,核酸可从分离的或富集的微囊部分提取。为了实现这一点,在某些实施方案中,可首先裂解微囊。微囊的裂解和核酸的提取可用本领域已知的各种方法实现,包括在PCT公布号WO 2016/007755和WO 2014/107571中描述的那些方法,其各自



的内容在此完整描述,这样的方法也可利用核酸-结合柱捕获微囊中包含的核酸。一旦结合,则核酸可使用适合破坏核酸和结合柱之间的相互作用的缓冲液或溶液洗脱,从而成功地洗脱核酸。

[0123] 在某些实施方案中,核酸提取方法还包括消除或减轻阻止从生物样品中提取高质量核酸的不利因素的步骤。这样的不利因素是异质性的,因为不同的生物样品可能含有不同种类的不利因素。在某些生物样品中,诸如过量的DNA等因素可能会影响从这样的样品提取核酸的质量。在其它样品中,诸如过量的内源性RNase等因素可能会影响从这样的样品提取核酸的质量。许多药剂和方法可以用来消除这些不利因素。这些方法和试剂在这里将统称为“提取增强操作”。在某些情况下,提取增强操作可能涉及在生物样品中添加核酸提取增强剂。为了消除诸如内源性RNases等不利因素,本文定义的这种提取增强剂可包括但不限于RNase抑制剂,诸如Superase-in(可市售获自Ambion Inc.)或RnaseINplus(可市售获自Promega Corp.),或其它以类似方式发挥作用的试剂;蛋白酶(其可用作RNase抑制剂);DNase;还原剂;诱饵底物,如合成RNA和/或载体RNA;可与RNase结合的可溶性受体;小干扰RNA(siRNA);RNA结合分子,如抗RNA抗体、碱性蛋白或伴侣蛋白;RNase变性物质,如高渗透压溶液、洗涤剂或其组合。

[0124] 例如,提取增强操作可包括在核酸提取之前,在生物样品和/或分离的囊泡部分中添加RNase抑制剂;例如,在某些实施方案中,对于体积等于或大于1 $\mu$ l的样品,RNase抑制剂的浓度大于0.027AU(I X);或者,对于体积等于或大于1 $\mu$ l的样品,RNase抑制剂的浓度大于0.135AU(5X);或者,对于体积等于或大于1 $\mu$ l的样品,RNase抑制剂的浓度大于0.27AU(10X);或者,对于体积等于或大于1 $\mu$ l的样品,RNase抑制剂的浓度大于0.675AU(25X);或者,对于体积等于或大于1 $\mu$ l的样品,RNase抑制剂的浓度大于1.35AU(50X);其中I X浓度是指其中0.027AU或更多的RNase抑制剂被用来处理从1 $\mu$ l或更多体液中分离的微囊的酶条件,5X浓度指的是其中0.135AU或更多的RNase抑制剂被用来处理从1 $\mu$ l或更多体液中分离的微囊的酶条件,10X蛋白酶浓度指的是其中0.27AU或更多的RNase抑制剂被用来处理从1 $\mu$ l或更多体液中分离出的颗粒的酶条件,25X浓度指的是其中0.675AU或更多的RNase抑制剂被用来处理从1 $\mu$ l或更多体液中分离的微囊的酶条件,和50X蛋白酶浓度指的是其中1.35AU或更多的RNase抑制剂被用来处理从1 $\mu$ l或更多体液中分离出的颗粒的酶条件。优选地,RNase抑制剂是一种蛋白酶,在这种情况下,1AU是释放对应于每分钟1 $\mu$ mol酪氨酸的folin-阳性氨基酸和肽的蛋白酶活性。

[0125] 这些增强剂可以各种方式,例如通过抑制RNase活性(例如,RNase抑制剂),通过蛋白的普遍降解(例如蛋白酶),或通过结合和保护RNAs的伴侣蛋白(例如RNA-结合蛋白)来发挥其作用。在所有情况下,这样的提取增强剂消除或至少减轻生物样品中或与分离颗粒有关的一些或全部不利因素,否则这些不利因素会阻止或干扰从分离的颗粒中提取出高质量的核酸。

[0126] 核酸生物标记的检测

[0127] 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数量(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,在分离的微囊中感兴趣的特定核酸的种类,无论是野生型还是突变型,用本领域已知的方法来鉴定。



[0128] 本发明还包括从生物样品中分离微囊以供高质量核酸提取的新方法的用途,用于(i)辅助诊断受试者,(ii)监测受试者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效果;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记,并且该一种或多种生物标记分别与疾病或其它医学病症的诊断、进展或复发或预测治疗效果相关。

[0129] 为此,本发明进一步体现了通过使用一种方法来区分阳性和阴性样品,为上述目的推导出有临床意义的截止阈值。截止值基于外显子20CT和外显子7CT之间的增量( $\Delta$ )的绝对值。用于估计外显子20、外显子7和Q $\beta$ 的CT值的强度阈值,使用内部网格搜索最佳化,其中一族模型的最佳值是由一个参数网格选择的。用最优强度阈值学习了用于判别阳性和阴性样品之间的 $\Delta$ CT截止值,并根据Youden的J统计量选择。

[0130] 在某些实施方案中,在分析微囊之前扩增其核酸可能是有益的或在其它方面是可取的。核酸扩增的方法是在本领域中普遍使用且广为熟知的,本文对其中的许多例子进行了描述。如有需要,可以进行扩增,使其可以是定量的。定量扩增使得各种核酸的相对量的定量检测成为可能,从而产生基因或表达谱。

[0131] 在某些实施方案中,提取的核酸包括RNA。在这种情况下,RNA在进一步扩增之前被逆转录成互补DNA(cDNA)。这样的逆转录可以单独进行,也可以与扩增步骤结合进行。一种结合逆转录和扩增步骤的方法的例子是逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),它可以进一步改进成为定量的,例如,在美国专利号5,639,606中所述的定量RT-PCR,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:第一步逆转录将RNA转化为cDNA,第二步用定量PCR对cDNA的量进行定量。如下面的例子所示,使用本公开的方法从含有核酸的颗粒中提取的RNAs包括多种转录物,包括但不限于核糖体18S和28SrRNA、微RNA、转移RNA、与疾病或医学病症相关的转录物,以及对医学病症的诊断、预后和监测具有重要意义的生物标记。例如,定量PCR(qPCR)分析测定了每个反应的Ct值(循环阈值)。在qPCR中,通过例如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qPCR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,样品中的对照核酸含量越大)。为了描述本发明,Ct的含义也包括对本领域技术人员也被描述为“交叉点”的“Cp”。Cp指的是放大曲线与垂直阈值线/噪声带相交的点),因此Ct和Cp可以互换使用。导出Ct或Cp的方法包括:1)使用(基线-校正的)扩增曲线穿过某些任意阈值的循环值的传统方法;2)二阶导数极大值(SDM)方法,其中不需要定义任意的阈值;和3)通过使线性回归拟合通过对数线性相位的扩增曲线的“拟合点”方法。在另一个实施方案中,对照核酸的拷贝数可以使用多种本领域认可的技术的任何一种来测量,包括但不限于qPCR或任何其它PCR或无PCR-的方法。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。

[0132] 在某些实施方案中,一种或多种生物标记可以是一个基因畸变或其集合体,在本文用于指含核酸颗粒中的核酸量以及核酸变体。具体而言,基因畸变包括但不限于一个基因(例如癌基因)或一组基因的转录变异、过度表达、一个基因(如肿瘤抑制基因,例如p53或RB)或一组基因的表达不足、一个基因或一组基因的剪接变体的可选产生,基因拷贝数变异(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(SNPs)、染色体重排(例如倒置、缺失和重复)和一个或一组基因的突变(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。

[0133] 核酸扩增方法包括,但不限于聚合酶链反应(PCR)((美国专利号5,219,727)及其变异,如原位聚合酶链反应(美国专利号5,538,871),定量聚合酶链反应(美国专利号5,219,727),嵌套聚合酶链反应(美国专利号5,556,773),自持序列复制及其变异(Guatelli et al.,1990),转录扩增系统及其变异(Kwoh et al.,1989),Qb复制酶及其变异(Miele et al.,1983),冷-PCR(Li et al.,2008),BEAMing(Li et al.,2006)或任何其它核酸扩增方法,之后使用本领域技术人员所熟知的技术检测扩增的分子。如果这样的分子以非常少的数量存在,为检测核酸分子而设计的那些检测方案尤为有用。对于这些方法的讲述,上述参考文献并入本文。在其它实施方案中,不进行核酸扩增的步骤。而是,直接对提取的核酸进行分析(例如,通过下一代测序)。

[0134] 这样的基因畸变的检测可以通过技术人员已知的各种技术来完成。例如,核酸的表达水平、可选剪接变体、染色体重排和基因拷贝数可通过微阵列分析(见例如,美国专利号6,913,879、7,364,848、7,378,245、6,893,837和6,004,755)和定量PCR来检测。尤其可以用Illumina Infinium II全基因组基因分型分析法或Agilent人类基因组CGH微阵列检测拷贝数的变化(Steemers et al.,2006)。核酸修饰可通过例如美国专利号7,186,512和专利公布W02003/023065中所描述的方法进行测定。尤其是甲基化谱可由Illumina DNA Methylation OMA003 Cancer Panel检测。SNPs和突变可通过与等位基因特异性探针杂交、酶突变检测、错配异双链体的化学切割(Cotton et al.,1988)、错配碱基的核糖核酸酶切割(Myers et al.,1985)、质谱分析(美国专利号6,994,960、7,074,563和7,198,893),核酸测序、单链构象多态性(SSCP)(Orita et al.,1989)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)(Fischer and Lerman,1979a;Fischer and Lerman,1979b)、温度梯度凝胶电泳(TGGE)(Fischer and Lerman,1979a;Fischer and Lerman,1979b)、限制性片段长度多态性(RFLP)(Kan and Dozy,1978a;Kan and Dozy,1978b)、寡核苷酸连接测定(OLA)、等位基因特异性PCR(ASPCR)(美国专利号5,639,611)、连接链式反应(LCR)及其变异(Abravaya et al.,1995;Landegren et al.,1988;Nakazawa et al.,1994)、流式细胞术异双链体分析(WO/2006/113590)及其组合/改良检测。值得注意的是,基因表达水平可通过基因表达连续分析(SAGE)技术来检测(Velculescu et al.,1995)(Velculescu et al.,1995)。一般说来,分析基因畸变的方法在许多出版物中都有报道,不限于本文引用的那些,且也可供技术人员使用。合适的分析方法将取决于分析的具体目的、患者的状况/病史以及待检测、监测或治疗的具体癌症、疾病或其它医学病症。对于这些方法的讲述,前述参考文献并入本文。

[0135] 许多生物标记物与受试者是否存在疾病或其它医学病症有关。因此,根据本文公开的方法,从分离的颗粒提取的核酸中检测是否存在EGFR的基因变异,有助于受试者的疾病或其它医学病症如NSCLC的诊断。

[0136] 此外,许多生物标记可能有助于对受试者的疾病或医学状况进行监测。因此,根据本公开的方法,在从分离的颗粒提取的核酸中检测这样的生物标记的存在与否,可有助于监测受试者的疾病或其它医学病症的进展和复发。

[0137] 还发现许多生物标记影响特定患者的治疗效果。因此,根据本文公开的方法,从分离的颗粒提取的核酸中检测这样的生物标记的存在与否,可有助于评估给定患者的给定治

疗的有效性。在从患者的生物样品分离的颗粒中提取的核酸中,这些生物标记物的鉴定可以指导对患者的治疗选择。

[0138] 在本发明上述各方面的某些实施方案中,疾病或其它医学病症是肿瘤性疾病或病症(例如,癌症或细胞增殖性疾病)。在某些实施方案中,疾病或其它医学病症是肺癌。在某些实施方案中,疾病或其它医学病症是非-小细胞肺癌(NSCLC)。

[0139] 用于从生物样品分离微囊的试剂盒

[0140] 本发明的一个方面还涉及本文公开的方法中使用的试剂盒。该试剂盒包括一种捕获表面装置,其足以将生物样品中的微囊从不想要的颗粒、碎片和小分子中分离出来,这些微粒、碎片和小分子也存在于生物样品中,以及用于检测T790MEGFR突变、L858REGFR突变、一个或多个外显子19插入和/或一个或多个外显子19缺失。本发明还任选地包括在分离和可选的后续核酸提取过程中使用上述试剂的说明。

[0141] 实施例

[0142] 表1提供用于本文描述的研究的引物和探针序列:

[0143] 表1. 用于T790M、L858R和外显子19缺失/插入试验的引物/探针序列

[0144]

靶标	名称	序列/修饰	预扩增浓度 μM	qPCR 反应 μM		
EGFR 外显子 7	MA15_49	CTACAACCCCACCACGTACC (SEQ ID NO: 1)	0.2	0.1		
	MA15_50	GGTGGCACCAAAGCTGTATT (SEQ ID NO: 2)	0.2	0.9		
	MA15_51	Cy5/AGATGGATGTGAACCCCGAG/ 3IAbRQSp/-3' (SEQ ID NO: 3) Cy5/ACATACCAGATGGATGTGAAC/ 3IAbRQSp/-3' (SEQ ID NO: 4) Cy5/ATACCAGATGGATGTGAACC/ 3IAbRQSp/-3' (SEQ ID NO: 5)	NA*	0.2		
EGFR 外显子 20	MA14_55	GCCTGCTGGGCATCT (SEQ ID NO: 6)	0.2	0.7		
	MA15_52	AGCCGAAGGGCATGAGCTG (SEQ ID NO: 7)	0.2	NA		
	MA14_56	5'-56-FAM/TCACCTCCA/ZEN/CCGTGCA/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 8) 5'-56-FAM/TCCACC/ZEN/GTGCAGCT/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 9) 5'-56-FAM/ACCTCCA/ZEN/CCGTGCAGC/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 10) 5'-56-FAM/ACCGTGCAG/ZEN/CTCATCA/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 11) 5'-56-FAM/TGCACGGTG/ZEN/GAGGTGAGGC/ 3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 12) 5'-56-FAM/TGAGCTG/ZEN/CACGGTGGA/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 13) 5'-56-FAM/TGCACGG/ZEN/TGGAGGT/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 14) 5'-56-FAM/TGATGAGCTGC/ZEN/ACGGT/3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 15)	NA	0.2		
		MA15_45	GCCGAAGGGCATGAGCTGAG (3'端的 C3 间隔基) (SEQ ID NO: 16) 5-GCATGAGCTGC+GTGATGAG-3- (C3 间隔基) (SEQ ID NO: 17)和 BNA GCCGAAGGGCATGAGCTGC+G-C3 间隔基 (SEQ ID NO: 18) 5'(ZG)AGCT(ZG)C(ZG)TGATG(ZA)3'*** (SEQ ID NO: 19) GCATGAGCTGCGTGATGAG/3SpC3 (SEQ ID NO: 20) CTCATCACGCAGCTCATGC/3InvdT (SEQ ID NO: 21) 5' (ZG)GCATGAGCT(ZG)C(ZG)3'PNA (SEQ ID NO: 22) 5' (ZG)AGCT(ZG)C(ZG)TGATG(ZA)3'PNA (SEQ ID NO: 23)	0.24	NA	
			MA15_42	5'-GCCGAAGGGCATGAGCTGA[A]-3'*** (SEQ ID NO: 24)	NA	0.1
			MA15_46	/SHEX/CGCCAGGCA/ZEN/TATGCTGACGTG/ 3IAbkFQ/-3' (SEQ ID NO: 25)	NA	0.2
			MA15_47	AACGGTCTTGTGACCCATC (SEQ ID NO: 26)	0.2	0.5
MA15_48	CGAACAAAAGCTCGTTCCTC (SEQ ID NO: 27)	0.2	0.5			
EGFR 外显子 21	MA14_120	GGCAGCCAGGAACGTACT (SEQ ID NO: 28)	NA	NA		
	MA17_152	CTTCCGCACCCAGCAGTT (SEQ ID NO: 29)	NA	NA		
	MA15_346	5FAM/TGGGCGGGCCAAA/MGBNFQ (SEQ ID NO: 30) 5FAM/CACAGATTTTGGGCGGG/MGBNFQ (SEQ ID NO: 31) 5FAM/GGGCGGGCCAACTGCTGG/MGBNFQ (SEQ ID NO: 32) 5FAM/TTGGGCGGGCCAAAC/MGBNFQ (SEQ ID NO: 33) 5FAM/ACAGATTTTGGGCGGG/MGBNFQ (SEQ ID NO: 34) 5FAM/TTTGGGCGGGCCAACT/MGBNFQ (SEQ ID NO: 35) 5FAM/GATTTTGGGCGGGCCAAAC/MGBNFQ (SEQ ID NO: 36)	NA NA NA NA NA NA NA	NA NA NA NA NA NA NA		
		MA15_150	GTATGGCCCGCCAAAAT (SEQ ID NO: 37) CCCAGCAGTTTGGCACGG (SEQ ID NO: 38) CAGTTTGGCCCTCCG (SEQ ID NO: 39) GGCCCGCCAAAACCA (SEQ ID NO: 40) CACCCAGCAGTTTGGTCC (SEQ ID NO: 41) GTTTGGCCCGCCCTAT (SEQ ID NO: 42)	NA NA NA NA NA NA	NA NA NA NA NA NA	
			MA15_167	TGGATCCCAGAAGGTGAGAA (SEQ ID NO: 43)	NA	NA
			MA15_163	CGAGGATTTCCTTGTGG (SEQ ID NO: 44)	NA	NA

[0145]

MA17_187	5FAM/AAGCAACAAGGAAATC/MGBNFQ (SEQ ID NO: 45)	NA	NA
	5FAM/AGGAATTAAGAGAAGCAACATC/MGBNFQ (SEQ ID NO: 46)	NA	NA
	5FAM/AGTTAAAAATCCCGTCGCTAT/MGBNFQ (SEQ ID NO: 47)	NA	NA
	5FAM/TTAAAAATCCCGTCGCTATCA/MGBNFQ (SEQ ID NO: 48)	NA	NA
	5FAM/TTAAAAATCCCGTCGCT/MGBNFQ (SEQ ID NO: 49)	NA	NA
	5FAM/AGTTAAAAATCCCGTCG/MGBNFQ (SEQ ID NO: 50)	NA	NA
	5FAM/TTAAAAATCCCGTCGCTATC/MGBNFQ (SEQ ID NO: 51)	NA	NA
	5FAM/TAAAAATCCCGTCGCTATCA/MGBNFQ (SEQ ID NO: 52)	NA	NA
	AGCAACCTTGATAGCGACGG (SEQ ID NO: 53)	NA	NA
	CGGAGATGTTTGATAGCGAC (SEQ ID NO: 54)	NA	NA
	TGTTTGATAGCGACGGGAAT (SEQ ID NO: 55)	NA	NA
	TTTGATAGCGACGGGAATTTAAC (SEQ ID NO: 56)	NA	NA
	GATGTTTGATAGCGACGGGAA (SEQ ID NO: 57)	NA	NA
	GCTTTCGGAGATGTTTG (SEQ ID NO: 58)	NA	NA
	TTCGAATTTTGATAGCGACG (SEQ ID NO: 59)	NA	NA
	TCGGAGATTCCTTGATAGCGA (SEQ ID NO: 60)	NA	NA
	CGGAGATGTGCTTCCTTGAT (SEQ ID NO: 61)	NA	NA
	GGAGATTTCCTTGATAGCGACG (SEQ ID NO: 62)	NA	NA
	TGTTGGCTTCGATTCCTTG (SEQ ID NO: 63)	NA	NA
	TGTTGGCTTCGAGACCTTG (SEQ ID NO: 64)	NA	NA
	TGCGCTTCGGAACCTTGATAG (SEQ ID NO: 65)	NA	NA
	CTTGTTGGCTTCGGAGACTTG (SEQ ID NO: 66)	NA	NA
	CTTTCGGAGCTTGATAGCG (SEQ ID NO: 67)	NA	NA
	TGTTGGCTTCGGAGTCCTT (SEQ ID NO: 68)	NA	NA
	CTTTCGTGTTCTTGATAGCGA (SEQ ID NO: 69)	NA	NA
	CGGAGATACCTTGATAGCGACG (SEQ ID NO: 70)	NA	NA
	CGGAGATGCCTTGATAGCGA (SEQ ID NO: 71)	NA	NA
	TGTTGGCTTCGGAGATGTCT (SEQ ID NO: 72)	NA	NA
	TCGGAGATATTTTGATAGCGACG (SEQ ID NO: 73)	NA	NA
	CGGAGATGTGCGCTCCTTG (SEQ ID NO: 74)	NA	NA
	GCTTTCGGAGATGTGCTCCT (SEQ ID NO: 75)	NA	NA
	GGAGATGTGGAATTTTGATAGCG (SEQ ID NO: 76)	NA	NA
	GCTTTCGGAGATGTTGGTTCC (SEQ ID NO: 77)	NA	NA
	TTCGGATTGTTCTTGATAGCG (SEQ ID NO: 78)	NA	NA
	CGGAGATGTCCTTGATAGCGA (SEQ ID NO: 79)	NA	NA
	CGGAGATGGAATTTTGATAGCG (SEQ ID NO: 80)	NA	NA
	GCTTTCGGAGATGGTTCCTTG (SEQ ID NO: 81)	NA	NA
	GGCTTTCGGAGATGATTCCTT (SEQ ID NO: 82)	NA	NA
	GCTTTCGGAGAAGCAACCTTG (SEQ ID NO: 83)	NA	NA
*NA: 不适用 ***(ZG)和(ZA): Pentabase ***[A]: 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核苷			

MA17\_182

[0146] 实施例1:T790M突变分析工作流程

[0147] 图1A-1C是分析工作流程设计和qPCR概述的一系列说明。图1A描述了细胞外NA和循环NA是如何从血浆中共分离出来并逆转录的。在逆转录步骤,增加了一个扩增对照 (DNA) 和在对照中的一个RNA掺杂物,以确保逆转录和随后的扩增发生(预扩增和多重qPCR)。图1B描述了多重预扩增反应如何包括EGFR的外显子20的野生型阻滞剂,这有利于从循环NA和cDNA中扩增突变分子。图1C描述了qPCR是如何基于扩增阻碍突变系统 (ARMS) 的。

[0148] 该工作流程为来自NSCLC患者的生物流体中细胞外NA和循环NA中T790M的检测提供了一种方法。

[0149] 该实施例中描述的分析法使用扩增阻碍突变检测系统 (ARMS) 对采用PCT公布号WO 2016/007755和WO 2014/107571中描述的提取程序获得的循环NA和细胞外NA中EGFR的外显子20的T790M进行定性和定量检测,每一篇文献的内容通过引用以其整体结合到本文中。

[0150] 要理解虽然表1列出了特定的引物和探针序列,本公开内容的方法和试剂盒也可使用包含以上表1所示序列的引物和/或探针序列,或者为以上表1中所示序列的修饰版本的引物和/或探针序列。这些引物和/或探针序列的修饰版本可包括,通过非限制性实例,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组

合。

[0151] 此外,要理解,表1提供的浓度是示范性的。本公开内容的方法和试剂盒可以使用任何适当浓度的预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合。例如,在某些实施方案中,预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合是约0.05 $\mu$ M-约1 $\mu$ M范围内的浓度及其中的任何值。

[0152] 本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的浓度的预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合。例如,在某些实施方案中,预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合是约0.05 $\mu$ M-约100 $\mu$ M范围内的浓度及其中的任何值,例如约0.05 $\mu$ M-约20 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M-约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M-约10 $\mu$ M,更特别是约1 $\mu$ M、约2 $\mu$ M、约4 $\mu$ M、约8 $\mu$ M、约10 $\mu$ M、约15 $\mu$ M,或约20 $\mu$ M。

[0153] 表2和表3描述了用于预扩增的条件和在本文描述的研究中使用的qPCR引物混合物。

[0154] 表2:50x预扩增引物混合物的制备

储备浓度	组分	体积	最终浓度
NA	H <sub>2</sub> O	14	NA*
100 $\mu$ M	MA15_49	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_50	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_47	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_48	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA14_55	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_52	5	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_45	6	12 $\mu$ M
	最终反应体积	50 $\mu$ L	

[0156] 表3:20x qPCR分析混合物的制备

储备浓度	组分	体积	最终浓度
NA	H <sub>2</sub> O	32	NA*
100 $\mu$ M	MA14_55	14	14 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_42	2	2 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA14_56	4	4 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_49	2	2 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_50	18	18 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_51	4	4 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_47	10	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_48	10	10 $\mu$ M
100 $\mu$ M	MA15_46	4	4 $\mu$ M
	最终反应体积	100 $\mu$ L	

[0158] 要理解表2和3中提供的浓度是示范性的。本公开内容的方法和试剂盒可以使用任何适当浓度的预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合。例如,在某些实施方案中,预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合是约0.05 $\mu$ M-约1 $\mu$ M范围内的浓度及其中的任何值。

[0159] 表4和表5描述了用于样品和对照RT反应的逆转录(RT)混合物。采用以下循环条件:25 $^{\circ}$ C持续10分钟;42 $^{\circ}$ C持续70分钟;85 $^{\circ}$ C持续5分钟,保持于4 $^{\circ}$ C。

[0160] 表4. 样品RT反应的制备

[0161]	组分	样品	主混合物 (9个样品加Q $\beta$ 对照)
	5X VILO反应混合物	4.8	52.8
	10X SuperScript酶混合物	2.4	26.4
	外来体RNA和cfDNA	14	-
	4x10 <sup>3</sup> Q $\beta$ RNA掺剂	1	11
	H <sub>2</sub> O	1.8	19.8
	最终RT反应体积	24	-

[0162] 表5. 对照RT反应物的制备

	组分	阴性对照 RT-VILO 混合物	阳性对照 RT-VILO 混合物
	5X VILO 反应混合物	4.8	4.8
	10X SuperScript 酶混合物	2.4	2.4
[0163]	48 个拷贝的 T790M/外显子 7 gblock (在 DNA lab 中加入)	-	2.08
	H <sub>2</sub> O	16.8	14.72
	最终 RT 反应体积	24	24

[0164] 要理解表4和5中提供的反应和混合物是示范性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的反应和混合物。例如,在某些实施方案中,反应和/或混合物是基于表4和表5中提供的反应和混合物,例如,使用与任何其它合适的第一链DNA合成试剂盒组合的混合物和/或反应物。

[0165] 此外,要理解虽然本文提供的实施例包含单独的逆转录和预放大步骤,本公开内容的方法和试剂盒也可以使用一步过程的逆转录和预扩增。

[0166] 表6A和6B提供预扩增主混合物和用于预扩增反应的循环条件。

[0167] 表6A: 预扩增主混合物的制备

	主混合物储备浓度	预扩增分析法组分	体积/反应( $\mu$ L)	最终浓度
[0168]	2X	Q5 <sup>®</sup> 热启动高保真 2X 主混合物	25	1X
	50X	预扩增引物混合物	1	1X
		输入模板-RT 反应	24	

[0169] 表6B: 循环条件:

	循环条件	
	初始变性	98℃持续 3 分钟
		98℃持续 10 秒
[0170]	14 个循环	60℃持续 20 秒
		72℃持续 10 秒
	最终延伸	72℃持续 2 分钟
	维持	4℃

[0171] 要理解表6A中的混合物和表6B的循环条件是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的混合物和/或循环条件。例如,在某些实施方案中,混合物是基于表6A中提供的混合物,例如,使用表6A中提供的混合物的修饰版本。该混合物的修饰版本可包

括,通过非限制性实例,使用任何合适的高保真酶和/或使用任何合适的RT反应模板,包括但不限于表6A中所示的RT反应模板片段。

[0172] 此外,要理解表6B中提供的循环条件是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的循环条件。例如,循环条件可根据表6B中所示的循环条件修改,例如在表6B中所示值的约5-10%,例如表6B中所示值的5℃内的温度下,和/或在表6B中所示值的约5-10%内的时间。

[0173] 表7A和7B提供qPCR反应混合物和循环条件。

[0174] 表7A:qPCR主混合物的制备

[0175]

主混合物储备浓度	三重 qPCR 分析组分	体积/反应(μL)	最终浓度
NA	H <sub>2</sub> O	8.75	NA
2X	Rotor-Gene 多重 PCR 试剂盒	12.5	1X
50X	ROX	0.5	
20X	分析混合物	1.25	1X
	输入模板	2	-
	最终反应体积	25	

[0176] 表7B:循环条件

[0177]

循环条件		
保持	95℃	5 分钟
循环 x40	95℃	15 秒
	60℃	1 分钟

[0178] 要理解表7A中的混合物和表7B中的循环条件是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的混合物和/或循环条件。例如,在某些实施方案中,混合物是基于表7A中提供的混合物,例如,使用表7A中提供的混合物的修饰版本。该混合物的修饰版本可包括,通过非限制性实例,使用任何合适的主混合物和/或使用任何合适的RT反应模板,包括但不限于表7A中所示的RT反应模板的片段。

[0179] 此外,要理解表7B中提供的循环条件是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的循环条件。例如,循环条件可根据表7B中所示的循环条件修改,例如例如在表7B中所示值的约5-10%,例如表7B中所示值的5℃内的温度下,和/或在表7B中所示值的约5-10%内的时间。

[0180] 对来自210个患者样品的血浆进行了检测。其中105份NSCLC样品在基线时经组织分析被分类为EGFR T790M阳性(即,在用EGFR的突变选择性抑制剂治疗前),和105份NSCLC样品经福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织分析呈阴性,或从个体或合并的健康供体获得。来自每个类别的一半样品(经组织分析为T790M阳性或阴性)被用作训练组群,而其余样品用于验证组群。

[0181] 在经FFPE分析鉴定为T790M阳性的51份来自验证组群的样品中,约37% (19/51) 为胸内(M0-M1a) 疾病或不明M期(MX) 患者,所述患者仅用单独的循环NA分析(不含胞外NA成分) 很难在病史中检测出来。

[0182] 由不同操作员并在不同的日期使用89个不同浓度的T790M(0.75-2660拷贝/mL) 的各个掺杂剂加入合并的健康血浆中,对该试验进行额外的分析验证。



[0183] 210份样品的临床组群被分为阶段匹配训练和验证组群。最佳的Ct截止阈值是通过最大限度地提高Youden的J统计量来估计的,方法是对训练数据进行100次引导,分别进行80%的子训练和20%的子测试分割。训练组群的平均分析敏感性和特异性分别为91% ( $\pm 9\%$ ) 和95% ( $\pm 6\%$ ),平均AUC为94% ( $\pm 6\%$ )。平均精确度、NPV和PPV分别为95% ( $\pm 6\%$ )、92% ( $\pm 7\%$ ) 和95% ( $\pm 6\%$ )。验证组群的灵敏度为92%,特异性为89%,AUC为96%,精确度、NPV和PPV分别为89%、92%和89%。

[0184] 在T790M试验中导出的临床截止阈值包括一系列要满足的值,以便样品被称为阳性。例如,对阳性、阴性和/或QB对照不满足以下质量过滤器的样品孔被排除在外:外显子20Ct在10和40之间,优选在15和35之间;外显子7Ct值在15和35之间,优选在20和30之间;阴性对照(RT和qPCR步骤)Ct值大于30,优选大于35;QB对照Ct值在15-30之间,优选在20-25;Q $\beta$ 分析法(抑制对照): $\Delta$ Ct (Ct样品-Ct对照孔) 小于20,优选10;T790M测定阳性: $\Delta$ Ct (Ct样品-Ct对照孔) 小于30,优选25;外显子7测定法有效:Ct样品小于25,优选20。

[0185] 图2是描述本研究中使用的T790M检测分析法的分析性能的图表。Canchola et al. ("Limit of Detection (LoD) Estimation Using Parametric Curve Fitting to (Hit) Rate Data: The LoD\_Est SAS<sup>®</sup> Macro". Working paper (2016), 在DOI:10.13140/RG.2.1.3622.9203获得) 将检测限 (LoD) 定义为可持续检测的材料、靶或被分析物的最低浓度或数量(CI 95%)。如图2中所示,本文描述的研究的LOD是21个拷贝/mL (95%CI: 9-38拷贝/mL)。1.5拷贝/mL被检测到14%的时间,和12.5拷贝/mL被检测到100%的时间。LOD仅受物质的存在的限制。

[0186] 图3是描述T790M检测分析法在临床验证组群中的临床表现的图表。验证组群的AUC是96%。

[0187] 这是第一种结合循环NA和细胞外NA的CLIA-验证的基于qPCR方法,它能在该样品选择中检测T790M(其中37%的患者有胸内或未知的疾病期),其灵敏性为92%和特异性为89%。这是迄今为止报道的最高水平的灵敏性和特异性。

[0188] 实施例2:T790M分析法的开发

[0189] 本文所描述的研究表明,在ARMS引物中使用一个短扩增子和一个修饰的核苷酸来检测和分析高度碎裂的样品材料的优点。

[0190] 图4是一个图表,描述了一个大的和短的扩增子(有或没有碱基修饰)的比较,以检测高度降解的DNA中的突变。使用具有已知%的T790M(野生型,50%、20%、6.5%) 和不同大小的扩增子192bp(见例如,Leelatian et al., "Highly sensitive EGFR mutation detection by specific amplification of mutant alleles" Exp Mol Pathol., vol.96 (1):85-91 (2014)) 和引物上具有和没有碱基修饰的62bp的市售FFPE。图4显示,具有碱基修饰的62bp产生最早的Ct值。

[0191] 图5A和5B是一系列图表,描述了包括修饰的核苷酸在内的ARMS引物和不包括修饰的核苷酸的ARMS引物的比较。这些图显示了当将碱基修饰结合到ARMS引物中时用于T790M的早期Ct的优点。最佳两种条件下的效率和线性如图5B所示。

[0192] 图6是证明本文所述的测定能够适应增加量的来自正常健康血浆的细胞外NA和循环NA的能力的曲线图。

[0193] 实施例3:L858R和外显子19缺失/插入突变分析法工作流程

[0194] L858R和外显子19缺失/插入突变检测的测定工作流程也符合图1A-1C中所公开的内容。图1A描述了细胞外NA和循环NA是如何从血浆中共分离出来并逆转录的。在逆转录步骤中,加入扩增对照(DNA)和在对照品中的RNA掺杂剂,以确保逆转录和随后的扩增发生(预扩增和多重qPCR)。图1B描述了多重预扩增反应如何包括相应的野生型L858R和EGFR外显子19缺失和插入突变的野生型阻滞剂,这有利于从循环NA和cDNA中扩增突变分子。图1C描述了qPCR是如何基于扩增阻碍突变系统(ARMS)的。

[0195] 该工作流程提供一种从NSCLC患者的生物流体检测细胞外NA和循环NA中L858R和外显子19缺失和插入突变的方法。

[0196] 该分析法在这个实施例中描述了使用扩增阻碍突变检测系统(ARMS),对采用PCT公布号WO 2016/007755和WO 2014/107571中描述的提取程序获得的循环NA和细胞外NA中EGFR的L858R和外显子19缺失和插入突变的定性和定量检测,其每一篇的内容以其整体并入本文。

[0197] 要理解虽然表1列出了特异性引物和探针序列,本公开内容的方法和试剂盒也可使用包含以上表1中所示的序列的引物和/或探针序列,或为本文所示序列的修饰版本的引物和/或探针序列。这些引物和/或探针序列的修饰版本可包括,通过非限制性实例,将一个或多个核苷酸添加到5'端,将一个或多个核苷酸添加到3'端,将一个或多个核苷酸添加到5'端和3'端,添加尾部,缩短序列,延长序列,将序列上下游移动几个碱基,或其任何组合。

[0198] 此外,要理解本发明中公开的浓度是示例性的。本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的浓度的预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合。例如,在某些实施方案中,预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合是在约0.05 $\mu$ M-约1 $\mu$ M范围内的浓度和其中之间的任何值。

[0199] 在某些实施方案中,PCR增强剂或PCR添加剂被包括在预扩增或qPCR反应中,或其反应组合中。增强剂或添加剂从由7-脱氮-2'-脱氧鸟苷;7-脱氮dGTP、甜菜碱(N,N,N-三甲基甘氨酸、BSA(牛血清白蛋白)、DMSO(二甲亚砷)、甲酰胺、非-离子洗涤剂,如triton X-100、吐温20或Nonidet P-40(NP-40)、TMAC(氯化四甲铵)、AmpFLSTR<sup>TM</sup>和适体组成的列表中选择。

[0200] 本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的浓度的预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合。例如,在某些实施方案中,预扩增浓度、qPCR反应浓度,或其组合是约0.05 $\mu$ M-约100 $\mu$ M范围内的浓度和其中之间的任何值,例如约0.05 $\mu$ M-约20 $\mu$ M、约0.05 $\mu$ M-约1 $\mu$ M、约1 $\mu$ M-约10 $\mu$ M,更特别是约1 $\mu$ M、约2 $\mu$ M、约4 $\mu$ M、约8 $\mu$ M、约10 $\mu$ M、约15 $\mu$ M,或约20 $\mu$ M。

[0201] 本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的反应和混合物。

[0202] 此外,要理解虽然本文提供的实例包含单独的逆转录和预扩增步骤,本公开内容的方法和试剂盒也可以使用逆转录和预扩增的单个步骤过程,或者不使用预扩增。

[0203] 本公开内容的方法和试剂盒可使用任何合适的混合物和/或循环条件。混合物可包括,通过非限制性实例,使用任何合适的高保真酶和/或使用任何合适的RT反应模板,包括但不限于RT反应模板的片段。

[0204] 该混合物可包括,通过非限制性实例,使用任何合适的主混合物和/或使用任何合适的RT反应模板,包括但不限于RT反应模板的片段。

[0205] 表1是用于L858R(外显子21)突变试验探针的序列列表,以及用于外显子19缺失/插入突变试验探针的序列列表。

[0206] 图7是展示L858R和De119检测分析法的性能的图。如图所示,野生型样品和突变型样品之间有明显的分离。

[0207] 在L858R和外显子19缺失/插入试验中导出的临床截止阈值包括一系列要满足的值,以便一个样品被称为阳性。不加限制地,对阳性,阴性和/或Q $\beta$ 对照没有满足下列质量过滤器的样品孔被排除在外:外显子19或外显子21Ct在10和40之间,优选在15和35之间;外显子7Ct值在15和35之间,优选在20和30之间;阴性对照(RT和qPCR步骤)Ct值大于30,优选大于35;Q $\beta$ 对照Ct值在15-30之间之间,优选在20-25之间;Q $\beta$ 分析法(抑制对照): $\Delta$ Ct(Ct样品-Ct对照孔)小于20,优选为10;L858R和外显子19缺失/插入分析法阳性: $\Delta$ Ct(Ct样品-Ct对照孔)小于30,优选为25;外显子7分析法有效:Ct样品小于25,优选为20。

[0208] 其它实施方案

[0209] 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,该范围由附加权利要求书的范围界定。其它方面、优点和修改都在以下范围内。

## 序列表

	<110> EXOSOME DIAGNOSTICS, INC.	
	<120> 使用来自非-小细胞肺癌患者的外来体 RNA 和无细胞 DNA 检测血浆中的突变的方法和组合物	
	<130> EXOS-029/001W0 322142-2289	
	<140>	
	<141>	
	<150> 62/428,059	
	<151> 2016-11-30	
	<160> 83	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 1	
	ctacaacccc accacgtacc	20
[0001]	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 2	
	ggtggcacca aagctgtatt	20
	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成探针"	
	<400> 3	
	agatggatgt gaaccccgag	20
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

[0002]	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"		
	<400> 4		
	acataccaga tggatgtgaa c		21
	<210> 5		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"		
	<400> 5		
	ataccagatg gatgtgaacc		20
	<210> 6		
	<211> 15		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"		
	<400> 6		
	gcctgctggg catct		15
	<210> 7		
	<211> 19		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"		
	<400> 7		
	agccgaaggg catgagctg		19
	<210> 8		
	<211> 16		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"		
	<400> 8		
	tcacctccac cgtgca		16

[0003]	<210> 9	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 9	
	tccaccgtgc agct	14
	<210> 10	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 10	
	acctccaccg tgcagc	16
	<210> 11	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 11	
	accgtgcagc tcatca	16
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 12	
	tgccacggtgg aggtgaggc	19
	<210> 13	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	

	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 13 tgagctgcac ggtgga	16
	<210> 14	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 14 tgcacggtgg aggt	14
	<210> 15	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
[0004]	<400> 15 tgatgagctg cacggt	16
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"	
	<400> 16 gccgaagggc atgagctgag	20
	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (12)..(12)	
	<223> 锁核酸	

	<400> 17	
	gcatgagctg cgtgatgag	19
	<210> 18	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (20).. (20)	
	<223> 锁核酸	
	<400> 18	
	gccgaagggc atgagctgcg	20
	<210> 19	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
[0005]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (6).. (6)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (8).. (8)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (14).. (14)	
	<223> Pentabase	
	<400> 19	
	gagctgcgtg atga	14
	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	



	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 20	
	gcatgagctg cgtgatgag	19
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 21	
	ctcatcacgc agctcatgct	20
	<210> 22	
	<211> 13	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
[0006]	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (11).. (11)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (13).. (13)	
	<223> Pentabase	
	<400> 22	
	ggcatgagct gcg	13
	<210> 23	
	<211> 14	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	

	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (1).. (1)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (6).. (6)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (8).. (8)	
	<223> Pentabase	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (14).. (14)	
	<223> Pentabase	
	<400> 23	
	gagctgcgtg atga	14
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0007]	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<220>	
	<221> 修饰的碱基	
	<222> (20).. (20)	
	<223> 2,6-二氨基嘌呤-2'-脱氧核苷	
	<400> 24	
	gccgaagggc atgagctgaa	20
	<210> 25	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成探针"	
	<400> 25	
	cgccaggcat atgctgacgt g	21
	<210> 26	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"		
	<400> 26		
	aacggttctt gtgacccatc	20	
	<210> 27		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"		
	<400> 27		
	cgaacaaaag ctcgttcctc	20	
	<210> 28		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
[0008]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"		
	<400> 28		
	ggcagccagg aacgtact	18	
	<210> 29		
	<211> 18		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"		
	<400> 29		
	cttcgcgacc cagcagtt	18	
	<210> 30		
	<211> 13		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成探针"		
	<400> 30		
	tgggcgggcc aaa	13	

[0009]	<210> 31	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 31	
	cacagatttt ggcggg	17
	<210> 32	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 32	
	gggcgggcca aactgctgg	19
	<210> 33	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 33	
	ttgggcgggc caaac	15
	<210> 34	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 34	
	acagattttg ggcgggc	17
	<210> 35	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	

	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 35	
	tttgggcggg ccaaact	17
	<210> 36	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 探针"	
	<400> 36	
	gattttgggc gggccaaac	19
	<210> 37	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"	
[0010]	<400> 37	
	gtatggcccg cccaaaat	18
	<210> 38	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"	
	<400> 38	
	cccagcagtt tggcacgg	18
	<210> 39	
	<211> 15	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成 引物"	
	<400> 39	
	cagtttgccc ctccg	15
	<210> 40	
	<211> 16	

[0011]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 40	
	ggcccgccca aaacca	16
	<210> 41	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 41	
	caccagcag ttgtcc	18
	<210> 42	
	<211> 16	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 42	
	gttgcccg ccctat	16
	<210> 43	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 43	
	tggatcccag aagtgagaa	20
	<210> 44	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	

[0012]	<400> 44	
	cgaggatttc cttgttgg	18
	<210> 45	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 45	
	aagccaacaa ggaaatc	17
	<210> 46	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 46	
	aggaattaag agaagcaaca tc	22
	<210> 47	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 47	
	agttaaaatt cccgtcgcta t	21
	<210> 48	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"	
	<400> 48	
	ttaaaattcc cgtegtatc aa	22
	<210> 49	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"		
	<400> 49		
	ttaaaattcc cgtcgct	17	
	<210> 50		
	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"		
	<400> 50		
	agttaaaatt cccgtcg	17	
	<210> 51		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
[0013]	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"		
	<400> 51		
	ttaaaattcc cgtcgctatc	20	
	<210> 52		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 探针"		
	<400> 52		
	taaaattccc gtcgctatca	20	
	<210> 53		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<221> 来源		
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 引物"		
	<400> 53		
	agcaaccttg atagcgacgg	20	



[0014]	<210> 54	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 54	
	cggagatgtt ttgatagcga c	21
	<210> 55	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 55	
	tgttttgata gcgacgggaa t	21
	<210> 56	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 56	
	tttgatagcg acggaattt taac	24
	<210> 57	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 57	
	gatgttttga tagcgacggg aa	22
	<210> 58	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	

	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 58	
	gctttcggag atgttttg	18
	<210> 59	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 59	
	ttcgggaattt tgatagcgac g	21
	<210> 60	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
[0015]	<400> 60	
	tcggagattc cttgatagcg a	21
	<210> 61	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 61	
	cggagatgtt gcttccttga t	21
	<210> 62	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 62	
	ggagatttcc ttgatagcga cg	22
	<210> 63	
	<211> 21	

[0016]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 63	
	ttgttgctt tcgattcctt g	21
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 64	
	ttgttgctt tcgagacctt g	21
	<210> 65	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 65	
	ttggctttcg gaaccttgat ag	22
	<210> 66	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 66	
	cttgttggtt ttcggagact tg	22
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	

[0017]	<400> 67	
	ctttcggagc cttgatagcg	20
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 引物"	
	<400> 68	
	ttgttggtt tcggagtcct t	21
	<210> 69	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 引物"	
	<400> 69	
	ctttcgtgtt cttgatagc ga	22
	<210> 70	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 引物"	
	<400> 70	
	cggagatacc ttgatagcga cg	22
	<210> 71	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成 引物"	
	<400> 71	
	cggagatgcc ttgatagcga	20
	<210> 72	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 72	
	ttgttggtt tcggagatgt ct	22
	<210> 73	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 73	
	tcggagatat ttgatagcg acg	23
	<210> 74	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
[0018]	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 74	
	cggagatgtt gcgctccttg	20
	<210> 75	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 75	
	gctttcggag atgtgctcct	20
	<210> 76	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 76	
	ggagatgttg gaattttgat agcg	24

	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 77	
	gctttcggag atgttggttc c	21
	<210> 78	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 78	
	ttcggattgt tccttgatag cg	22
	<210> 79	
	<211> 21	
	<212> DNA	
[0019]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 79	
	cggagatgtc cttgatagcg a	21
	<210> 80	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述: 合成引物"	
	<400> 80	
	cggagatgga attttgatag cg	22
	<210> 81	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	

	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 81	
	gctttcggag atggttcctt g	21
	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
[0020]	<400> 82	
	ggctttcgga gatgattcct t	21
	<210> 83	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 来源	
	<223> /注释="人工序列的描述：合成引物"	
	<400> 83	
	gctttcggag aagcaacctt g	21

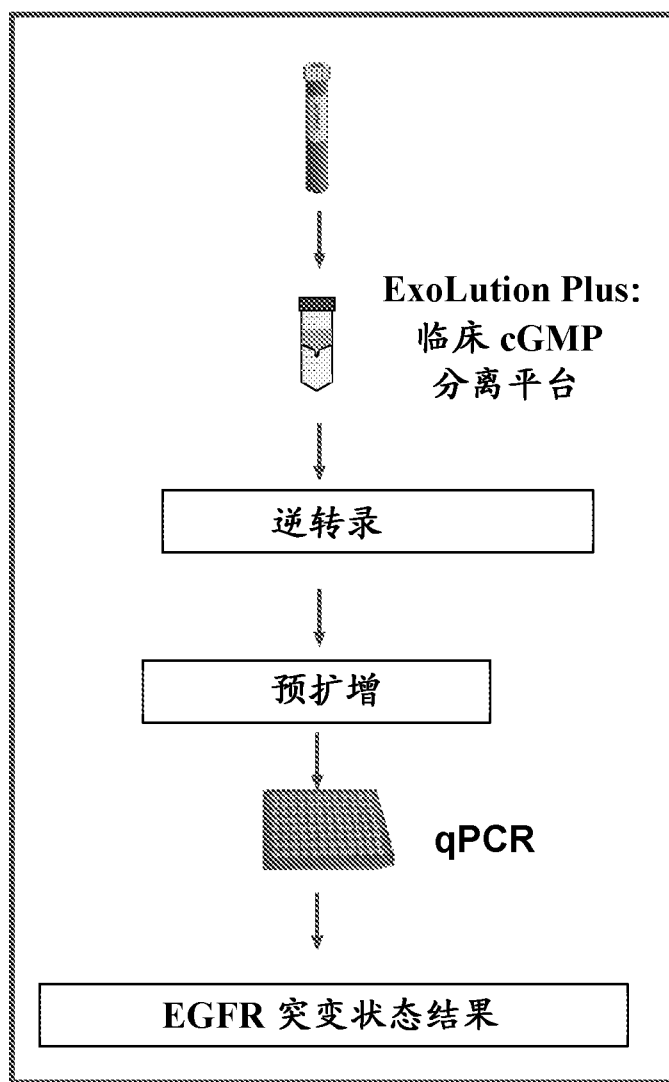


图 1A

B

突变体优先的预扩增

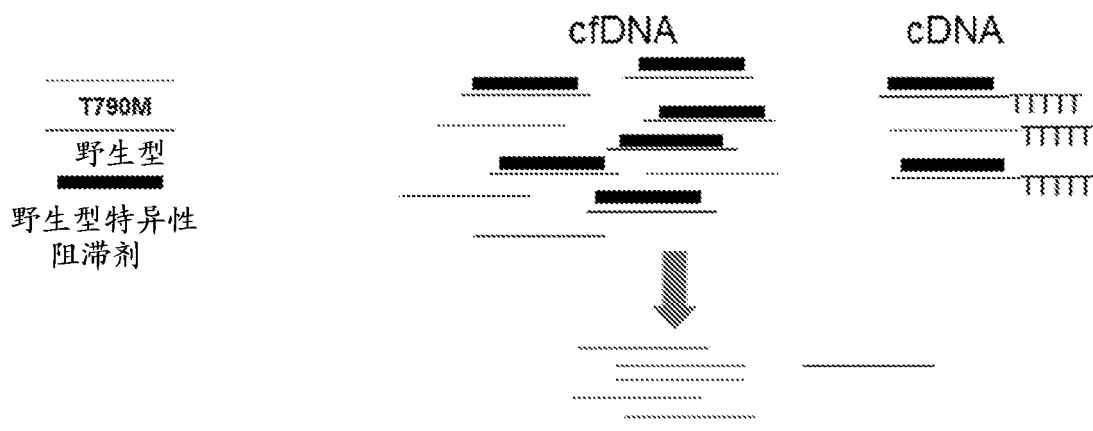


图 1B



C

## 突变体特异性 qPCR

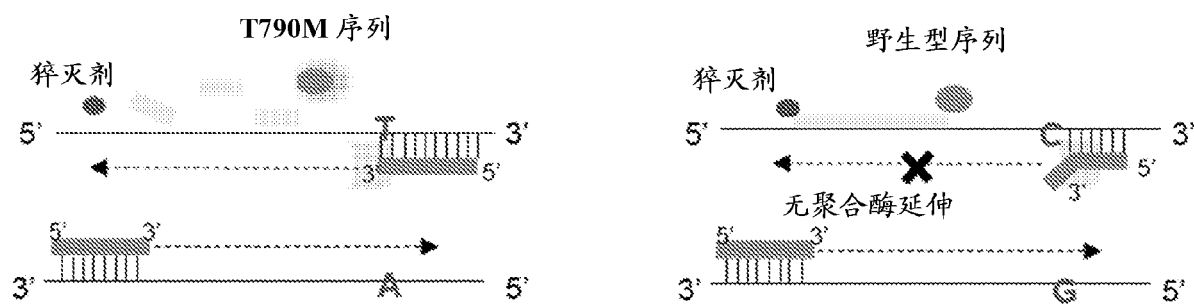


图 1C

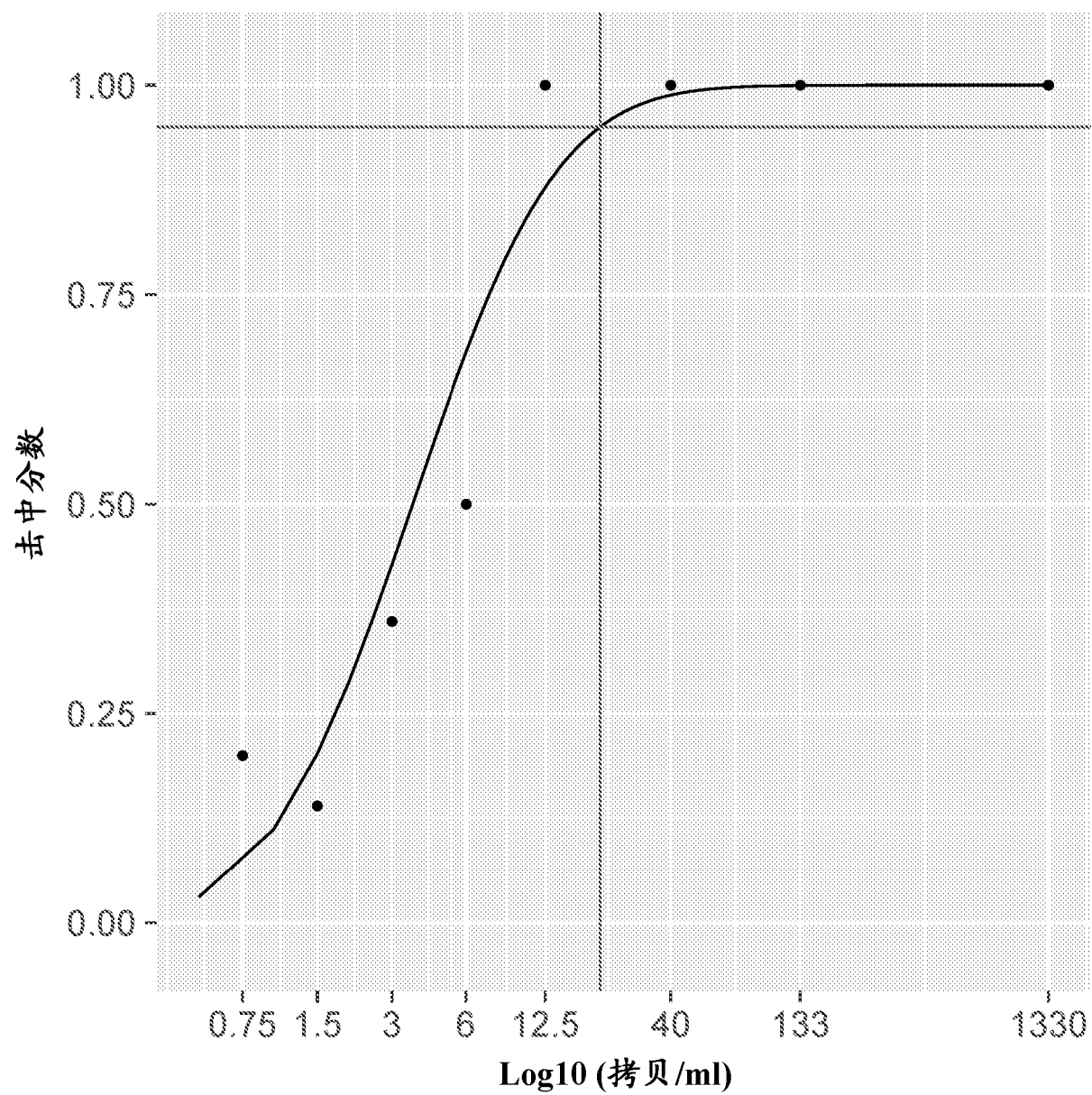
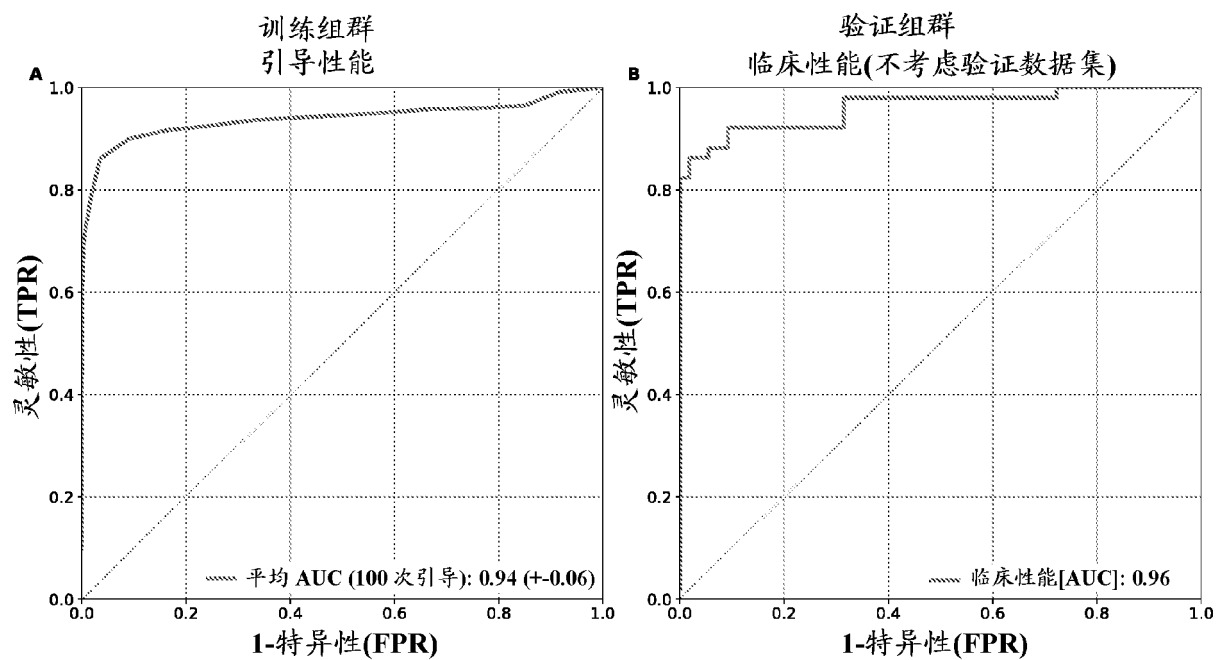


图 2



参数	训练数据(StDev)	临床验证数据
AUC	0.94 ( $\pm 0.06$ )	0.96
特异性	0.95 ( $\pm 0.06$ )	0.89
灵敏度	0.91 ( $\pm 0.09$ )	0.92
准确性	0.93 ( $\pm 0.06$ )	0.91
精确度	0.95 ( $\pm 0.06$ )	0.89
阴性预测值	0.92 ( $\pm 0.07$ )	0.92
阳性预测值	0.95 ( $\pm 0.06$ )	0.89

图 3

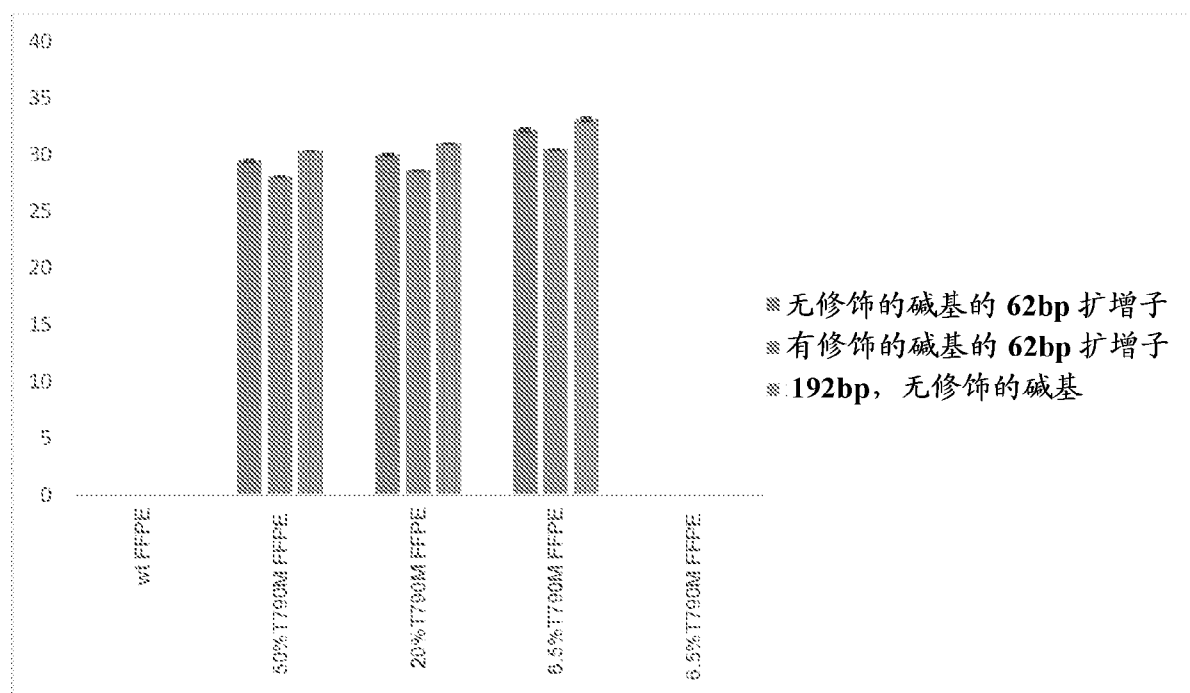


图 4

## T790M 和野生型的 Ct 值

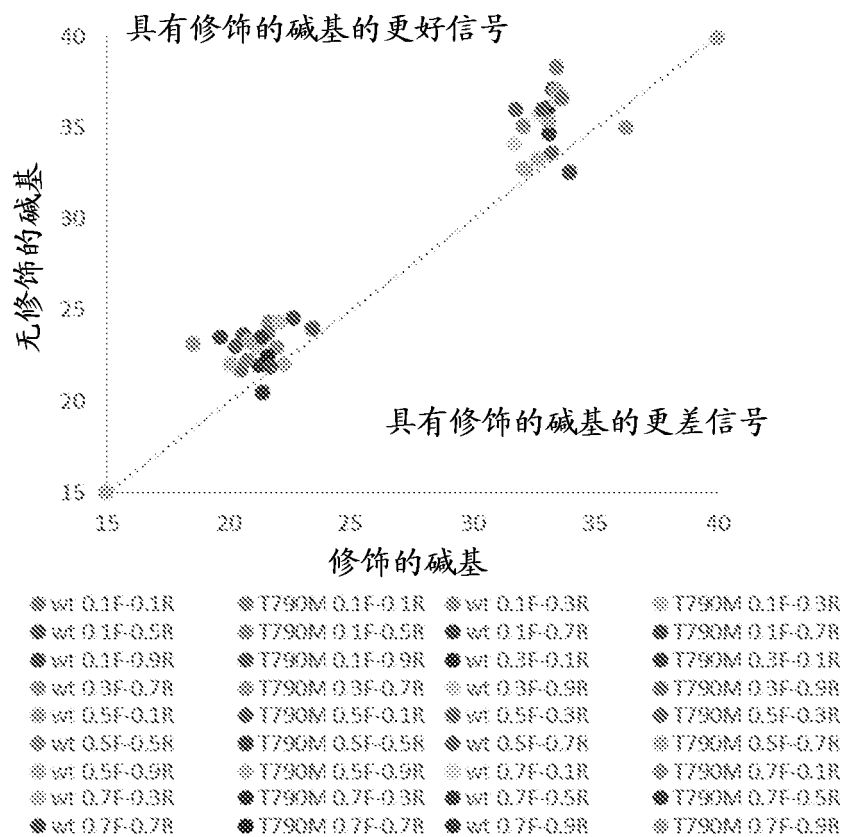


图 5A

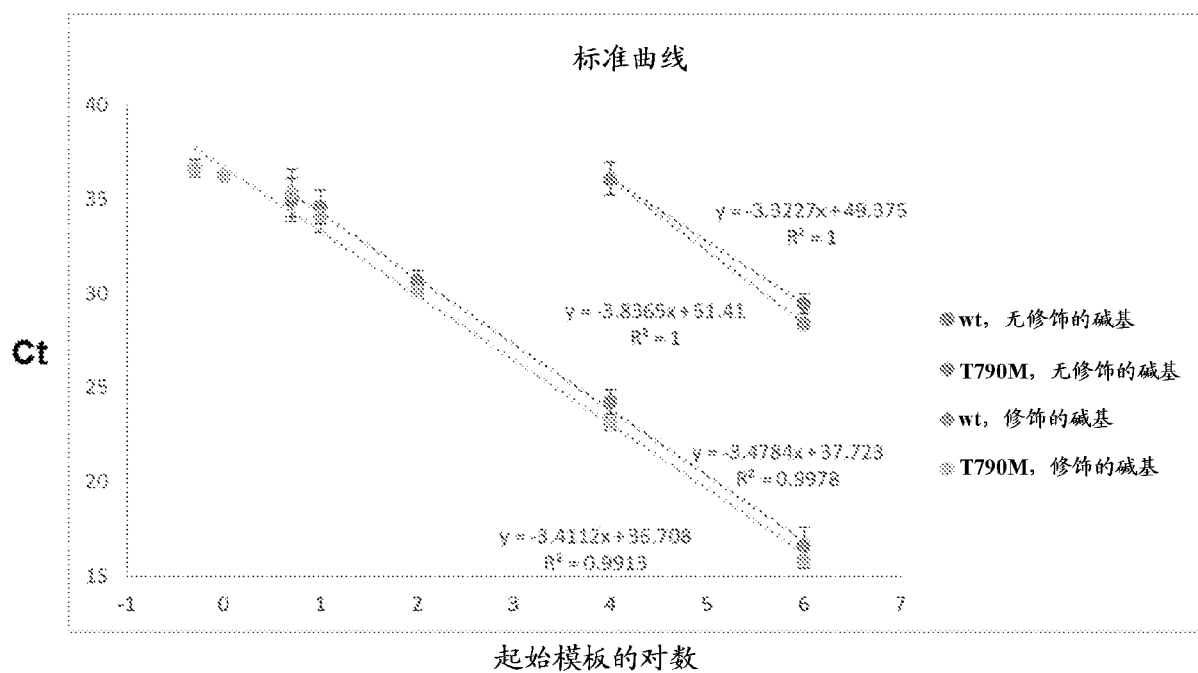


图 5B

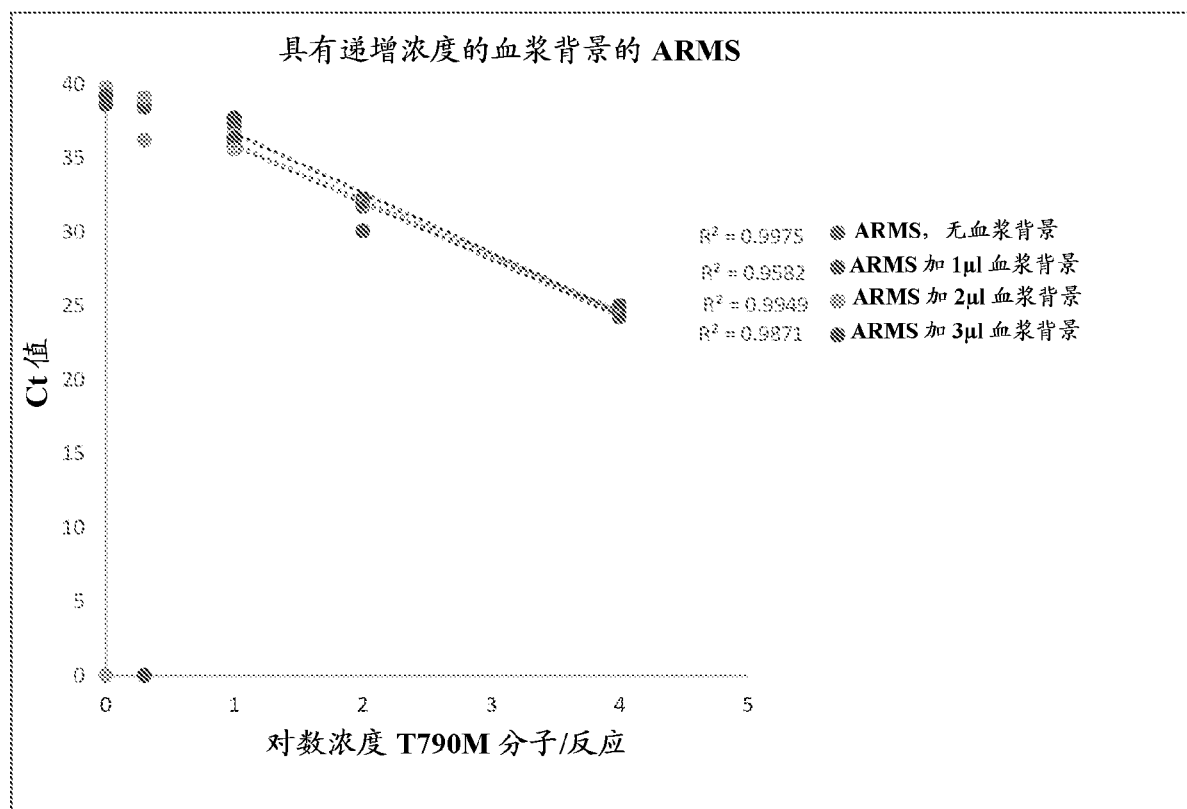


图 6

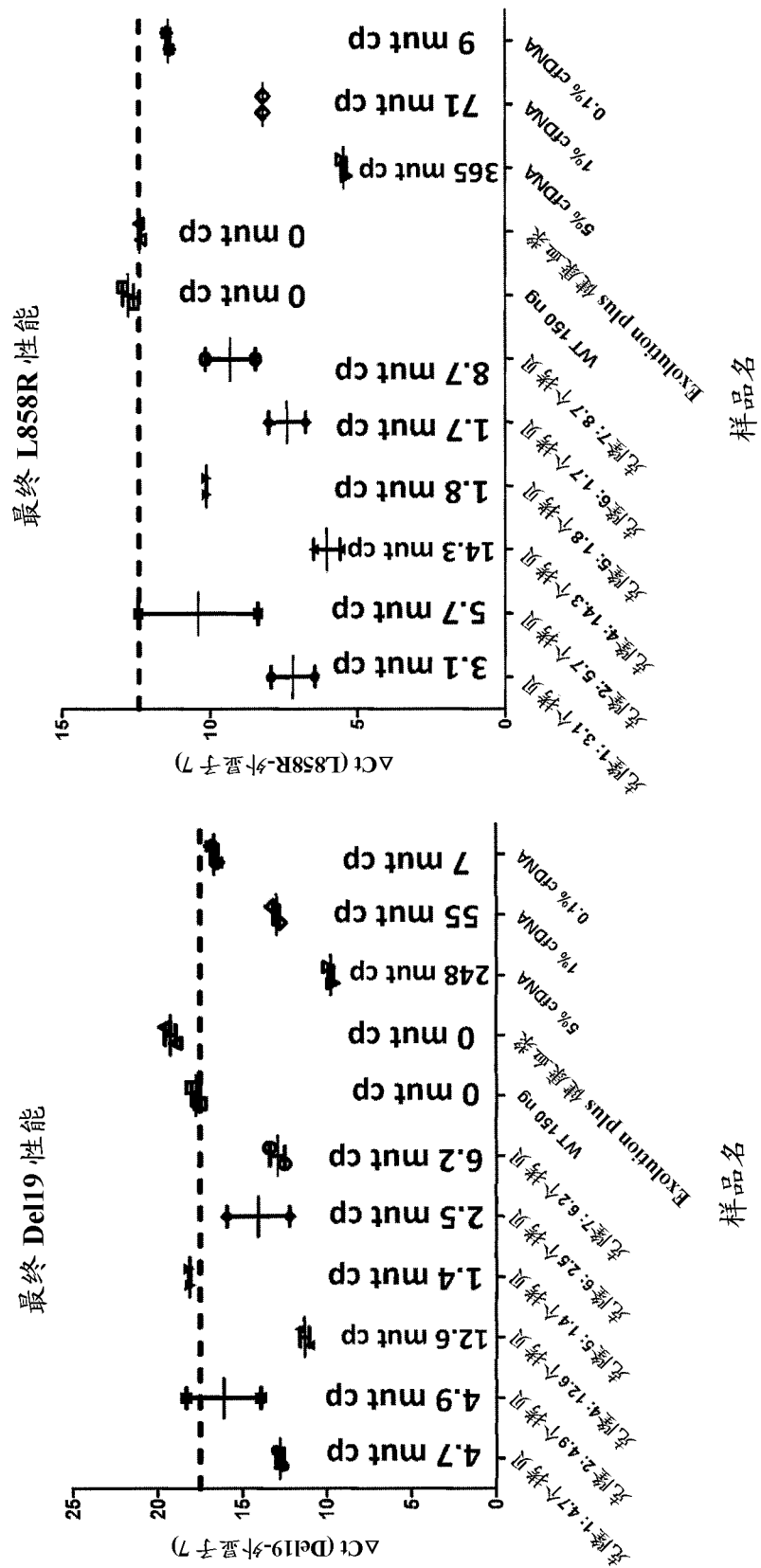


图 7