(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113631725 A
(43)申请公布日 2021.11.09

(21)申请号 202080024007.0
(22)申请日 2020.02.07
(30)优先权数据
62/802,994 2019.02.08 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/017224 2020.02.07
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/163724 EN 2020.08.13
(71)申请人 得克萨斯州大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州
(72)发明人 拉古·卡尔卢里
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 张福誉 刘振佳
(51)Int.Cl.
C12Q 1/689(2018.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

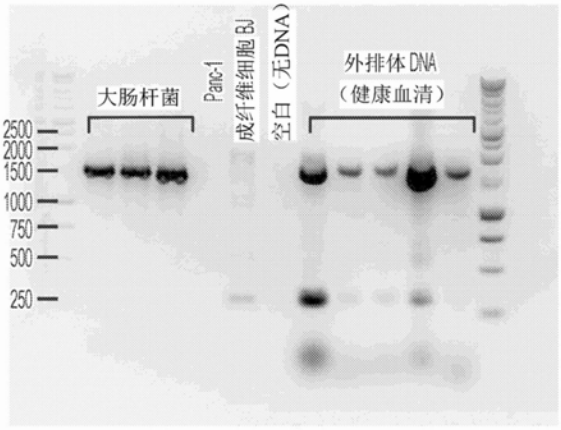
权利要求书1页 说明书10页
序列表2页 附图1页

(54)发明名称

用于诊断和治疗目的的对外排体相关微生物组的分离和检测

(57)摘要

本发明提供了通过分析分离的外排体中存在的微生物组特征标记来在患者中对疾病进行预测、诊断和预后的方法。在一个实施方案中，本文中提供了在患者中检测微生物组的方法，所述方法包括：(a)从患者获得体液样品；(b)分离所述体液样品的外排体级分；以及(c)检测所述外排体级分中存在的微生物大分子。



CN 113631725 A

1.在患者中检测微生物组的方法,所述方法包括:

(a)从患者获得体液样品;

(b)分离所述体液样品的外排体级分;以及

(c)检测所述外排体级分中存在的微生物大分子。

2.权利要求1所述的方法,其中所述微生物组是微生物组特征标记。

3.权利要求1所述的方法,其中所述微生物组包含两种或更多种细菌物种。

4.权利要求1所述的方法,其中所述微生物大分子是微生物核酸分子。

5.权利要求4所述的方法,其中所述微生物核酸分子是微生物DNA分子。

6.权利要求5所述的方法,其中所述微生物核酸分子是微生物16SrRNA基因。

7.权利要求4所述的方法,其中所述微生物核酸分子是微生物RNA分子。

8.权利要求1所述的方法,其中所述微生物大分子是微生物蛋白质。

9.权利要求2所述的方法,其中该微生物特征标记指示疾病的风险因素。

10.权利要求9所述的方法,其中将该微生物特征标记与已知与疾病相关的微生物特征标记进行比较。

11.权利要求10所述的方法,其中该微生物特征标记指示所述患者中的疾病。

12.权利要求1所述的方法,其中所述患者是健康患者。

13.权利要求1所述的方法,其中所述患者处于缓解中并且所述方法是检测复发的方法。

14.权利要求1所述的方法,其中所述体液样品是血液、淋巴、唾液、痰、尿、脑脊液、骨髓抽吸物、眼渗出物/泪或血清。

15.权利要求11所述的方法,其中所述疾病是癌症、遗传印记病症、神经病症、自身免疫病或代谢紊乱。

16.权利要求11所述的方法,其中所述疾病是癌症,其中所述方法还包括从所述外排体级分中分离包含磷脂酰肌醇蛋白聚糖1的外排体。

17.权利要求16所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食管癌、气管癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。

18.权利要求11所述的方法,其还包括向所述患者施用治疗剂。

19.权利要求18所述的方法,其中所述疾病是癌症,其中所述治疗剂是抗癌治疗。

20.权利要求11所述的方法,其还包括报告对所述患者的诊断。

21.权利要求20所述的方法,其中报告包括准备书面或电子报告。

22.权利要求21所述的方法,其还包括向所述患者、医生、医院或保险公司提供所述报告。

23.权利要求1所述的方法,其中所述患者是人。

24.权利要求1所述的方法,其还包括第二次进行所述方法。

25.权利要求24所述的方法,其中所述第二次是在最初进行所述方法之后至少一天、一周或一个月。

用于诊断和治疗目的的对外排体相关微生物组的分离和检测

[0001] 相关申请的引用

[0002] 本申请要求2019年2月8日提交的美国临时申请号62/802,994的优先权权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 背景

1.技术领域

[0004] 本发明一般地涉及医学领域。更特别地,其涉及循环外排体中微生物组的检测。甚至更特别地,其涉及在疾病的分析和治疗中检测循环外排体中的微生物组。

2.背景技术

[0005] 近年来,人结肠和其他组织中存在的微生物组已被确定为是个体健康的重要决定因素。事实上,肿瘤相关微生物组和结肠相关微生物组已被确定为对癌症治疗(包括免疫治疗)具有影响。需要用于确定微生物组是否可影响个体的健康和确定疾病的未来风险的方法。

[0006] 发明概述

[0007] 血液中的外排体携带微生物组相关标志物,例如核酸。因此,本发明提供了对从人血清样品分离的外排体中存在的微生物组进行分析和检测方法。

[0008] 在一个实施方案中,本文中提供了在患者中检测微生物组的方法,该方法包括:(a)从患者获得体液样品;(b)分离体液样品的外排体级分(exosome fraction);以及(c)检测外排体级分中存在的微生物大分子。在一些方面中,体液样品是血液、淋巴、唾液、痰、尿、脑脊液、骨髓抽吸物(bone marrow aspirate)、眼渗出物(eye exudate)/泪或血清。

[0009] 在一些方面中,微生物组是微生物组特征标记(microbiome signature)。在一些方面中,微生物组包含两种或更多种细菌物种。在一些方面中,微生物大分子是微生物核酸分子,例如微生物DNA分子、微生物16S rRNA基因或微生物RNA分子。在一些方面中,微生物大分子是微生物蛋白质。

[0010] 在一些方面中,微生物特征标记指示疾病的风险因素。在一些方面中,将微生物特征标记与已知与疾病相关的微生物特征标记进行比较。在一些方面中,微生物特征标记指示患者中的疾病。在一些方面中,所述疾病是癌症、遗传印记病症(genetic imprinting disorder)、神经病症(neurological disorder)、自身免疫病或代谢紊乱(metabolic disorder)。

[0011] 在一些方面中,疾病是癌症,并且所述方法还包括从外排体级分中分离包含磷脂酰肌醇蛋白聚糖1(glypican 1)的外排体。在一些方面中,癌症是乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食管癌、气管癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。

[0012] 在一些方面中,所述方法还包括向患者施用治疗剂。在一些方面中,疾病是癌症并且治疗剂是抗癌治疗。

[0013] 在一些方面中,所述方法还包括报告对患者的诊断。在一些方面中,报告包括准备书面或电子报告。在一些方面中,所述方法还包括向患者、医生、医院或保险公司提供该报告。

[0014] 在一些方面中,患者是健康患者。在一些方面中,患者处于缓解中并且所述方法是检测复发的方法。在一些方面中,患者是人。在一些方面中,所述方法还包括第二次进行该方法。在一些方面中,所述第二次是在最初进行所述方法之后至少一天、一周或一个月。

[0015] 本文中使用的就指定组分而言的“基本上不含”在本文中用于意指没有指定组分被有目的地配制成组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何非预期的污染导致的指定组分的总量远低于0.05%,优选地低于0.01%。最优选地是其中用标准分析方法不能检测到指定组分的量的组合物。

[0016] 如本文中在说明书中所使用的,没有数量词修饰的名词可以意指一个/种或更多个/种。如本文中在权利要求书中所使用的,当与词语“包含/包括”结合使用时,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。

[0017] 除非明确指出仅指代替代方案或替代方案是互相排斥的,否则在权利要求书中术语“或/或者”的使用用于意指“和/或”,尽管本公开内容支持仅指代替代方案和“和/或”的限定。本文中使用的“另外的”可意指至少第二或更多。

[0018] 在本申请通篇,术语“约”用于表示这样的值,其包括用于确定该值之采用的装置、方法的误差的固有变化,存在于研究对象之间的变化;或在所述值的10%以内的值。

[0019] 从以下详细描述中,本发明的其他目标、特征和优点将变得明显。然而,应理解,虽然详细描述和具体实例指示了本发明的一些优选实施方案,但是其仅以举例说明的方式给出,因为根据该详细描述,本发明的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员而言将变得明显。

[0020] 附图简述

[0021] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过结合本文中给出的具体实施方案的详细描述来参考这些附图中的一个或更多个可更好地理解本发明。

[0022] 图1A至1B。鉴定健康血清来源的外排体中的微生物DNA。在DNA提取之前,用DNA酶处理血清来源的外排体样品以去除任何自由循环的核酸。从经DNA酶处理的来源于健康血清(1mL)的外排体分离DNA。将分离的DNA用细菌16S核糖体RNA基因的通用引物(27F-B:AGRGTTYGATYMTGGCTCAG(SEQ ID NO:1),1492R:GGYTACCTTGTTACGACTT(SEQ ID NO:2);16S rRNA基因的约1500bp)进行PCR扩增。将来自大肠杆菌(E.coli)的DNA用作阳性对照。将来自人细胞系Panc-1和成纤维细胞BJ的DNA以及空白(无模板DNA)用作阴性对照。通过凝胶电泳分析扩增的DNA。图1A示出了来自一个重复的数据;图1B示出了另一个重复的数据。

[0023] 发明详述

[0024] 健康个体血液中的外排体包含细菌微生物组。这些外排体可由体内微生物或由被细菌感染的细胞产生。因此,可通过分离循环外排体并检测其中存在的微生物组分(例如微生物核酸)来评估患者的微生物组。这允许使用简单的血液外排体测试对患者的微生物组进行取样。这样的测试的结果可确定治疗选项和粪便移植(fecal implant)结果。微生物组在外排体中更稳定,因为它保护细胞免受免疫系统的影响并且还逃避免疫清除。患者的微

生物组可表示个体的整体健康状况并提供对许多疾病风险的潜在洞察。因此，可通过对患者的外源微生物组(exo-microbiome)进行取样来针对多种疾病(例如癌症)或对治疗的响应筛选患者。

[0025] I.外排体

[0026] 本文中使用的术语“微囊泡”和“外排体”是指具有约10nm至约5000nm，更通常30nm至1000nm，并且最通常约50nm至750nm的直径(或当颗粒不是球形时的最大尺寸)的膜性颗粒，其中外排体膜的至少一部分直接从细胞获得。最常见的是，外排体的尺寸(平均直径)达供体细胞尺寸的5％。因此，特别考虑的外排体包括从细胞脱落的外排体。

[0027] 外排体可在任何合适的样品类型例如体液中被检测到或从其中分离。本文中使用的术语“分离的”是指从其天然环境中分离出来，并且意指包括至少部分纯化，并且可包括大量纯化。本文中使用的术语“样品”是指适合于本发明提供的方法的任何样品。样品可以是包含适合于检测或分离的外排体的任何样品。样品的来源包括血液、骨髓、胸膜液、腹膜液、脑脊液、尿、唾液、羊水、恶性腹水、支气管肺泡灌洗液、滑液、乳汁、汗、泪、关节液和支气管清洗液(bronchial wash)。在一个方面中，样品是血液样品，包括例如全血或其任何级分或组分。适用于本发明的血液样品可从已知的任何来源(包括血细胞或其组分，例如静脉的、动脉的、外周的、组织、带(cord)，等)提取。例如，可使用公知和常规的临床方法(例如，用于抽取和处理全血的方法)获得和处理样品。在一个方面中，示例性样品可以是从患有癌症的对象抽取的外周血。

[0028] 外排体还可从组织样品，例如手术样品、活检样品、组织、粪便和培养的细胞中分离。当从组织来源分离外排体时，可需要使组织均质化以获得单细胞悬液，然后裂解细胞以释放外排体。当从组织样品中分离外排体时，选择不导致外排体破坏的均质化和裂解方法是重要的。本文中考虑的外排体优选从在生理上可接受的溶液例如缓冲盐水、生长培养基、多种水性培养基等中的体液中分离。

[0029] 可从新鲜收集的样品或从已经冷冻或冷藏储存的样品中分离外排体。在一些实施方案中，外排体可从细胞培养基中分离。尽管不是必需的，但如果在用体积排除聚合物进行沉淀之前澄清流体样品以除去来自样品的任何碎屑，则可获得更高纯度的外排体。澄清方法包括离心、超速离心、过滤或超滤。最典型地，外排体可通过本领域公知的多种方法分离。一种优选的方法是从体液或细胞培养物上清液中进行差速离心。分离外排体的示例性方法描述于(Losche etal.,2004;Mesri and Altieri,1998;Morel etal.,2004)中。或者，外排体也可如(Combes etal.,1997)中所述通过流式细胞术分离。

[0030] 用于分离外排体的一种被接受的方案包括超速离心，其通常与蔗糖密度梯度或蔗糖垫层(cushion)结合以使相对低密度的外排体漂浮。由于与其他微囊泡或大分子复合物尺寸分布重叠的可能性，通过连续差速离心分离外排体是复杂的。此外，离心可无法提供足够的方式来基于囊泡的尺寸分离囊泡。然而，连续离心当与蔗糖梯度超速离心结合时，可提供高的外排体富集。

[0031] 使用超速离心途径的替代物，基于尺寸分离外排体是另一种选择。已经报道了使用超滤方法成功纯化外排体，所述超滤方法比超速离心耗时少，并且不需要使用特殊设备。类似地，可获得商业试剂盒(EXOMIR™，Bioo Scientific)，其允许在一个微滤器上去除细胞、血小板和细胞碎片，并使用正压驱动流体在第二微滤器上捕获大于30nm的囊泡。但是，

对于该过程,外排体未被回收,其RNA含量直接从在第二微滤器上捕获的物质中提取,随后可用于PCR分析。基于HPLC的方案可潜在地使得人们能够获得高纯度的外排体,尽管这些方法需要专用设备且难以扩大规模。一个重要的问题是血液和细胞培养基二者均包含大量与外排体尺寸范围相同的纳米粒(一些非囊泡)。例如,一些miRNA可包含在胞外蛋白质复合物中,而不是外排体中;然而,可进行蛋白酶(例如蛋白酶K)处理以消除“外排体”蛋白质的任何可能的污染。

[0032] 在另一个实施方案中,可通过通常用于富集外排体样品的技术,例如涉及免疫特异性相互作用的技术(例如,免疫磁捕获)来捕获癌细胞来源的外排体。免疫磁捕获,也称为免疫磁细胞分离,通常涉及将针对特定细胞类型上存在的蛋白质的抗体附着于小的顺磁性珠上。当抗体包被的珠与样品(例如血液)混合时,它们附着于并包围特定的细胞。然后将样品置于强磁场中,使得珠沉淀至一侧。去除血液之后,捕获的细胞与珠一起保留。该通用方法的许多变型形式在本领域中是公知的,并且适用于分离外排体。在一个实例中,外排体可附着于磁珠(例如,醛/硫酸盐珠),并随后将抗体添加至混合物以识别附着于珠的外排体表面上的表位。已知在癌细胞来源的外排体上存在的示例性蛋白质包括ATP结合盒亚家族A成员6(ABCA6)、四次穿膜蛋白-4(TSPAN4)、SLIT和NTRK样蛋白4(SLITRK4)、推定的原钙黏着蛋白β-18(PCDHB18)、髓样细胞表面抗原CD33(CD33)和磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1(GPC1)(美国专利No.9,921,223,其通过引用整体并入本文)。癌细胞来源的外排体可使用例如针对这些蛋白质的一种或更多种的抗体或适配体来分离。

[0033] 本文中使用的分析包括允许直接或间接观察外排体的任何方法,并且可以是体内的或离体的。例如,分析可包括但不限于:与固体基底结合的外排体的离体显微镜或细胞计数检测和可视化、流式细胞术、荧光成像等。在一个示例性方面中,癌细胞来源的外排体使用针对以下一种或更多种的抗体来检测并随后与固体基底结合和/或使用显微镜或细胞计数检测来可视化:ATP结合盒亚家族A成员6(ABCA6)、四次穿膜蛋白-4(TSPAN4)、SLIT和NTRK样蛋白4(SLITRK4)、推定的原钙黏着蛋白β-18(PCDHB18)、髓样细胞表面抗原CD33(CD33)、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1(GPC1)、组蛋白H2A2-A型(HIST1H2AA)、组蛋白H2A 1-A型(HIST1H1AA)、组蛋白H3.3(H3F3A)、组蛋白H3.1(HIST1H3A)、锌指蛋白37同源物(ZFP37)、层黏连蛋白亚基β-1(LAMB1)、肾小管间质性肾炎抗原样(TINAGL1)、过氧化物氧化还原酶4(PRDX4)、胶原蛋白α-2(IV)链(COL4A2)、推定的蛋白C3P1(C3P1)、Hemicentin-1(HMCN1)、推定的Rho结合蛋白-2样蛋白(RHPN2P1)、含锚蛋白重复结构域的蛋白62(ANKRD62)、含三联基序的蛋白42(TRIM42)、连接斑珠蛋白(JUP)、微管蛋白β-2B链(TUBB2B)、内切核糖核酸酶切酶(DICER1)、E3泛素蛋白连接酶TRIM71(TRIM71)、含剑蛋白p60 ATPase的亚基A样2(KATNAL2)、蛋白S100-A6(S100A6)、含5’核苷酸酶结构域的蛋白3(NT5DC3)、缬氨酸-tRNA连接酶(VARS)、Kazrin(KAZN)、ELAV样蛋白4(ELAVL4)、环指蛋白166(RNF166)、含FERM和PDZ结构域的蛋白1(FRMPD1)、78kDa的葡萄糖调节蛋白(HSPA5)、运输蛋白颗粒复合物亚基6A(TRAPPC6A)、鲨烯单加氧酶(SQLE)、肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)、膜泡分拣蛋白28同源物(VPS28)、前列腺素F2受体负调节子(PTGFRN)、异丁酰基辅酶A脱氢酶、线粒体的(ACAD8)、26S蛋白酶调节亚基6B(PSMC4)、延伸因子1-γ(EEF1G)、肌巨蛋白(TTN)、酪氨酸蛋白磷酸酶13型(PTPN13)、丙糖磷酸异构酶(TPI1)或羧肽酶E(CPE)。

[0034] 应注意,并非在细胞中表达的所有蛋白质均存在于由该细胞分泌的外排体中。例

如,钙连蛋白、GM130和LAMP-2都是在MCF-7细胞中表达但不存在于由MCF-7细胞分泌的外排体中的蛋白质(Baietti et al.,2012)。作为另一个实例,一项研究发现,190/190胰腺导管腺癌患者具有比健康对照更高的GPC1+外排体水平(Melo etal.,2015,其通过引用整体并入本文)。值得注意的是,平均仅2.3%的健康对照具有GPC1+外排体。

[0035] A.用于从细胞培养物中收集外排体的示例性方案

[0036] 在第1天,在T225烧瓶中在含有10%FBS的培养基中接种足够的细胞(例如,约500万个细胞)以使得在第二天细胞为约70%汇合(confluent)。在第2天,吸出细胞上的培养基,用PBS洗涤细胞两次,并随后向细胞添加25至30mL基本培养基(即,无PenStrep或FBS)。将细胞孵育24至48小时。优选48小时孵育,但是一些细胞系对无血清培养基更敏感,并且因此孵育时间应减少到24小时。请注意,FBS包含将严重影响(skew)NanoSight结果的外排体。

[0037] 在第3/4天,收集培养基并在室温下以800×g离心5分钟以使死细胞和大碎片沉淀。将上清液转移至新的锥形管,并将培养基以2000×g再次离心10分钟以去除其他大碎片和大囊泡。使培养基通过0.2μm过滤器,并随后将其等分至超速离心管(例如25×89mm Beckman Ultra-Clear),每管使用35mL。如果每个管的培养基体积小于35mL,则用PBS填充管的其余部分以达到35mL。使用SW 32Ti转子(k因子266.7,RCF最大133,907)在4℃下以28,000rpm将培养基超速离心2至4小时。小心吸出上清液,直至剩余约1英寸的液体。将管倾斜,并且允许剩余的培养基缓慢进入抽吸液管。如果期望的话,可将外排体沉淀重悬于PBS中,并以28,000rpm超速离心,重复1至2小时,以进一步纯化外排体群体。

[0038] 最后,将外排体沉淀重悬于210μL PBS中。如果每个样品存在多个超速离心管,则使用相同的210μL PBS连续重悬每个外排体沉淀。对于每个样品,取10μL,并且将其添加至990μL H_2O,以用于纳米粒追踪分析。将剩余的200μL含外排体的混悬液用于下游过程,或立即在-80℃下储存。

[0039] B.用于从血清样品中提取外排体的示例性方案

[0040] 首先,使血清(或其他体液)样品在冰上解冻。然后,将250μL的无细胞血清样品在11mL PBS中进行稀释;通过0.2μm孔过滤器进行过滤。将经稀释的样品在4℃下以150,000×g超速离心过夜。第二天,小心弃去上清液,并用11mL PBS洗涤外排体沉淀。在4℃下以150,000×g进行第二轮的超速离心,持续2小时。最后,小心弃去上清液,并将外排体沉淀重悬于100μL PBS中以进行分析。

[0041] II.微生物组

[0042] 人微生物区系(microbiota)由数万亿计的涵盖比人基因组中存在的基因超过100倍更多的基因的微生物(包括150至200种普遍存在的细菌物种和1000种不太常见的细菌物种)组成。微生物区系主要由细菌构成,但也包含古菌、原虫和病毒。微生物区系执行健康维持所必需的重要功能,包括食物处理、复杂的难消化多糖的消化和维生素的合成,并且其分泌具有多种功能(从病原体的抑制、毒性化合物的代谢至宿主代谢的调节)的生物活性代谢物。

[0043] 扰动的微生物区系与人中的多种病症相关,从在婴儿中的坏死性小肠结肠炎到成人中的肥胖症、糖尿病、代谢综合征、肠易激综合征和炎性肠病。对人健康状况中的微生物组失调的最近研究表明了在多种疾病状态(包括癌症)下微生物组的特定变化。“微生物组”是指微生物区系的宏基因组(collective genome)。此外,研究表明了特定微生物组与特定

癌症的关联。因此，不同的微生物组可促进疾病的发生或发展。相反地，肿瘤微环境可提供其中可持续存在这些病毒和微生物的专门的生态位。在任一情况下，疾病类型特异的微生物组特征标记均可为早期诊断、预后和治疗策略提供生物标志物。

[0044] 在一些实施方案中，确定一种或更多种类型的微生物或其组分或产物的水平或水平组包括确定一种或更多种DNA序列的水平或水平组。在一些实施方案中，一种或更多种DNA序列包含可用于区分不同微生物类型的任何DNA序列。在某些实施方案中，一种或更多种DNA序列包含16S rRNA基因序列。在某些实施方案中，一种或更多种DNA序列包含18S rRNA基因序列。在一些实施方案中，扩增了1、2、3、4、5、10、15、20、25、50、100、1,000、5,000或更多种序列。

[0045] 16S和18S rRNA基因序列分别编码原核和真核核糖体的小亚基组分。rRNA基因在区分微生物类型方面特别有用，因为尽管这些基因的序列在微生物物种之间不同，但这些基因具有用于引物结合的高度保守区域。保守引物结合区域之间的这种特异性允许许多不同类型微生物的rRNA基因通过单引物组进行扩增，并随后通过扩增的序列进行区分。

[0046] III.疾病的诊断、预后和治疗

[0047] 使用本发明的方法检测、分离和表征外源微生物组可用于评估疾病风险因素、诊断和预后以及监测治疗效力以用于可导致疾病复发的治疗失败的早期检测。另外，根据本发明的外源微生物组分析能够在已完成治疗过程的症状前患者(presymptomatic patient)中检测早期复发。这是可能的，因为外排体中存在的微生物组的存在可与一段时间内的疾病进展、对治疗的不良响应、疾病复发和/或存活降低相关和/或相关联。因此，外源微生物组的枚举(enumeration)和表征提供了针对基线特征对患者进行划分的方法，所述基线特征基于对治疗的响应预测初始风险和后续风险。

[0048] 例如，可分析根据上文公开的方法所分离的癌细胞来源的外排体以在对象中诊断癌症或对其进行预后。因此，本发明的方法可用于例如通过比较癌细胞来源的外排体与源自非癌细胞的外排体的外源微生物组来评价癌症患者和处于癌症之风险中的那些患者。在本文中所述的诊断或预后的任一种方法中，癌症的一种或更多种指标(例如癌症特异性外源微生物组特征标记)或任何其他病症的一种或更多种指标的存在或不存在可用于产生诊断或预后。

[0049] 在一个方面中，如本文中所述，从患者抽取体液(例如，血液、尿、唾液等)样品并检测和/或分离病变细胞来源的外排体。例如，外排体可用与以下结合的一种或更多种抗体或适配体进行标记:ATP结合盒亚家族A成员6(ABCA6)、四次穿膜蛋白-4(TSPAN4)、SLIT和NTRK样蛋白4(SLITRK4)、推定的原钙黏着蛋白β-18(PCDHB18)、髓样细胞表面抗原CD33(CD33)和/或磷脂酰肌醇蛋白聚糖-1(GPC1)，并且抗体可具有共价结合的荧光标记。然后可进行分析以确定样品中癌细胞来源的外排体的数目和特征，并且根据该测量，可确定初始血液样品中存在的癌细胞来源的外排体的数目。被鉴定为癌细胞来源的外排体的外排体可同样地通过检测已知在癌细胞来源的外排体中选择性或特异性地存在的第二(或更多)标志物来证实，所述标志物例如，如组蛋白H2A 2-A型(HIST1H2AA)、组蛋白H2A 1-A型(HIST1H1AA)、组蛋白H3-3(H3F3A)、组蛋白H3.1(HIST1H3A)、锌指蛋白37同源物(ZFP37)、层黏连蛋白亚基β-1(LAMB1)、肾小管间质性肾炎抗原样(TINAGL1)、过氧化物氧化还原酶4(PRDX4)、胶原蛋白α-2(IV)链(COL4A2)、推定的蛋白C3P1(C3P1)、Hemicentin-1(HMCN1)、推定的Rho结合蛋

白-2样蛋白(RHPN2P1)、含锚蛋白重复结构域的蛋白62(ANKRD62)、含三联基序的蛋白42(TRIM42)、连接斑珠蛋白(JUP)、微管蛋白β-2B链(TUBB2B)、内切核糖核酸酶切酶(DICER1)、E3泛素蛋白连接酶TRIM71(TRIM71)、含剑蛋白p60 ATPase的亚基A样2(KATNAL2)、蛋白S100-A6(S100A6)、含5'核苷酸酶结构域的蛋白3(NT5DC3)、缬氨酸-tRNA连接酶(VARS)、Kazrin(KAZN)、ELAV样蛋白4(ELAVL4)、环指蛋白166(RNF166)、含FERM和PDZ结构域的蛋白1(FRMPD1)、78kDa的葡萄糖调节蛋白(HSPA5)、运输蛋白颗粒复合物亚基6A(TRAPPC6A)、鲨烯单加氧酶(SQLE)、肿瘤易感基因101蛋白(TSG101)、膜泡分拣蛋白28同源物(VPS28)、前列腺素F2受体负调节子(PTGFRN)、异丁酰基辅酶A脱氢酶、线粒体的(ACAD8)、26S蛋白酶调节亚基6B(PSMC4)、延伸因子1-γ(EEF1G)、肌巨蛋白(TTN)、酪氨酸蛋白磷酸酶13型(PTPN13)、丙糖磷酸异构酶(TPI1)或羧肽酶E(CPE)。癌细胞来源的外排体的数目可通过可视化地对外排体进行定量和表征的细胞计数或显微镜技术来确定。癌细胞来源的外排体可通过本领域中已知的其他方法(例如,ELISA)进行检测和定量。

[0050] 在多个方面中,可在特定时间过程内以不同的间隔对对象的外源微生物组进行分析,以评估对象的进展和病理学。例如,可以以固定间隔例如一天、两天、三天、一周、两周、一个月、两个月、三个月、六个月或一年进行分析,以便追踪作为时间的函数的外源微生物组的水平和特征。在存在癌症患者的情况下,这提供了疾病进展的有用指示,并且帮助医疗从业人员基于外源微生物组变化的提高、降低或缺乏而做出适当的治疗选择。

[0051] 在本文中提供的任一种方法中,还可进行另外的分析以表征外源微生物组以提供另外的临床评估。例如,可使用PCR技术,例如与对特定标志物具有特异性的引物一起多路复用(multiplex)以获得以下信息,例如外源微生物组来源于其的微生物的类型。另外,可进行DNA或RNA分析、蛋白质组分析或代谢组分析作为评估关于患者特征的另外的信息的手段。

[0052] 例如,外源微生物组分析可提供足以确定对象对特定治疗方案的响应性或用于确定候选药剂在癌症治疗中的有效性的数据。因此,本发明提供了通过如本文中所述检测对象的外源微生物组来确定对象对特定治疗方案的响应性或确定候选药剂在癌症治疗中的有效性的方法。例如,一旦将药物治疗施用于患者,就可使用本发明的方法确定药物治疗的效力。例如,可使用本发明的方法来处理在药物治疗之前从患者获取的样品,以及在药物治疗的同时或随后从患者获取的一个或更多个样品。通过比较每个经处理的样品的分析结果,人们可确定药物治疗的效力或患者对药剂的响应性。以这种方式,可对失败的化合物进行早期识别,或对有前景的化合物进行早期验证。

[0053] 基于外源微生物组的存在,本发明的某些方面可用于预防或治疗疾病或病症。本发明的某些方面提供了用表达或包含治疗剂或诊断剂的外源微生物组来治疗患者。本文中使用的"治疗剂"是可用于治疗癌症或其他病症的原子、分子或化合物。治疗剂的一些实例包括但不限于:药物、化学治疗剂、治疗性抗体和抗体片段、毒素、放射性同位素、酶、核酸酶、激素、免疫调节剂、反义寡核苷酸、螯合剂、硼化合物、光敏剂和染料。本文中使用的"诊断剂"是可用于诊断、检测疾病或使疾病可视化的原子、分子或化合物。根据本文中所述的一些实施方案,诊断剂可包括但不限于放射性物质(例如,放射性同位素、放射性核素、放射性标记或放射性示踪剂)、染料、造影剂、荧光化合物或分子、生物发光化合物或分子、酶以及增强剂(例如,顺磁性离子)。

[0054] 在一些方面中，治疗性重组蛋白质可以是具有在患者细胞中已丧失的活性的蛋白质、具有期望的酶活性的蛋白质、具有期望的抑制活性的蛋白质等。例如，蛋白质可以是转录因子、酶、蛋白质毒素、抗体、单克隆抗体等。单克隆抗体可特异性或选择性地结合胞内抗原。单克隆抗体可抑制胞内抗原的功能和/或破坏蛋白质-蛋白质相互作用。本发明的另一些方面提供了基于患者样品中癌细胞来源的外排体中存在的某些外源微生物组的存在来诊断疾病。

[0055] 本文中使用的术语“对象”是指对其进行主题方法的任何个体或患者。通常来说，对象是人，尽管本领域技术人员将理解，对象可以是动物。因此，另一些动物，包括哺乳动物，例如啮齿动物(包括小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠)，猫，狗，兔，农场动物(包括牛、马、山羊、绵羊、猪等)以及灵长类(包括猴、黑猩猩、猩猩和大猩猩)均包括在对象的定义之内。

[0056] “治疗”及其变化形式是指出于获得疾病或健康相关病症的治疗性益处的目的而向对象施用或应用治疗剂或者对对象进行程序或模式(modality)。例如，治疗可包括施用化学治疗、免疫治疗或放射治疗，进行手术，或其任意组合。

[0057] 本文中使用的术语“治疗性益处”或“治疗有效”是指对于该病症的医学治疗而言促进或增强对象的福祉的任何事物。这包括但不限于降低疾病体征或症状的频率或严重程度。例如，癌症的治疗可涉及例如降低肿瘤的侵袭力、降低癌症的生长速率或预防转移。癌症的治疗还可指延长患有癌症的对象的存活。

[0058] 本文中使用的术语“癌症”可用于描述实体瘤、转移性癌症或非转移性癌症。在某些实施方案中，癌症可起源于膀胱、血液、骨、骨髓、脑、乳腺、结肠、食管、十二指肠、小肠、大肠、结肠、直肠、肛门、牙龈(gum)、头、肾、肝、肺、鼻咽、颈、卵巢、胰腺、前列腺、皮肤、胃、睾丸、舌或子宫。

[0059] 还认识到本发明还可用于诊断非癌性疾病，并且特别地用于诊断已知与外源微生物组的改变相关的任何疾病。例如，本发明可用于诊断自身免疫病(例如，类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化)、代谢紊乱(高血糖症(hyperglycemia)、高脂血症、心血管疾病、糖尿病)、神经疾病(例如，孤独症谱系障碍、雷特综合征、帕金森病(Parkinson's disease)、精神分裂症)或心理障碍。

[0060] 针对治疗的患者的有效响应或患者的“响应性”是指给予处于疾病或病症的风险之中或者患有疾病或病症的患者的临床或治疗性益处。这样的益处可包括细胞或生物学响应、完全响应、部分响应、稳定的疾病(无进展或复发)或者伴有之后复发的响应。例如，有效响应可在被诊断患有癌症的患者中降低肿瘤尺寸或无进展存活。

[0061] 可预测和监测治疗结果，和/或可通过本文中所述的方法鉴定或选择受益于这样的治疗的患者。

[0062] 关于肿瘤性病症治疗，取决于肿瘤性病症阶段，肿瘤性病症治疗涉及以下治疗中的一种或组合：手术去除肿瘤性组织、放射治疗以及化学治疗。其他治疗方案可与抗癌剂，例如治疗组合物和化学治疗剂的施用组合。例如，待用这样的抗癌剂治疗的患者也可接受放射治疗和/或可经受手术。

[0063] 对于疾病的治疗，治疗组合物的合适剂量将取决于如上所定义的待治疗的疾病类型，疾病的严重程度和病程，患者的临床史和对药剂的响应，以及主治医师的酌处权。该药剂适合以一次或在系列治疗中施用于患者。

[0064] 可以以有效地实现所期望效果的组合量提供治疗性和预防性方法和组合物。可使组织、肿瘤或细胞与包含一种或更多种药剂的一种或更多种组合物或药理制剂接触，或者通过使组织、肿瘤和/或细胞与两种或更多种不同的组合物或制剂接触。同样，考虑可将这样的组合治疗与化学治疗、放射治疗、手术治疗或免疫治疗结合使用。

[0065] IV.试剂盒和诊断

[0066] 在本发明的多个方面中，设想了包含从体液或组织培养基中纯化外排体所必需的组分的试剂盒。在另一些方面中，设想了包含分离外排体并确定所分离的外排体中微生物组之存在所必需的组分的试剂盒。

[0067] 试剂盒可包含一个或更多个密封的小瓶，其中包含任何这样的组分。在一些实施方案中，试剂盒还可包含合适的容器装置，所述容器是不会与试剂盒的组分反应的容器，例如eppendorf管、测定板、注射器、瓶或管。容器可由可灭菌材料(例如塑料或玻璃)制成。试剂盒还可包含说明单，其概述了本文中所阐述方法的程序性步骤，并且将遵循与本文中所述或本领域普通技术人员已知的基本上相同的程序。指令信息可在包含机器可读指令的计算机可读介质中，当使用计算机执行该机器可读指令时，导致显示从样品中纯化外排体和/或鉴定其中的外源微生物组的真实或虚拟程序。

[0068] V.实施例

[0069] 包括以下实施例以说明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解，以下实施例中公开的技术表示发明人发现的在本发明的实践中运行良好的技术，并且因此可认为构成用于其实践的优选模式。然而，根据本公开内容，本领域技术人员应理解，在不脱离本发明的精神和范围的情况下，可在所公开的一些具体实施方案中进行许多改变，并且仍然获得相似或类似的结果。

[0070] 实施例1-鉴定健康血清来源的外排体中的微生物DNA

[0071] 从获自五名健康人对象的血清样品(1mL)中分离外排体。在DNA提取之前，用DNA酶处理所分离的外排体以去除任何自由循环的核酸，以确保任何所分离DNA的腔内定位(intraluminal localization)。在DNA提取之后，将DNA用细菌16S核糖体RNA基因的通用引物(27F-B:AGRGTTYGATYMTGGCTCAG(SEQ ID NO:1)，1492R:GGYTACCTTGTTACGACTT(SEQ ID NO:2)；16S rRNA基因的约1500bp)进行PCR扩增。将大肠杆菌DNA用作阳性对照。将从人细胞系Panc-1和成纤维细胞BJ中分离的DNA以及空白(无模板DNA)用作阴性对照。使用凝胶电泳使扩增的DNA可视化。从该方案的两个重复中获得的数据在图1A至B中显示。

[0072] ***

[0073] 根据本公开内容，本文中公开和要求保护的所有方法无需过度实验就可进行和实施。尽管已经以一些优选实施方案的方式描述了本发明的组合物和方法，但对于本领域技术人员来说将明显的是，可将改变应用于本文中所述的方法以及所述方法的步骤或步骤顺序而不脱离本发明的概念、精神和范围。更具体地，将明显的是，可用化学和生理学二者相关的某些试剂替代本文中描述的试剂，同时将获得相同或类似的结果。对于本领域技术人员明显的是所有这样的类似替代和改变被视为在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0074] 参考文献

[0075] 以下参考文献就其提供补充本文中所阐述的那些的示例性操作或其他细节而言

特定地通过引用并入本文。

[0076] 美国专利No.9,921,223

[0077] Baietti et al.,Syndecan-syntenin-ALIX regulated the biogenesis of exosomes,Nat.Cell Biol.,14:677-685,2012.

[0078] Combes et al.,A new flow cytometry method of platelet-derived microvesicle quantitation in plasma,Thromb.Haemost.,77:220,1997.

[0079] Losche et al.,Platelet-derived microvesicles transfer tissue factor tomonocytes but not to neutrophils,Platelets,15:109-115,2004。

[0080] Melo et al.,Glypican-1identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer,Nature,523:177-182,2015.

[0081] Mesri and Altieri,Endothelial cell activation by leukocyte microparticles,J.Immunol.,161:4382-4387,1998。

[0082] Morel et al.,Cellular microparticles:a disseminated storage pool of bioactiive vascular effectors,Curr.Opin.Hematol.,11:156-164,2004.

序列表

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM
<120> 用于诊断和治疗目的的对外排体相关微生物组的分离和检测
<130> UTFC.P1407WO
<140> 未知
<141> 2020-02-07
<150> US 62/802,994
<151> 2019-02-08
<160> 2
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的引物
<220>
<221> misc_feature
<222> (3)..(3)
<223> r = a 或 g
<220>
<221> misc_feature
<222> (7)..(7)
<223> y = t 或 c
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(11)
<223> y = t 或 c
<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(12)
<223> m = a 或 c
<400> 1
agrgttygat ymtggctcag 20
<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的引物

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> y = t 或 c

<400> 2

ggytaccttg ttacgactt 19

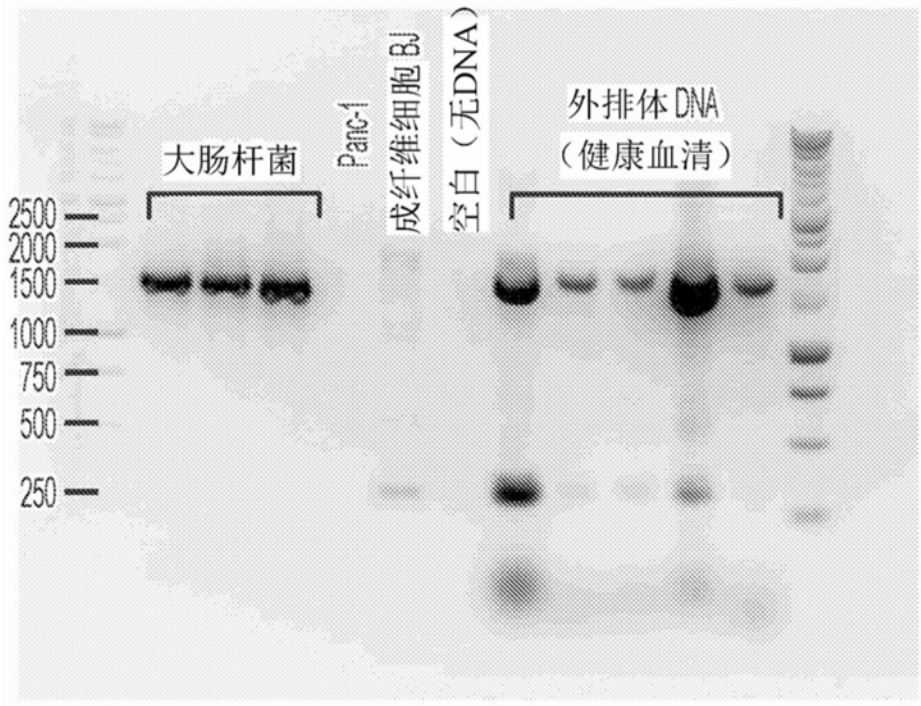

大肠杆菌
Panc-1
成纤维细胞 BJ
空白（无DNA）
外排体 DNA
（健康血清）
2500
2000
1500
1000
750
500
250

图1A

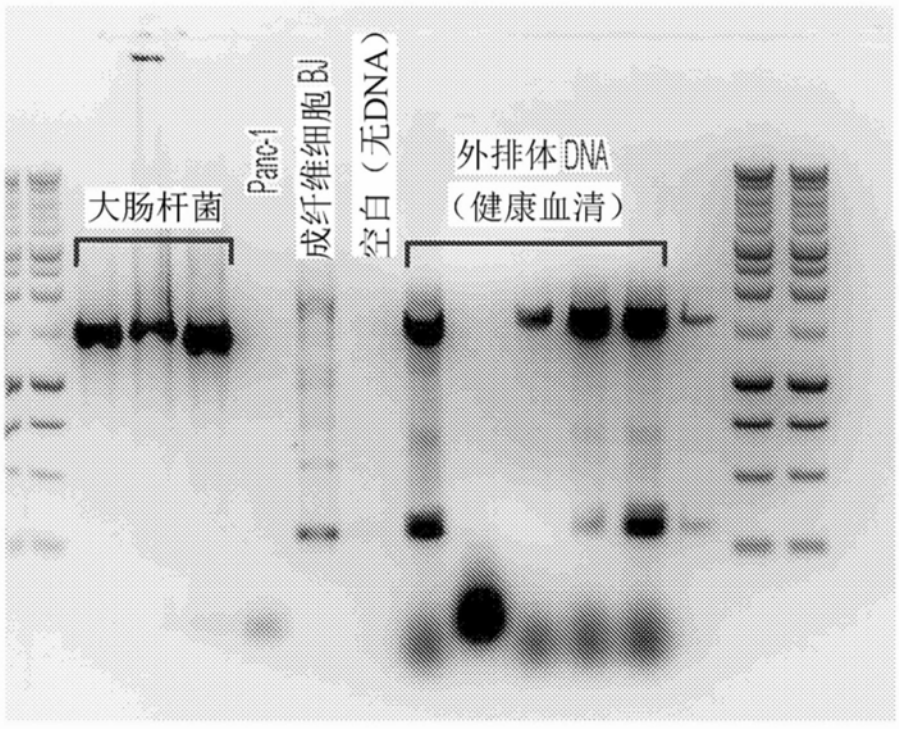

大肠杆菌
Panc-1
成纤维细胞 BJ
空白（无DNA）
外排体 DNA
（健康血清）

图1B