(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 107119108 A
(43)申请公布日 2017.09.01

(21)申请号 201710063918.4

(22)申请日 2009.01.19

(30)优先权数据
61/022,033 2008.01.18 US
61/073,434 2008.06.18 US

(62)分案原申请数据
200980109695.4 2009.01.19

(71)申请人 哈佛大学校长及研究员协会
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 阿明·I·卡斯西斯

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
代理人 张英 宫传芝

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
G01N 33/574(2006.01)

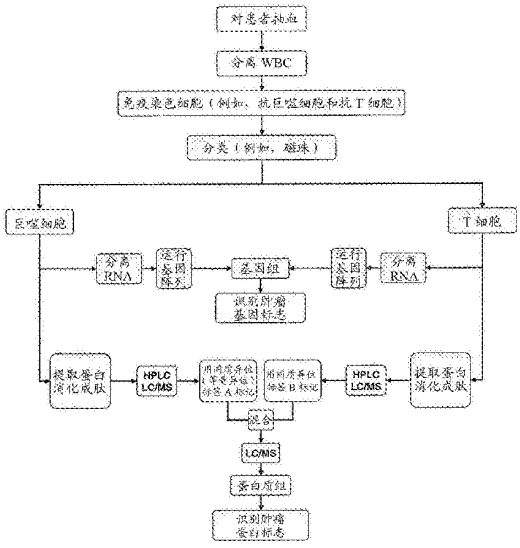
权利要求书4页 说明书30页 附图17页

(54)发明名称

在体液中检测疾病或病症标志的方法

(57)摘要

本发明涉及在体液中检测疾病或病症标志的方法。本发明提供了一种用于诊断个体中癌细胞的存在的方法和组合物。还提供了用于识别在具有癌症的个体中的肿瘤特异性标志的方法和组合物。提供了用于诊断在个体中存在感染原和/或用于识别在感染个体中感染原特异性标志的方法和组合物。提供了用于诊断在个体中存在疾病的方法和组合物。还提供了用于识别在具有疾病的个体中存在疾病特异标志的方法和组合物。



CN 107119108 A

1.一种用于诊断个体中癌细胞的存在的方法，包括以下步骤：

从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与所述个体中癌症细胞的存在相关联。

2.根据权利要求1的方法，其中，所述一种或多种标记物选自由DNA、RNA、蛋白、脂质、碳水化合物以及它们的组合组成的组。

3.根据权利要求1所述的方法，其中，所述血液吞噬细胞选自由嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞以及泡沫细胞中的一种或多种组成的组。

4.根据权利要求1所述的方法，其中，所述血液非吞噬细胞选自由T细胞、B细胞、裸细胞和嗜碱性粒细胞中的一种或多种组成的组。

5.根据权利要求1所述的方法，其中，所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞分离自全血、尿、粪便、唾液、淋巴或脑脊液。

6.根据权利要求5所述的方法，其中，使用抗体来分离所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞。

7.根据权利要求5所述的方法，其中，通过荧光激活细胞分类术来分开所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞。

8.根据权利要求5所述的方法，其中，利用与在WBC群的质膜上表达的分子受体结合的配体，将所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞分开。

9.根据权利要求5所述的方法，其中，通过选自由过滤、基于梯度的离心、洗脱、微流体组成的组中的一种或多种方法，将所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞分开。

10.根据权利要求1所述的方法，其中，所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞从白细胞的群体中分离。

11.根据权利要求10所述的方法，其中，使用抗体来分离所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞。

12.根据权利要求10所述的方法，其中，通过选自由荧光激活细胞分类术、过滤、基于梯度的离心、洗脱和微流体组成的组中的一种或多种方法，将所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞分开。

13.根据权利要求10所述的方法，其中，利用与在WBC群的质膜上表达的分子受体结合的配体，将所述血液吞噬细胞和所述血液非吞噬细胞分开。

14.根据权利要求1所述的方法，其中，所述个体具有隐秘癌症、先前诊断的原发癌症和转移性癌症中的一种或多种。

15.根据权利要求1所述的方法，进一步包括使一种或多种标记物的存在与癌症治疗的效能相关联的步骤。

16.根据权利要求1所述的方法，其中，所述标记物选自与癌基因、致癌基因和肿瘤抑制基因中的一种或多种相对应的DNA、RNA和微小RNA中的一种或多种。

17.根据权利要求1所述的方法，其中，所述标记物是蛋白和多肽中的一种或两种，所述

蛋白和多肽由癌基因、和致癌基因以及肿瘤抑制基因中的一种或多种编码。

18.一种用于鉴别具有癌症的个体中肿瘤特异性标志的方法，包括以下步骤：

从来自具有癌症的个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述具有癌症的个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的两种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的两种或多种标记物的差异表达与所述具有癌症的个体中的肿瘤特异性标志相关联。

19.根据权利要求18所述的方法，其中，所述两种或多种标记物选自由DNA、RNA、蛋白、脂质、碳水化合物以及它们的组合组成的组。

20.根据权利要求18所述的方法，其中，所述两种或多种标记物是与两种或多种癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的组合相对应的DNA或RNA。

21.根据权利要求18所述的方法，其中，所述两种或多种标记物是由两种或多种癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的组合编码的蛋白或多肽。

22.一种用于诊断个体中癌细胞的存在的方法，包括以下步骤：

从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在；以及

使循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在与所述个体中癌细胞的存在相关联。

23.根据权利要求22所述的方法，其中，相对于所述第二表达谱，所述第一表达谱中标记物数量的增加表明循环肿瘤细胞和其亚细胞片段中的一种或两种的存在。

24.根据权利要求23所述的方法，其中，所述标记物选自由DNA、RNA、蛋白、脂质、碳水化合物以及它们的组合组成的组。

25.根据权利要求23所述的方法，其中，所述标记物选自由与癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的组合相对应的DNA、RNA、微小RNA以及它们的组合组成的组。

26.根据权利要求23所述的方法，其中，所述标记物是由癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的组合编码的蛋白或多肽。

27.一种用于诊断个体中癌细胞的存在的方法，包括以下步骤：

从个体中分离吞噬细胞群；

将2n吞噬细胞与>2n吞噬细胞分开；

从所述2n吞噬细胞获得第一表达谱；

从所述>2n吞噬细胞获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与所述个体中癌细胞的存在相关联。

28.根据权利要求27所述的方法，其中，所述一种或多种标记物选自由DNA、RNA、蛋白、脂质、碳水化合物以及它们的组合组成的组。

29.根据权利要求27所述的方法，其中，所述一种或多种标记物选自由与两种或多种癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的组合相对应的DNA、RNA、微小RNA和它们的组合组成的组。

30.根据权利要求27所述的方法，其中，所述一种或多种标记物是由两种或多种癌基因、致癌基因、肿瘤抑制基因或它们的任何组合编码的蛋白或多肽。

31.根据权利要求27所述的方法，其中，所述吞噬细胞选自由嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、泡沫细胞以及它们的任何组合组成的组。

32.根据权利要求27所述的方法，其中，所述吞噬细胞分离自全血、尿、粪便、唾液、淋巴或脑脊液。

33.根据权利要求32所述的方法，其中，利用抗体来分离所述吞噬细胞。

34.根据权利要求32所述的方法，其中，利用选自由荧光激活细胞分类术、过滤、基于梯度的离心、洗脱和微流体组成的组中的一种或多种方法来分离所述吞噬细胞。

35.根据权利要求32所述的方法，其中，利用与在WBC群的质膜上表达的分子受体结合的配体来分离所述吞噬细胞。

36.一种用于诊断个体中感染原的存在的方法，包括以下步骤：

从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与所述个体中感染原的存在相关联。

37.根据权利要求36所述的方法，其中，所述一种或多种标记物选自由病原体DNA、病原体RNA、病原体蛋白、病原体多肽、病原体脂质以及它们的组合组成的组。

38.根据权利要求36所述的方法，其中，所述感染原选自由病毒、细菌、真菌、寄生虫和感染性蛋白组成的组。

39.一种用于识别感染患者中的感染原特异性标志的方法，包括以下步骤：

从来自感染个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述感染个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的两种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的两种或多种标记物的差异表达与所述感染个体中的感染原特异性标志相关联。

40.根据权利要求39所述的方法，其中，所述两种或多种标记物选自由病原体DNA、病原体RNA、病原体蛋白、病原体多肽、病原体脂质以及它们的组合组成的组。

41.根据权利要求39所述的方法，其中，所述感染原选自由病毒、细菌、真菌、寄生虫和感染性蛋白组成的组。

42.一种用于诊断个体中感染原的存在的方法，包括以下步骤：

从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱；

从来自所述个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在；以及

使循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在与所述个体中感染原的存在相关联。

43.一种用于诊断个体中感染原的存在的方法，包括以下步骤：

从个体中分离吞噬细胞群；

将2n吞噬细胞与>2n吞噬细胞分开；

从所述2n吞噬细胞中获得第一表达谱；

从所述>2n吞噬细胞中获得第二表达谱；

比较所述第一表达谱和第二表达谱；

识别对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达；以及

使所述对所述第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与所述个体中感染原的存在相关联。

44.根据权利要求43所述的方法，其中，所述一种或多种标记物选自由病原体DNA、病原体RNA、病原体蛋白、病原体多肽、病原体脂质以及它们的组合组成的组。

45.根据权利要求43所述的方法，其中，所述感染原选自由病毒、细菌、真菌、寄生虫和感染性蛋白组成的组。

46.根据权利要求43所述的方法，其中，所述吞噬细胞选自由嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、泡沫细胞以及它们的任何组合组成的组。

47.根据权利要求43所述的方法，其中，所述吞噬细胞分离自全血、尿、粪便、唾液、淋巴或脑脊液。

48.根据权利要求47所述的方法，其中，利用抗体来分离所述吞噬细胞。

49.根据权利要求47所述的方法，其中，利用选自由荧光激活细胞分类术、过滤、基于梯度的离心、洗脱和微流体组成的组中的一种或多种方法来分离所述吞噬细胞。

50.根据权利要求47所述的方法，其中，利用与在WBC群的质膜上表达的分子受体结合的配体来分离所述吞噬细胞。

在体液中检测疾病或病症标志的方法

[0001] 本申请是申请日为2009年1月19日的题为“在体液中检测疾病或病症标志的方法”的中国专利申请号200980109695.4的分案申请。

[0002] 相关的美国申请

[0003] 本申请要求于2008年6月18日提交的美国临时专利申请第61/073,434号和于2008年1月18日提交的第61/022,033号的权益，将其每一个的全部内容以引用方式并入本文以供参考用于所有目的。

技术领域

[0004] 本发明涉及识别如胎儿性别的情况或从患者的体液获得的细胞中的肿瘤基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组和/或脂蛋白组标志的疾病的标记物的方法。

背景技术

[0005] 肿瘤起源于累积遗传和外遗传改变的正常细胞。该多步骤的过程涉及导致正常细胞逐渐转化成恶性表型的多个基因改变。这些改变包括不可逆的DNA序列变化(如突变、缺失、易位)并导致癌基因的激活、肿瘤抑制基因的失活、和基因的融合。这些事件的随机性赋予基因异质性，其给出为它们提供独特表型的指示癌症的转化细胞分子指纹(例如，一种或多种细胞成分诸如DNA、RNA、蛋白质、脂质、碳水化合物等)。因此，独特基因组的标记/标志已知由各种肿瘤表达(Perou et al.(2000)Nature 406:747;Lobenhofer et al.(2001)Health Perspect.109:881;van't Veer et al.(2002)Nature 415:530(2002);Liotta and Kohn(2003)Nat.Genet.33:10;Ginos et al.(2004)Cancer Res.64:65;Liu(2005)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:3531;Grigoriadis et al.(2006)Breast Cancer Research 8:R56)。

[0006] 原发肿瘤和转移肿瘤都可以数年保持沉默并未被检测到。然而，这些潜伏的和隐蔽的肿瘤，以及先前被诊断的原发和转移实体瘤每天脱落到循环系统中大约为一至六百万个细胞/克肿瘤。这些循环的肿瘤细胞，称为CTC的大部分经历凋亡和死亡，而不同的细胞群可能会发展成新陈代谢性疾病。肿瘤细胞凋亡体、NDA、核小体、RNA、和蛋白质也在肿瘤患者的血中发现。Holmgren等人，Blood 93,3956(1999)。已进行努力来研究肿瘤的标志是否可以被识别并且它们是否可以被用来检测或监控癌症。参见，Ransohoff,Nature Reviews Cancer 5,142(2005)和McLerran et al.,Clin.Chem.54,44(2008)。

[0007] DNA可以很容易地转染入各种真核细胞中，即，一旦它内在化到细胞的细胞质中，则它能够将其基因整合到宿主细胞的基因组中。例如，嗜中性粒细胞和巨噬细胞可以被快速且非常高效地(50％-90％)转染。还已经证明DNA从原核细胞向真核细胞的传代并认为会在真核细胞之间发生。从肿瘤细胞释放的DNA具有高的转化活性。将来自培养肿瘤细胞的上清培养基加入到正常细胞中导致与在用作为钙沉淀物给予的克隆ras基因转染后产生的那些一样多的转化焦点的外观。此外，当健康大鼠被注射来自肿瘤携带鼠的血浆(因此含有肿瘤DNA)时，在它们的肺细胞DNA中发现肿瘤标记基因，即肿瘤基因在肺细胞中已被转录。

[0008] 白细胞开始于骨髓中的多能造血干细胞并且沿着骨髓谱系(单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性细胞、和嗜碱性细胞)或淋巴谱系(T和B淋巴细胞和自然杀伤细胞)发育。骨髓系细胞(例如,嗜中性粒细胞和巨噬细胞)的主要功能是对感染生物、活的不需要的受损细胞、衰老和死亡细胞(凋亡的和坏死的)的吞噬作用,以及细胞碎片的清除。来自健康动物的吞噬细胞并不复制并且是二倍体,即,具有1的DNA指数。平均上,每个细胞包含<10ng的DNA、<20ng的RNA、以及<300ng的蛋白。

[0009] 变异的不同基因表达模式,例如,与细胞类型、性别、年龄、个体间差异等相关的那些,已经在健康供体的WBC中被识别。例如,“淋巴细胞相关的”簇(聚簇)具有55个独特的基因。在嗜中性粒细胞中,还已经报道了52个独特基因簇表达中的显著变异性。该簇中的基因可以被归类到3个日益增加的特异性家族:(i)在许多类型的循环免疫细胞中遍在表达的那些;(ii)由骨髓系细胞表达的那些;和(iii)与粒细胞特异性的那些。

[0010] 不同的WBC亚群的寿命从几天(例如,嗜中性粒细胞)到几个月(例如,巨噬细胞)变化。如同其它细胞类型,白细胞会衰老并最终死亡。在它们的衰老过程中,人血液和组织来源的吞噬细胞(如嗜中性粒细胞)呈现出所有的程序化细胞死亡(即凋亡)的典型的标记,包括caspase激活、固缩核、和染色质断裂。这些细胞在它们的质膜的胞外表面上还呈现出许多“食我(eat-me)”标记(例如,磷脂酰丝氨酸、糖)。因此,垂死和死亡的细胞以及其亚细胞片段被其它吞噬细胞从组织和血液中清除。

[0011] 在它们的激活后,吞噬细胞的凋亡加快。例如,嗜中性粒细胞吞噬金黄色葡萄球菌之后,磷脂酰丝氨酸在它们的质膜上外在化,从而导致它们的通过巨噬细胞的快速吞噬。激活的单核细胞还表明使各种肿瘤细胞系与升高水平的磷脂酰丝氨酸结合。

[0012] 已知循环的吞噬细胞吞噬活的和死的CTC和它们的片段,该过程导致吞噬细胞的DNA(和其它细胞成分)含量的增加。例如,凋亡的肿瘤细胞已经表明被巨噬细胞和树突细胞吞噬。对于这样的吞噬细胞活性的后果,与从具有良性前列腺状况的患者获得的巨噬细胞相比,从前列腺癌患者获得的血液巨噬细胞显示出在细胞内包含非常更高水平的前列腺特异性抗原。参见Herwig et al.,Clinical Prostate Cancer 3,184(2004)和Herwig et al.,Prostate 62,290(2005)。这被认为是吞噬肿瘤细胞的结果。已知胎儿干细胞、有核红细胞、胎儿淋巴细胞,以及大量的无细胞胎儿核酸在母体血液中循环。参见Cheung et al.,Nat.Genet.14,264(1996)。

[0013] 还已经表明当来自人伯基特淋巴瘤细胞的凋亡体(膜包封的细胞片段)与人单核细胞(吞噬的)或血管平滑肌细胞(非吞噬的)一起培养时,单核细胞表现出高百分比的爱波斯坦-巴尔病毒(EBV)特异性的肿瘤基因阳性细胞,而平滑肌细胞表现出大约0.01%频率的吸收和表达。

[0014] 需要可以提供在个体中,如已知没有疾病或患有复发性疾病的个体中早期诊断疾病(如肿瘤)的存在的方法。本发明的一个目的是便于在动物,包括人的白细胞(WBC)亚群中检测疾病特异性(如肿瘤特异性)标记,如蛋白质、RNA、DNA、碳水化合物和/或脂质等。

发明内容

[0015] 本发明的实施方式是基于使用吞噬细胞来确定与某一疾病或病症相关的标记物的存在与否。根据本发明的某些实施方式,在血中循环的结合细胞和/或片段和/或其成分

的吞噬细胞是特定疾病或病症的标志(标记,特征)。吞噬细胞的内容物(含量)提供了特定疾病或病症的标记谱(分布),例如通过细胞中的DNA和/或蛋白含量或通过细胞进行的DNA或蛋白表达。吞噬和非吞噬WBC的DNA表达谱的比较导致在吞噬细胞内肿瘤特异性、疾病特异性或病症特异性DNA标志的检测,其在非吞噬细胞中不表达或低表达。类似地,吞噬和非吞噬WBC的蛋白表达谱导致在吞噬细胞中肿瘤特异性、疾病特异性或病症特异性蛋白标志的检测,其在非吞噬细胞中不表达或低表达。因此,在某些实施方式中,本发明的方法在怀疑患有癌症的个体中识别实体瘤(例如,原发和转移损伤)的存在和/或在病理标志和症状表现前识别实体瘤的存在,并检测疾病的复发。根据其它实施方式,本发明的方法通过从血液或其它体液识别特异性标志来诊断某些疾病或其它病症。

[0016] 本发明部分基于以下发现,即,个体的血细胞成分如吞噬细胞和非吞噬细胞可以理想地适于肿瘤特异性和正常的、非特异性标志的容易识别和区别,并且因此消除由于固有的个体间差异(如年龄、性别、种族背景、健康状态)和基因表达中的短暂改变造成的基线的不平坦。

[0017] 在某些示例性的实施方式中,提供了一种用于在怀疑患有癌症和/或一种或多种其它疾病或障碍或病症的个体的WBC(从血液或其它体液,如尿、粪便、淋巴、脑脊液等中获得)中识别肿瘤和/或其它疾病特异性标志的方法。本发明的实施方式提供了患者特异性结果,并且不依赖于种群衍生的平均标志谱和从"健康"对照获得的值,即基线/本底标志对被评价的个体的基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组、和/或脂蛋白组谱是特异性的。本发明的实施方式提供了一种筛查、诊断和监测疾病的个性化诱因。

[0018] 在某些实施方式中并参照图1,本发明是基于吞噬细胞吞噬并消化下列物质的能力:活的、垂死和死亡的细胞(例如,凋亡细胞、坏死细胞),微生物(如细菌(如,立克次氏体)、病毒、真菌、酵母、原生动物等)亚细胞颗粒和/或它们的片段(卡哈尔体、细胞膜、中心粒、中心体、基因工程微生物(gems)、高尔基体、溶酶体、线粒体、核膜、细胞核、核仁、旁斑体、早幼粒细胞性白血病体(PML体)、核糖体、粗面内质网、光面内质网、空泡、泡囊、微囊等),和细胞碎片,如染色体,DNA(核的和线粒体的),外显子,基因,内含子,蛋白质,朊蛋白,碳水化合物结合蛋白,糖蛋白,脂蛋白,RNA,微小RNA,脂质,凋亡小体,细胞核,微囊,外来体,核小体,多形间期核复合物(PIKA),剪接斑等),并且在非吞噬细胞中不存在这些标志。因此,对DNA(核的,线粒体的)、RNA、微小RNA、蛋白质、朊蛋白、碳水化合物结合蛋白、糖蛋白、脂质、脂蛋白、凋亡小体、核、微囊、外来体和/或核小体和/或吞噬WBC的表达谱的分析以及它们与从同一供体的血或其它体液获得的非吞噬细胞的那些的比较提供了吞噬细胞(患者特异性标志)中肿瘤和/或疾病特异性标志的识别,其在非吞噬细胞中不表达或者显著不同地表达(患者特异性噪声)。由于吞噬细胞和非吞噬细胞都由骨髓中相同的多能干细胞产生,因此如图2所示,从吞噬细胞中发现的标志减去非肿瘤相关/诱导的标志谱(在非吞噬细胞中识别)允许识别在特定患者样本中肿瘤和/或疾病特异性标志。根据某些其它实施方式,体液中的细胞碎片可以通过entosis(细胞吸收)、胞吞和胞饮作用而内化。

[0019] 根据本发明的一个实施方式并参照图3,从具有包括吞噬细胞和非吞噬细胞(如WBC)的血液样品的患者中获得血液样品。吞噬细胞(如嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、泡沫细胞)于是与非吞噬细胞(如T细胞、B细胞、裸细胞、嗜碱性细胞)通过本领域技术人员已知的方法分开。根据本发明,WBC的表型通过吞噬活的/垂死的/死亡的CTC(以及

它的亚细胞片段)和/或血液中存在的肿瘤和/或疾病特异性DNA、RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质而改变。吞噬作用导致这些肿瘤和/或疾病标志内化到吞噬的细胞中并且很可能使具有其肿瘤特异性体细胞突变(或其它疾病相关的突变)的肿瘤细胞DNA整合到正常吞噬细胞DNA中(即,其靶细胞的染色体的转染)。吞噬细胞的"转染"DNA随后转录成RNA并且将RNA翻译成蛋白质产生了与非吞噬WBC不同的表型。

[0020] 因此,利用从具有癌症(和/或一种或多种其它疾病)的个体获得的吞噬和非吞噬WBC(如图3所示)的DNA、RNA、蛋白、和/或脂质表达谱的领域中的技术人员已知的基因组、蛋白质组的、代谢物组的、糖组的、糖蛋白组的、脂质组的和/或脂蛋白组方法的比较用于识别吞噬细胞中选择性的肿瘤特异性(和/或疾病特异性和/或病症特异性)标志和/或谱,其证实了在个体中存在隐伏肿瘤(或其它疾病或病症)。根据本发明,如图2所示,从非吞噬细胞减去吞噬细胞的DNA、RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质谱提供了用于识别(即,在基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组和/或脂蛋白组的分析后)特定患者的血液样品(和/或其它生物样品)中的肿瘤特异(和/或疾病特异性)标志的方法并意味着隐伏肿瘤和/或其它疾病的存在。

[0021] 在某些示例性的实施方式中,将吞噬细胞和非吞噬细胞(如,从血液或一种或多种其它生物样品(如尿、粪便、唾液、淋巴、脑脊液等)中获得的)分开。由于吞噬性WBC对CTC(以及其亚细胞片段)的吞噬作用导致肿瘤细胞内化到吞噬细胞的细胞质中,因此吞噬细胞内的DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物和/或脂质的量会比非吞噬细胞中的高。从而,吞噬细胞与非吞噬细胞之间的这些成分的量和谱的比较被用作癌症存在的指示。

[0022] 在某些示例性的实施方式中,提供了一种用于诊断在个体中存在癌症细胞的方法。该方法包括以下步骤:从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱(表达谱,表达曲线),从来自该个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱,比较第一和第二表达谱,识别对第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达,以及将对第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与个体中存在癌症细胞相关联。

[0023] 在某些示例性的实施方式中,提供了一种用于在具有癌症的个体中识别肿瘤特异性标志的方法。该方法包括以下步骤:从来自具有癌症的个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱,从来自具有癌症的个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱,比较第一和第二表达谱,识别对第一表达谱特异的两种或多种标记物的差异表达,并使两种或多种标记物特异性的差异表达与具有癌症的个体中的肿瘤特异性标志相关联。

[0024] 在某些示例性实施方式中,提供了一种用于诊断个体中癌症细胞的存在的方法,包括以下步骤:从来自个体的血液吞噬细胞中获得第一表达谱,以及从来自个体的血液非吞噬细胞中获得第二表达谱。该方法包括以下步骤:比较第一和第二表达谱,识别对第一表达谱特异的循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在,并将循环肿瘤细胞或其亚细胞片段的存在与个体中癌症细胞的存在相关联。在某些方面,相对于第二表达谱,某个标记物在第一表达谱中量的增加表明循环肿瘤细胞或它的亚细胞片段的存在。

[0025] 在某些示例性实施方式中并参照图4-图6,提供了一种用于诊断个体中癌症细胞的存在的方法,包括以下步骤:从个体中分离吞噬细胞群,以及将2n吞噬细胞与>2n吞噬细胞分开。该方法包括以下步骤:从2n吞噬细胞中获得第一表达谱,从>2n吞噬细胞中获得第二表达谱,比较第一和第二表达谱,以及识别对第一表达谱特异的一种或多种标记物的差

异表达。该方法还包括将对第一表达谱特异的一种或多种标记物的差异表达与个体中癌症细胞的存在相关联的步骤。

[0026] 在这里描述的方法的某些方面中，标记物包括DNA、RNA、微小RNA(例如，对应于癌基因、致癌基因、抑制基因或它们的任何组合)、蛋白质(例如，由癌基因、致癌基因、抑制基因或它们的任何组合编码的蛋白或多肽)、脂质、碳水化合物和/或它们的任何组合。在某些方面，血液吞噬细胞是嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突细胞、嗜酸粒性细胞、泡沫细胞或它们的任何组合。在某些方面，血液非吞噬细胞是T细胞、B细胞、裸细胞、嗜碱性粒细胞或它们的任何组合。在其它方面，血液吞噬细胞和血液非吞噬细胞利用本领域技术人员已知的方法如抗体从全血中分离。在其它方面，血液吞噬细胞和血液非吞噬细胞利用本领域技术人员已知的方法如荧光激活细胞分类术(FACS)从全血细胞的种群中分离。在其它方面，血液吞噬细胞和血液非吞噬细胞利用结合至在WBC群的质膜上表达的分子受体的配体来分开。在其它方面，血液吞噬细胞和血液非吞噬细胞通过一种或多种方法包括过滤、基于梯度的离心、洗脱、微流体(微流体技术)等来分离。在某些方面，个体患有一种或多种隐秘(隐性)(例如，潜伏的、未诊断的、隐藏的或隐蔽的)癌症、先前诊断的原发癌症和转移癌症。在某些方面，该方法包括将一种或多种标记物的存在同癌症治疗的效能相关联的步骤。

[0027] 在某些示例性实施方式中，通过比较吞噬细胞和非吞噬细胞的表达谱以确定感染原或除了癌症外的疾病的标记物标志的差异表达，上述方法被用来检测、识别或诊断感染源或除癌症外的疾病的存在。在又一方面，这里描述的一种或多种方法被用于检测病原体(如病毒、细菌、立克次氏体、原生动物、寄生虫、真菌、酵母等)和其它疾病或病状(如阿尔茨海默氏病、痴呆、心力衰竭、动脉粥样硬化、关节炎、遗传性障碍、骨病、胃肠疾病、朊蛋白疾病、和感染性疾病)的DNA、RNA、蛋白质、碳水化合物和/或脂质谱。

[0028] 在此处描述的方法的某些方面中，标记物包括病原体DNA、病原体RNA、病原体蛋白、病原体多肽、病原体脂质以及它们的任何组合。在某些方面，感染原是病毒、细菌、真菌、寄生虫、感染性蛋白以及它们的任何组合。在某些方面，该方法包括使一种或多种标记物的存在与病原体治疗的效能相关联的步骤。

[0029] 因此本文描述的方法和组合物可以在患者的血样中容易地识别肿瘤特异性标志，而无需依赖于种群衍生的平均标志谱和由“健康”对照获得的值。具体地，本处描述的方法和组合物可以容易且经济地：(i)在病理标志或症状表现之前在个体中识别肿瘤(原发性和转移性损伤)的存在；(ii)在怀疑患有癌症的个体中识别肿瘤(原发性和转移性损伤)的存在；和/或(iii)在经受/伴随各种治疗的个体中检测肿瘤(原发性和转移性损伤)复发。

[0030] 因此，本处所描述的方法和组合物(i)提供癌症的非侵入性筛查；(ii)允许诊断肿瘤，特别是在最早的时间点；(iii)在肿瘤进程的通路对更早的点进行更有意义的干预，从而防止转移性疾病的发展；(iv)监测常规或实验性治疗的早期反应；(v)预测常规或实验性治疗的反应；(vi)通过允许快速识别副作用可能不会被期待的益处平衡的无效治疗来促进有效治疗的选择；(vii)使患者的不适和失能最小化；(viii)使得肿瘤的检测、诊断、和治疗密切结合(例如，抗癌症治疗的个性化)；(ix)提供肿瘤类型和阶段的预测和早期检测；(x)提供治疗选择；(xi)确定肿瘤是否是转移性的；(xii)提供用于监测疾病的方法；和(xii)用于疾病预后的方法。

附图说明

[0031] 本专利或申请包含至少一幅以彩色绘制的附图。通过请求官方和交付必要费用后可以提供本专利或本专利申请公开的带有彩色附图的副本。通过以下结合附图的示例性实施方式的详细描述，本发明的前述和其它特征以及优点将被更全面地理解，其中：

[0032] 图1示意性地示出了提出的通路，该通路在吞噬活的CTC、凋亡的CTC、破碎的CTC、由活的和/或凋亡的肿瘤细胞释放的肿瘤DNA、RNA、蛋白质和脂质后，通过吞噬细胞获得肿瘤特异性DNA、RNA、蛋白和/或脂质标志。应当注意，仅吞噬细胞(并且不是非吞噬细胞)获得肿瘤标志。

[0033] 图2示意性地示出了用于识别在患有卵巢癌(OC)患者的吞噬细胞中或由其表达的癌症标志的分析方法。

[0034] 图3示意性地示出了本发明的方法的一个实施方式的总体流程图。

[0035] 图4示意性地示出了提出的通路，该通路在吞噬活的CTC、凋亡CTC、破碎的CTC、由活的和/或凋亡的肿瘤细胞释放的肿瘤DNA、RNA、蛋白质和脂质后，通过血液吞噬细胞获得肿瘤特异性DNA、RNA、蛋白和/或脂质标志。应当注意，吞噬作用后的吞噬细胞的DNA含量为>2n。

[0036] 图5示意性地示出了在携带BC的动物中识别乳腺癌(BC)标志的分析途径。

[0037] 图6示意性地示出了本发明的方法的另一实施方式的总体流程图。

[0038] 图7示出了从LNCaP和LLC1细胞分离的总RNA的凝胶电泳分析。

[0039] 图8列出了从小鼠白细胞(WBC)获得的RNA的产率和质量。*＝每组6个细胞制备的平均值。

[0040] 图9描述了这样的阵列，该阵列示出了7个在来自LNCaP(人前列腺癌)肿瘤携带裸小鼠的嗜中性粒细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关的基因。(A)LNCaP肿瘤。(B)由携带LNCaP肿瘤的裸小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_T)。(C)由携带LNCaP肿瘤的裸小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)由非肿瘤携带裸小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)中和来自肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带的小鼠的巨噬细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在N_T中的表达比在N_N和T_T中的表达≥2倍。

[0041] 图10描述了这样的阵列，该阵列示出了3个在来自LNCaP(人前列腺癌)肿瘤携带裸小鼠的巨噬细胞中检测的上调的、癌症相关的基因。(A)LNCaP肿瘤。(B)由携带LNCaP肿瘤的裸小鼠获得的巨噬细胞(M_T)。(C)由携带LNCaP肿瘤的裸小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)由非肿瘤携带的裸小鼠获得的巨噬细胞(M_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)中和来自肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带的小鼠的巨噬细胞(D)和非吞噬的T细胞(C)中最低限度地表达。在M_T中的表达比在M_N和T_T中的表达≥2倍。

[0042] 图11描述了这样的阵列，该阵列示出了34个在来自LS174T(人结肠癌)肿瘤携带的裸小鼠的嗜中性粒细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)LS174T肿瘤。(B)从携带LS174T肿瘤的裸小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_T)。(C)从携带LS174肿瘤的裸小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的裸小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在N_T中的表达比在N_N和T_T中的表达≥2倍。

[0043] 图12描述了这样的阵列，该阵列示出了3个在来自LS174T(人结肠癌)肿瘤携带裸小鼠的巨噬细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)LS174T肿瘤。(B)从携带LS174T肿瘤的裸小鼠获得的巨噬细胞(M_T)。(C)从携带LS174肿瘤的裸小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的裸小鼠获得的巨噬细胞(M_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在M_T中的表达比在M_N和T_T中的表达≥2倍。

[0044] 图13描述了这样的阵列，该阵列示出了5个在来自LLC1(小鼠转移肺癌)肿瘤携带C57/B1小鼠的嗜中性粒细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)LLC1肿瘤。(B)从携带LLC1肿瘤的C57/B1小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_T)。(C)从携带LLC1肿瘤的C57/B1小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的C57/B1小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在N_T中的表达比在N_N和T_T中的表达≥2倍。

[0045] 图14描述了这样的阵列，该阵列示出了2个在来自LLC1(小鼠转移肺癌)肿瘤携带C57/B1小鼠的巨噬细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)LLC1肿瘤。(B)从携带LLC1肿瘤的C57/B1小鼠获得的巨噬细胞(M_T)。(C)从携带LLC1肿瘤的C57/B1小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的C57/B1小鼠获得的巨噬细胞(M_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在M_T中的表达比在M_N和T_T中的表达≥2倍。

[0046] 图15描述了这样的阵列，该阵列示出了2个在来自B16F10(小鼠转移黑色素瘤)肿瘤携带的C57/B1小鼠的嗜中性粒细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)B16F10肿瘤。(B)从携带B16F10肿瘤的C57/B1小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_T)。(C)从携带B16F10肿瘤的C57/B1小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的C57/B1小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_T)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的嗜中性粒细胞(D)和非吞噬T细胞(C)中最低限度地表达。在N_T中的表达比在N_N和T_T中的表达≥2倍。

[0047] 图16描述了这样的阵列，该阵列示出了1个在来自B16F10(小鼠转移黑色素瘤)肿瘤携带的C57/B1小鼠的巨噬细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)B16F10肿瘤。(B)从携带B16F10肿瘤的C57/B1小鼠获得的巨噬细胞(M_T)。(C)从携带B16F10肿瘤的C57/B1小鼠获得的T细胞(T_T)。(D)从非肿瘤携带的C57/B1小鼠获得的巨噬细胞(M_N)。圈出的标志在肿瘤细胞(A)和来自肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(B)中表达，并且在来自非肿瘤携带小鼠的巨噬细胞(D)和非吞噬的T细胞(C)中最低限度地表达。在M_T中的表达比在M_N和T_T中的表达≥2倍。

[0048] 图17描述了这样的阵列，该阵列示出了5个在来自患有头颈癌(鳞状细胞癌)的患者的嗜中性粒细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)正常组织(皮肤)活检。(B)肿瘤组织活检。(C)从患者血液获得的嗜中性粒细胞(N_T)。(D)从患者血液获得的T细胞(T_T)。圈出的标志在肿瘤细胞(B)和来自患者血液的嗜中性粒细胞(C)中表达，并在正常皮肤(A)或非吞噬T细胞(D)中最低限度地表达或没有表达。在N_T中的表达比在T_T和皮肤中的表达≥2倍。

[0049] 图18描述了这样的阵列，该阵列示出了23个在来自患有卵巢癌(腺癌)的患者的巨噬细胞中检测的上调(≥2倍)的、癌症相关基因。(A)从患者血液获得的巨噬细胞(M_T)。(B)从患者血液获得的T细胞(T_T)。圈出的标志在来自患者的巨噬细胞(A)中表达并在非吞噬T细胞(B)中最低限度地表达。在M_T中的表达比在T_T中的表达≥2倍。

[0050] 图19描述了一种用于在吞噬细胞中识别肿瘤标志的方法。在该实例中，与来自同一动物的T细胞(T_T)相比，对在来自肿瘤携带动物的巨噬细胞(M_T)中的癌症相关基因的表达强度进行量化，并且识别过表达>2倍的那些。接着，对M_T中的所有表达的基因的强度进行量化并与从非肿瘤携带动物的巨噬细胞(M_{NT})中的那些进行比较，并且识别了过表达>2倍的基因。选择两个列表共有的基因并与由同一肿瘤表达的那些基因(阴影区域(由肿瘤携带动物的巨噬细胞表达的肿瘤标志))相比较。

[0051] 图20描述了在(A)从携带LNCaP人前列腺肿瘤的裸小鼠获得的巨噬细胞(M_{LNCaP})和从相同动物获得的T细胞(T细胞$_{LNCaP}$)，(B)M_{LNCaP}和从非肿瘤携带小鼠获得的巨噬细胞($M_{非肿瘤}$)，(C)从携带LNCaP人前列腺肿瘤的裸小鼠获得的嗜中性粒细胞(N_{LNCaP})和从相同动物获得的T细胞(T细胞$_{LNCaP}$)，以及(D)N_{LNCaP}和从非肿瘤携带小鼠获得的巨噬细胞($N_{非肿瘤}$)中的基因表达强度比较。以红色表示的基因过表达>2倍；以绿色表示的那些基因向下表达>2倍。

[0052] 图21列出了吞噬的嗜中性粒细胞(N)和巨噬细胞(M)内的癌症相关基因的表达。

[0053] 图22列出了与非吞噬T细胞相比，在患有卵巢癌的患者的吞噬巨噬细胞中上调(>2倍)的癌症相关基因。*＝致癌基因。

[0054] 图23描述了从小鼠WBC获得的蛋白样品(5.9μg)的(10％)SDS凝胶电泳。

[0055] 图24描述了从肿瘤携带小鼠获得的T细胞和单核细胞/巨噬细胞(M/M)中的TAG-72和PSA表达的蛋白质印迹分析，表明仅在吞噬细胞中存在标志。

具体实施方式

[0056] 本发明的实施方式涉及一种这样的方法，该方法基于吞噬细胞的细胞内容物(含量)和/或表达谱而提供与疾病、感染原和身体状况相关的患者特异性表达谱。根据本发明的一个方面，吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱与对于特定疾病状态或病症(状况)的已知标记物进行比较，从而检测和/或诊断特定的疾病状态或病症。根据本发明的另外的方面，吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱与来自单一患者的血液的非吞噬细胞的内容物和/或表达谱相比较。从吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱减去来自非吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱产生了代表仅个体的疾病状态的细胞内容物和/或表达谱。

[0057] 根据本发明的另外的实施方式，获得来自个体的吞噬细胞群，并且将来自DNA含量大于2n的群的吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱与来自DNA含量为2n的同一群体的吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱相比较。根据本发明的另外的实施方式，获得来自个体的吞噬细胞群，并将来自RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质含量大于正常且DNA指数大于1的群的吞噬细胞的表达谱与来自RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质含量正常和/或DNA指数为1的相同群的吞噬细胞的表达谱相比较。

[0058] 这样的患者特异性表达谱消除了对特定疾病或感染原的种群衍生的平均标志谱的依赖，这可能将误差引入到个体特定疾病的检测或诊断中。本发明的用于疾病状态的这样的患者特异性表达谱使得对个体进行检测、诊断和治疗以个性化。

[0059] 参考图1-图3并根据本发明的某些实施方式，对从携带大约3周龄的人皮下(s.c.)肿瘤(前列腺LNCaP腺癌或LS174T结肠腺癌)或小鼠肿瘤(B16F10转移黑色素瘤，静脉内给予的，或LLC1肺癌，皮下注射)的小鼠获得的吞噬和非吞噬WBC的基因表达谱进行比较。结果表明从这些肿瘤携带小鼠获得的嗜中性粒细胞和巨噬细胞表达各种致癌基因和其它癌症相关基因标志，这些标志还在每种相应的肿瘤中表达。参见图9-图16和图19-图21。这些癌症相关的基因和致癌基因(如，ERBB2，Jun，Fos等)没有被(i)从肿瘤携带小鼠分离的非吞噬T细胞，和(ii)从非肿瘤携带小鼠获得的嗜中性粒细胞和巨噬细胞表达或被最低限度地表达。并且，仅来自肿瘤携带小鼠的吞噬细胞被发现表达肿瘤特异性蛋白。参见图23和图24。小鼠的血液中的CTC和/或肿瘤特异性DNA和/或蛋白被吞噬，并且某些肿瘤细胞DNA和它的肿瘤特异性突变和基因类似地通过转染(不受理论约束)到正常的吞噬细胞DNA中而整合，转录为RNA，并翻译成蛋白。

[0060] 参考图1-图3并根据本发明的某些示例性实施方式，还比较了从患有头颈肿瘤或卵巢癌的患者获得的吞噬和非吞噬WBC的基因表达谱。结果表明从这些患者获得的嗜中性粒细胞和巨噬细胞表达各种致癌基因和其它癌症相关标志，其还在每种相应的肿瘤中表达。参见图17-图18和图22。这些癌症相关基因和致癌基因没有被从同一个体患者分离的非吞噬T细胞中表达或最低限度地表达。患者血液中的CTC和/或肿瘤特异性DNA和RNA被吞噬并且某些肿瘤细胞DNA和/或RNA，和它的肿瘤特异性突变和基因类似地通过转染(不受理论约束)到正常的吞噬细胞DNA中而整合，转录为RNA，并翻译成蛋白。

[0061] 参考图4-图6并根据某些示例性实施方式，由(1)DNA含量为>2n($P_{n>2}$)或(2)RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质含量大于正常，即具有吞噬的CTC和/或它们的亚细胞片段或DNA/RNA/脂质(即，肿瘤特异性标志或其它疾病特异性标志)和/或具有大于1的DNA指数的血液或一种或多种其它生物样品(如尿、粪便、唾液、淋巴、脑脊液等)获得的吞噬细胞(如巨噬细胞)的DNA(核的和/或线粒体的)、RNA、微小RNA、蛋白质、和/或脂质表达谱的定量分析，以及它们与(1)DNA含量为2n($P_{n=2}$)，或RNA、蛋白、碳水化合物和/或脂质含量正常，即具有未吞噬的CTC和/或它们的亚细胞片段并且具有1的DNA指数的相同吞噬细胞群(如巨噬细胞)的比较，提供了一种检测$P_{n>2}$细胞中的肿瘤特异性(或其它疾病特异性)标志(患者特异性标志)的方法，该标志在$P_{n=2}$细胞中不表达或最低限度地表达(患者特异性噪声)。参考图6，从如图5所示的$P_{n>2}$减去$P_{n=2}$的DNA、RNA、蛋白、和/或脂质谱提供了一种(例如，在一种或多种基因组的、蛋白质组的、代谢物组的、糖组的、糖蛋白组的、脂质组的和/或脂蛋白组的分析后)在患有癌症(和/或其它疾病和/或身体状况)的动物和/或人的血样(或一种或多种生物样品如其它体液)中识别肿瘤特异性(和/或疾病特异性和/或病症特异性)标志并预示隐秘肿瘤和/或其它疾病和/或其它病症的存在的方法。与使吞噬细胞的基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组和/或脂蛋白组的图谱与非吞噬细胞的那些相比的上面描述的方法不同，根据本发明的该分析检测方法的主要优点是：(i)它利用单个吞噬细胞亚群作为“肿瘤特异性”(例如，$P_{n>2}$巨噬细胞)和“正常非特异性”(例如，$P_{n=2}$巨噬细胞)标志的来源，即两种共享相同的基线基因型；以及(ii)标志获取细胞(例如，$P_{n>2}$嗜中性粒细胞)并不被没有吞噬并因此没有获取的死亡CTC和/或其片段(例如，$P_{n=2}$嗜中性粒细胞)的那些稀释。

[0062] 参考图4-图6并根据某些示例性实施方式，由作为吞噬或内化其它活的、垂死的或死亡的(例如，凋亡的或坏死的)细胞、凋亡小体、核、微囊、外泌体、核小体、线粒体、内质网

等结果的胞内内容物大于具有正常细胞内容物(P_{NIC})的相同吞噬细胞群(如吞噬细胞)的血液或一种或多种其它生物样品或体液(如尿、粪便、唾液、淋巴、脑脊液等)获得的吞噬细胞(如巨噬细胞)的定量分析,即,不具有吞噬任何上述细胞和/或细胞碎片(患者特异噪声)的细胞,提供了一种在具有增加的胞内内容物的吞噬细胞(P_{IIC})中检测肿瘤特异性(或其它疾病特异性或其它病症特异性)标志的方法,这些标志在具有正常胞内内容物的吞噬细胞中不表达或最低限度地表达(患者特异性噪声)。参考图6,从如图5所示的P_{IIC}减去P_{NIC}的DNA、RNA、蛋白和/或脂质谱提供了一种在患有癌症或其它疾病的动物的血液样品(或一种或多种其它生物样品如其它体液)中识别(例如,在一种或多种基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组、和/或脂蛋白组的分析后)肿瘤特异性(和/或疾病特异性)标志并预示隐秘肿瘤和/或其它疾病的存在的方法。与使吞噬细胞的基因组、蛋白质组、代谢物组、糖组、糖蛋白组、脂质组和/或脂蛋白组的谱与非吞噬细胞的那些相比的上面描述的方法不同,根据本发明的该分析检测方法的主要优点是:(i)它利用单一的吞噬细胞亚群作为"疾病特异性"(如P_{IIC}巨噬细胞)和"正常非特异性"(如P_{NIC}巨噬细胞)标志的来源,即它们共享相同的基线基因型;以及(ii)标志获取细胞(例如,P_{IIC}嗜中性粒细胞)不被没有吞噬并因此没有获取的死亡CTC和/或其片段(例如,P_{NIC}嗜中性粒细胞)的那些稀释。

[0063] 这里描述的方法(i)具有高特异性、敏感性、和准确性并应当能在血液样品(或其它生物样品如体液)中检测肿瘤特异性(和/或其它疾病特异性)和正常非特异性标志的存在;以及(ii)消除由于基因表达中的内在(如年龄、性别、种族背景、健康状态等)和短暂变化引起的在个体中已知出现的"基线的不平坦"。因此,在某些方面,本发明提供了非侵入性分析,用于在患者中早期检测隐秘的原发和转移肿瘤(和/或一种或多种其它疾病或病症),即,在可以通过常规成像技术(如PET、MRI、CT等)诊断疾病之前,并且因此提供了一种用于相对于需要的改善的决策和用于对具有癌症的个体干预、防止和治疗的策略的基础。

[0064] 如此处使用的,术语"肿瘤特异性标记物"旨在包括但不限于,一种或多种细胞成分如一个或多个DNA序列、一个或多个RNA序列、一种或多种蛋白、一种或多种多肽、一种或多种脂质等。在某些方面,肿瘤特异性标记物存在于一种或多种WBC,例如,嗜中性粒细胞、巨噬细胞和/或树突细胞中。

[0065] 如此处使用的,术语"癌症相关基因"是指这样的基因,例如癌基因、致癌基因和/或肿瘤抑制基因,其在癌细胞(例如WBC如巨噬细胞、嗜中性粒细胞、T细胞等)中改变表达(例如,当与非癌细胞相比增加表达或降低表达)。许多癌症相关基因在本领域中是已知的。癌症相关基因包括,例如,但不限于,ERBB2、JUN、RB1、SUPP1、MDM2、MAP2K1、PDGFB、PLAUR、FGR、MYCL1、BLYM、NRAS1、PE1、SKI、TRK、ABL2、MYCN、RAB1、REL、RALB、LCO、ERBB4、RAF1、ECT2、KIT、FGF5、GRO1、GRO2、GRO3、FMS、PIM、KRASIP、FYN、MYB、ROS1、MAS1、RALA、MYCLK1、GLI3、ARAF2、MET、BRAF、MOS、LYN、MYBL1、MYC、OVC、VAV2、BMI1、RET、HRAS、SPI1、RELA、SEA、EMS1、ETS1、KRAS2、ERBB3、GLI、FLT、BRCA2、RBI、FOS、AKT1、ELK2、FES、MAF、TP53、CRK、ERBA1、NF1、EVI2、ERBBB2、INT4、BRCA1、YES1、JUND、JUNB、MEL、LPSA、VAV1、AKT2、FOSB、RRAS、HKR1、HKR2、ERBAL2、SRC、MYBL2、ETS2、ERG、ARAF1、YUASA、HS2、INT3、SNO、RMYC、BMYC、HRASP、TC21、TIM、PTI-1、JAK、CEA家族中的一种或多种成员(参见,例如Zhou et al.(2001)Gene 264:105)、PSA、MUC-16等。

[0066] 如此处所使用的,术语"癌症"是指各种类型的恶性赘生物,它们中的大多数可以

侵入周围组织，并且可以转移至不同部位(参见，例如PDR Medical Dictionary，第一版(1995)，将其全部内容以引用方式并入本文用于所有目的)。术语“赘生物”和“肿瘤”是指通过比正常组织更快细胞增殖而生长并且在去除起始的增殖刺激后继续生长的异常组织。同样，这样的异常组织显示出部分或完全缺少结构组织和与可能是良性的(即，良性瘤)或恶性的(即，恶性瘤)的正常组织的功能协调。

[0067] 癌症的总体分类的实例包括，但不限于，恶瘤(癌)(即，来自上皮细胞的恶性瘤，如乳腺、前列腺、肺和结肠癌的普通形式)、肉癌(即，来自结缔组织或间叶细胞的恶性瘤)、淋巴瘤(即，来自造血细胞的恶变)、白血病(即，来自造血细胞的恶变)、胚细胞瘤(即，来自全能细胞的瘤)。在成年人中，最通常在睾丸和卵巢中发现；在胎儿、婴儿和幼童中，最通常在身体中线，尤其是尾骨的尖端发现)，产孢肿瘤(即，类似未成熟或胚胎组织的典型的恶性瘤)等。

[0068] 旨在被本发明涵盖的赘生物的类型的实例包括但不限于与神经组织、血形成组织、乳腺、皮肤、骨、前列腺、卵巢、子宫、宫颈、肝、肺、大脑、喉、胆囊、胰腺、直肠、甲状旁腺、甲状腺、肾上腺、免疫系统、头和颈、结肠、胃、支气管，和/或肾的癌症相关的那些赘生物。

[0069] 在某些示例性的实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物被用来检测、识别和/或诊断与胎儿染色体异常(如唐氏综合症、自闭症和相关的自闭症谱系障碍(包括但不限于，亚斯普杰氏综合症和广泛发育障碍-没有以其它方式明确的)、镰状细胞贫血、地中海贫血等)的存在有关的障碍，由于在母血中存在胎儿细胞和DNA。这些障碍中的一种或多种的筛查和诊断可以利用此处描述的方法和/或组合物来实施以检测母体血液吞噬细胞中的一种或多种染色体标记，如DNA和RNA等。

[0070] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物可以用来通过检测在怀孕妇女的血液内的胎儿来源的蛋白质组的、脂质组的和/或基因组的标志的存在作为胎儿干细胞、有核红细胞、胎儿淋巴细胞、以及已知在母血中循环的显著量的无细胞胎儿核酸来测试怀孕妇女体内的胎儿的性别。根据此处描述的方法，将吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱与来自怀孕妇女的血液的非吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱相比较。从吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱中减去来自非吞噬细胞的细胞内容物和/或表达谱形成了代表由孕妇怀有的胎儿的性别的细胞内容物和/或表达谱。

[0071] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物可以通过检测垂死的/死亡的肌细胞和/或它的片段(如DNA、蛋白等)的存在而被用来检测、识别和/或诊断与患有或有发展心脏病(如心肌梗塞、慢性心力衰竭、缺血性心脏病、心血管死亡等)风险的受试者的血液内蛋白质组的和/或基因组的肌细胞标志的存在相关的障碍。利用此处描述的方法和/或组合物来进行这些障碍中的一种或多种的筛查和诊断以在血液吞噬细胞内检测一种或多种标记物如DNA、RNA、蛋白质等。

[0072] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物可以用来在具有或有发展作为冠状动脉狭窄、腹主动脉瘤等的结果的动脉粥样硬化风险的受试者的血液中检测、识别和/或诊断与蛋白的、脂质的和/或基因标志的存在有关的障碍。利用此处描述的方法和/或组合物进行这些障碍的筛查和诊断以检测血液吞噬细胞内的一种或多种标记物，如DNA、RNA、蛋白质等。

[0073] 活检确认排斥，一种用于诊断同种异体移植物排斥的方法，是侵入性的并且易于

产生取样误差。因此，检测用于诊断和管理移植器官排斥的分子生物标记的非侵入性分析的发展通过以下可用于移植受体的管理中：(a)检测在排斥前使治疗性干预引起移植物功能障碍的排斥前谱，(b)改善排斥诊断的敏感性和特异性，(c)发展将改善预后的新的用于排斥的分类系统，以及(d)为设计个体化的免疫抑制配方提供信息，其在最小化药物毒性的同时可以防止排斥。

[0074] 因此，在某些示例性的实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种标记物，如DNA、RNA、蛋白等可以在患有经受器官移植的受试者的血液内用来检测、识别或诊断与蛋白、脂质和/或基因标志的存在有关的障碍。

[0075] 线粒体疾病由线粒体的损伤产生。接着细胞损伤并且甚至细胞死亡。线粒体的疾病似乎导致脑、心脏、肝、骨骼肌、肾的细胞和内分泌和呼吸系统的主要损伤以及糖尿病、呼吸并发症、抽搐、阿尔茨海默病、视觉/听觉问题、乳酸性酸中毒、发育迟缓、对感染的敏感度，和癌症。

[0076] 因此，在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种基因组、线粒体相关的DNA标记物，可以被用于筛查、诊断和/或检测线粒体疾病。

[0077] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种标记物，如DNA、RNA、蛋白等，可以被用于筛查、诊断和/或检测阿尔茨海默氏病和/或痴呆。

[0078] 系统性红斑狼疮(SLE)是一种影响各种器官和系统的复杂自体免疫障碍。因此，在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种标记物，如DNA、RNA、脂质、蛋白等可以被用于筛查、诊断和/或检测SLE。

[0079] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种标记物，如DNA、RNA、蛋白质等可以被用于筛查和/检测可用于发展治疗的基因组和/或蛋白质组的标志和/或成像分子。

[0080] 在某些示例性实施方式中，此处描述的一种或多种方法和/或组合物通过在血液吞噬细胞中检测一种或多种标记物，如DNA、RNA、蛋白质、脂质等可以被用于筛查、诊断和/或检测基因组的、蛋白质组的和/或脂质组的标志改变，所述标志可用于检测由于一种或多种外在或内在损伤(如，脏弹暴露、辐射暴露、化学物质暴露、放射疗法、放射药物给予、治疗性分子暴露、氡暴露、石棉暴露、污染暴露等)的结果的疾病和病状。

[0081] 如此处所采用的，术语“生物体”包括但不限于，人个体、非人灵长类、牛、马、绵羊、山羊、猪、狗、猫、兔、小鼠、大鼠、沙鼠、青蛙、蟾蜍和它们的转基因物种。术语“生物体”进一步包括病原生物，包括但不限于，病原如寄生虫、酵母细胞、酵母四分体、酵母群落、细菌、细菌菌落、病毒粒子、病毒颗粒、病毒样颗粒和/或这些中的任何的培养物等。

[0082] 在某些示例性实施方式中，此处描述的分析可以用于检测感染原和/或诊断与通过感染原的细胞、组织、器官等的感染相关的障碍。在某些方面，利用此处描述的方法和/或组合物进行感染原的检测和/或与感染相关的障碍的诊断，以从一种或多种感染原中检测一种或多种感染原标记物，如DNA、RNA、蛋白质、脂质等。

[0083] 如此处使用的，术语“感染原”包括，但不限于，病原生物体如病毒、细菌、真菌、寄生虫、感染性蛋白等。

[0084] 病毒包括但不限于，DNA或RNA动物病毒。如此处使用的，RNA病毒包括但不限于，病毒家族如小核糖核酸病毒属(Picornaviridae)(如，脊髓灰质炎病毒)、呼肠弧病毒属(Reoviridae)(如，轮状病毒)、披膜病毒属(Togaviridae)(如，脑炎病毒、黄热病病毒、风疹病毒)、正粘病毒属(Orthomyxoviridae)(如，流感病毒)、副粘病毒属(如，呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、副流感病毒)、弹状病毒属(如，狂犬病病毒)、冠状病毒属、布尼亚病毒属、黄病毒属、线状病毒属、舞台病毒属、布尼亚病毒属和逆转录病毒属(如，人T细胞嗜淋巴细胞病毒(HTLV)、人免疫缺陷病毒(HIV))。如此处采用的，DNA病毒包括但不限于病毒家族如乳多空病毒属(如，乳头瘤病毒)、腺病毒属(如，腺病毒)，疱疹病毒属(如，单纯疱疹病毒)，和痘病毒属(如，天花病毒)。

[0085] 细菌包括但不限于，革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、耐酸菌等。

[0086] 如此处所使用的，革兰氏阳性菌包括但不限于，Actinomedurae、衣布放线菌、炭疽杆菌、蜡状芽胞杆菌、肉毒梭菌、艰难梭菌、产气荚膜梭菌、破伤风梭菌、科里氏杆菌、粪肠球菌、单核细胞增生杆菌、诺卡氏菌、疮疱丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、变异链球菌、肺炎链球菌等。

[0087] 如此处所使用的，革兰氏阴性菌包括但不限于，猫阿菲波菌、拟杆菌、杆菌状巴尔通氏体、百日咳杆菌、伯氏疏螺旋体、回归热疏螺旋体、布鲁氏菌、肉芽肿鞘杆菌、弯曲杆菌、大肠杆菌、土拉热弗朗西丝氏菌、阴道加德纳氏菌、埃及嗜血菌、杜氏嗜血菌、流感嗜血菌、幽门螺杆菌、嗜肺军团菌、问号钩端螺旋体、脑膜炎奈瑟氏球菌、牙龈卟啉单胞菌、Providencia sturti、铜绿假单胞菌、肠炎沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、沙雷氏菌、波伊德氏志贺氏菌、念珠状链杆菌、酿脓链球菌、苍白密螺旋体、霍乱弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌、鼠疫耶尔森氏菌等。

[0088] 如此处所使用的，耐酸菌包括但不限于，鸟分枝杆菌、麻分分枝杆菌、结核分枝杆菌等。

[0089] 如此处所使用的，不属于其它三类的其它细菌包括但不限于，汉氏巴尔通氏体、鹦鹉热衣原体、沙眼衣原体、伯氏考克斯氏体、肺炎支原体、螨立克次氏体、普氏立克次氏体、立氏立克次氏体、恙虫热立克次氏体、斑疹伤寒立克次氏体、解脲尿支原体、肺炎双球菌、恰菲埃里希氏体、屎肠球菌、脑膜炎球菌等。

[0090] 如此处所使用的，真菌包括但不限于、曲霉菌、念珠菌、白念珠菌、粗球孢子菌、隐球菌、以及它们的组合。

[0091] 如此处所使用的，寄生微生物包括但不限于，结肠小袋纤毛虫、隐性芽胞虫菌、卡晏环孢子球虫、脑炎原虫、溶组织内阿米巴、感染肠微孢子虫(毕氏肠微孢子虫)、蓝氏贾第虫、利什曼原虫、疟原虫、刚地弓形虫、锥体虫、梯形变形虫等。

[0092] 如此处所使用的，寄生虫包括虫(如，蠕虫)，特别是肠内寄生虫，包括但不限于，线虫类(蛔虫类，如，鞭虫、钩虫、蛲虫、蛔虫、血丝虫等)、绦虫类类(如，绦虫)。

[0093] 如此处所使用的，感染性蛋白包括朊病毒。由朊病毒引起的障碍包括但不限于，人类障碍如克雅氏病(CJD)(包括如医原性克雅氏病(iCJD)、变异克雅氏病(vCJD)、家族型克雅氏病(fCJD)、和偶发性克雅氏病(sCJD)、Gerstmann-Sträussler-Scheinker综合症(GSS)、致死性家族性失眠症(fFI)、偶发性致死失眠症(sFI)、苦鲁病等，以及在动物中的障碍如瘙痒病(绵羊和山羊)、牛海绵状脑病(BSE)(牛)、传染性水貂脑病(TME)(水貂)、慢性萎

缩病(CWD)(麋鹿、黑尾鹿)、猫海绵状脑病(猫)、外来有蹄类脑病(EUE)(林羚、羚羊、大捻角羚)、鸵鸟海绵状脑病等。

[0094] 在某些示例性实施方式中,提供了在生物样品中检测标记物如核酸序列(如DNA、RNA等)、蛋白、多肽、脂质、多糖等的方法。如此处所使用的,术语"核酸"旨在包括DNA分子(如,cDNA或基因组DNA)和RNA分子(如,mRNA)以及使用核苷酸类似物生成的DNA或RNA的类似物。核酸分子可以是单链或双链的。

[0095] 如此处所使用的,术语"氨基酸"包括含有碱性氨基和酸性羧基的有机化合物。包括在该术语内的为天然氨基酸(如,L-氨基酸)、修饰氨基酸和稀有氨基酸(如,D-氨基酸和β-氨基酸)、以及已知在生物体以自由或结合形式存在但通常并不存在于蛋白中的氨基酸。存在天然蛋白氨的基酸包括丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天门冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、色氨酸、脯氨酸、和缬氨酸。天然非蛋白氨基酸包括精氨基琥珀酸、瓜氨酸、半胱亚磺酸、3,4-二羟基苯丙氨酸、同型半胱氨酸、高丝氨酸、鸟氨酸、3-单碘化酪氨酸、3,5-二碘化酪氨酸、3,5,5-三碘化甲腺原氨酸、和3,3',5,5'-四碘甲腺原氨酸。修饰氨基酸和稀有氨基酸包括D-氨基酸、羟赖氨酸、4-羟脯氨酸、N-Cbz-保护的氨基酸、2,4-二氨基丁酸、高精氨酸、正亮氨酸、N-甲基氨基丁酸、萘基丙氨酸、苯基甘氨酸、α-苯基脯氨酸、叔亮氨酸、4-氨基环己基丙氨酸、N-甲基正亮氨酸、3,4-脱氢脯氨酸、N,N-2甲基氨基甘氨酸、N-甲基氨基甘氨酸、4-氨基吡啶-4羧酸、6-氨基己酸、反式-4-(氨甲基)环己烷羧酸、2-、3-、和4-(氨甲基)苯甲酸、1-氨基环戊烷羧酸、1-氨基环丙烷羧酸、以及2-苄基-5-氨基戊酸。

[0096] 如此处所使用的,术语"肽"包括由通过肽键连接的两个或多个氨基酸组成的化合物。肽可以具有小于10,000道尔顿、小于5,000道尔顿、或小于2,500道尔顿的分子量。术语"肽"还包括包含肽成分和非肽成分的化合物,诸如假肽或拟肽残基或其它非氨基酸成分。这样的包含肽成分和非肽成分的化合物也可以称作"肽类似物"。

[0097] 如此处所使用的,术语"蛋白"包括由以直链排列的并通过羧基与相邻氨基酸的氨基之间的肽键连接在一起的氨基酸组成的化合物。

[0098] 如此处所使用的,术语"脂质"包括合成的或天然存在的通常为两亲的和生物相容的化合物。脂质典型地包括亲水成分和疏水成分。示例性的脂质包括但不限于脂肪酸、中性脂肪、磷脂、糖脂等。如此处采用的,术语"脂质组合物"是指包含脂质化合物的组合物,通常在含水介质中。示例性的脂质组合物包括但不限于,悬浮液、乳浊液、泡囊组合物等。

[0099] 在生物样品中用于检测对应于本发明的标记物的多肽或核酸的存在与否的示例性方法包括从测试受试者中获得生物样品(如,体液样品(如血)和/或肿瘤样品),并使该生物样品与能够检测一种或多种标记物(如DNA、RNA、蛋白、多肽、碳水化合物、脂质等)的化合物或药剂接触。

[0100] 这里描述的检测方法可以用来在生物样品中体外以及体内检测一种或多种标记物(如DNA、RNA、蛋白、多肽、碳水化合物、脂质等)。例如,用于检测mRNA的体外技术包括RNA杂交和原位杂交。用于检测对应于本发明的标记的多肽的体外技术包括酶联吸附剂分析(ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。用于检测基因组DNA的体外技术包括DNA杂交。此外,用于检测对应于本发明的标记的多肽的体内技术包括向受试者体内引入针对该多肽的标记的抗体。例如,抗体可以用放射活性标记进行标记,该放射活性标记在受试者中的存

在和位置可以通过标准的成像技术来检测。

[0101] 用于分析生物样品中的脂质含量的方法在本领域中是已知的(参见,例如,Kang et al.(1992)Biochim.Biophys.Acta.1128:267;Weylandt et al.(1996)Lipids 31:977;J.Schiller et al.(1999)Anal.Biochem.267:46;Kang et al.(2001)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98:4050;Schiller et al.(2004)Prog.Lipid Res.43:499)。脂质分析的示例性方法是从生物样品中提取脂质(例如,利用含有0.005%丁基化羟基甲苯(BHT,作为抗氧化剂)的氯仿:甲醇(2:1,vol:vol),制备脂肪酸甲酯(如14%BF3-甲醇试剂),以及对定量化的脂肪酸甲酯进行定量(例如,通过HPLC、TLC,通过利用商购的气相色谱仪、质谱仪和/或组合气相色谱仪/质谱仪的气相色谱-质谱法)。脂肪酸的质量通过比较各种分析的脂肪酸的面积与固定浓度的内标的面积来确定。

[0102] 诊断和预测分析的一般原则涉及在适当的条件下以及足以使标记物和探针相互作用和结合的时间,制备可以包含标记物(例如,DNA、RNA、蛋白、多肽、碳水化合物、脂质等中的一种或多种)和探针的样品或反应混合物,由此形成在反应混合物中可以被去除和/或检测的复合物。这些分析可以通过多种方式来进行。

[0103] 例如,进行这样的分析的一种方法包括将标记或探针锚定到固相支持物,也称作基质上,并且在反应结束时检测锚定在固相上的目标标记物/探针复合物。在这样的方法的一个实施方式中,来自受试者的待用于分析标记物的存在和/或浓度的样品可以锚定到载体或固相支持物上。在另一个实施方式中,相反的情况是可能的,其中探针可以被锚定至固相并且可以使来自受试者的样品与分析的非锚定成分反应。

[0104] 存在许多用于将分析成分锚定至固相的确立的方法。它们包括但不限于通过生物素和链霉亲和素的结合而固定的标记或探针分子。这样的生物素化的分析成分可以利用本领域中已知的技术(例如,biotinylation kit,Pierce Chemicals,Rockford,IL)由生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备,并且固定在链霉亲和素包覆的96孔板(Pierce Chemical)的孔内。在某些实施方式中,可以预先制备具有固定的分析成分的表面并保存。

[0105] 用于这些的分析的其它的合适载体或固相支持物包括任何能够结合标记或探针所属的类的分子的材料。熟知的支持物或载体包括但不限于,玻璃、聚苯乙烯、尼龙、聚丙烯、尼龙、聚乙烯、葡聚糖、淀粉酶、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩、和磁铁矿。

[0106] 为了利用上面提到的方法来进行分析,将非固定的成分加入到其中锚定有第二成分的固相上。当反应完成后,可以在这样的条件下除去未复合的成分(例如,通过洗涤)使得形成的任何复合物将仍固定在固相上。锚定至固相的标记/探针复合物的检测可以以本文概述的许多方法来完成。

[0107] 在某些示例性实施方式中,当其为未锚定的分析成分时,探针可以用本文讨论的并且本领域普通技术人员熟知的可检测标记来直接或间接地进行标记,用于分析的检测和读出的目的。

[0108] 还可以直接检测标记/探针复合物的形成,而无需进一步操作或标记任一成分(标记或探针),例如通过利用荧光能量传递的技术(参见,例如,美国专利第5,631,169号和第4,868,103号)。选择第一“供体”分子上的荧光标签,使得在用适当的波长的入射光激发后,其发出的荧光能量会被第二“受体”分子上的荧光标签吸收,其由于吸收的能量又能够发荧光。可替换地,“供体”蛋白分子可以简单地利用色氨酸残基的天然荧光能量。选择发出不同

波长的光的标记，使得“受体”分子标签可以不同于“供体”。由于标签之间的能量传递的效率与隔开分子的距离有关，因此分子之间的空间关系可以被估计。在其中分子间发生结合的情况下，分析中的“受体”分子标签的荧光发射应该达到最大。FET结合事件可以通过本领域中熟知的标准荧光检测手段(例如，利用荧光仪)来常规地进行测量。

[0109] 在另一实施方式中，通过利用如实时生物分子相互作用分析(BIA)的技术(参见，例如，Sjolander,S.and Urbaniczky,C.,1991,Anal.Chem.63:2338 2345and Szabo et al.,1995,Curr Opin.Struct.Biol.5:699 705)可以实现探针识别标记的能力的确定，而无需标记任一分析成分(探针或标记物)。如此处所使用的，“BIA”或“表面等离子体共振”是一种在无需标记任何反应物(如，BIAcore)的情况下用于实时研究生物特异性相互反应的技术。结合表面的质量变化(结合事件的指示)导致表面附近光的折射率的改变(表面等离子共振(SPR)的光学现象)，产生了可以被用作指示生物分子之间的实时反应的可检测标志。

[0110] 可替换地，在另一实施方式中，类似的诊断和预测分析可以利用作为溶质的标记物和探针在液相中进行。在这样的分析中，复合的标记物和探针可以通过许多标准技术中的任一种，包括但不限于：差速离心、色谱、电泳和免疫沉淀与未复合的成分分离。在差速离心中，标记物/探针复合物可以通过一系列离心步骤与未复合的分析成分分离，这是因为基于它们的不同大小和密度，复合物的不同的沉降平衡(参见，例如，Rivas and Minton (1993)Trends Biochem.Sci.18:284)。标准的色谱技术也可以用来将复合的分子与未复合的分子分开。例如，凝胶过滤色谱基于尺寸，并且通过利用柱形式的适当的凝胶过滤树脂来分离分子，例如，相对大的复合物可以与相对小的未复合的成分分开。类似地，与未复合的成分相比，标记物/探针复合物的相对不同的带电性质可以用来区分复合物和未复合的成分，例如通过利用离子交换色谱树脂。这样的树脂和色谱技术对于本领域中的普通技术人员来说是熟知的(参见，例如，Heegaard(1998)J.Mol.Recognit.11:141;Hage and Tweed (1997)J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.12:499)。凝胶电泳可以用来将复合的分析成分与未结合的成分分开。(参见，例如，Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,1987 1999)。在该技术中，蛋白质或核酸复合物基于例如大小或电荷而分开。为了在电泳过程中保持结合相互作用，在不存在还原剂情况下的非变性凝胶基质材料和条件通常是优选的。用于特定分析和其成分的适当的条件对于本领域中普通技术人员来说将是熟知的。

[0111] 在某些示例性实施方式中，对应于标记物的mRNA的水平可以利用本领域中已知的方法在生物样品中通过原位和/或通过体外的方式来确定。许多表达检测方法利用分离的RNA。对于体外方法，并不针对分离mRNA选择的任何RNA分离技术可以用于从血细胞中纯化RNA(参见，例如，Ausubel et al.ed.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,New York,1987 1999)。此外，大量细胞和/或样品可以容易地利用本领域技术人员熟知的技术来处理，例如，Chomczynski的单步RNA分离方法(1989，美国专利第4,843,155号)。

[0112] 分离的mRNA可以用于杂交或扩增分析，其包括但不限于，Southern或Northern分析、聚合酶链反应分析和探针阵列。在某些示例性实施方式中，用于检测mRNA水平的诊断方法包括使分离的mRNA与核酸分子(探针)接触，其中所述核酸分子(探针)可以杂交于通过待

检测基因编码的mRNA。核酸探针可以是，例如，全长cDNA、或其一部分，如长度为至少7、15、30、50、100、250或500个核苷酸并在严格条件下足以与编码本发明的标记物的mRNA或基因组DNA特异性杂交的寡核苷酸。此处描述了其它用于本发明的诊断分析中的合适的探针。mRNA与探针的杂交表明所述的标记物被表达。

[0113] 在一种方式中，mRNA被固定在固体表面上并与探针接触，例如，通过使分离的mRNA在琼脂糖凝胶上流动(运行)并将mRNA从凝胶转移到例如硝酸纤维素的膜上。在可替换的方式中，一个或多个探针被固定在固体表面上并使mRNA与所述探针接触，例如，在基因芯片阵列中。普通技术人员可以容易地采用已知的mRNA检测方法，用于检测由本发明的标记物编码的mRNA水平。

[0114] 用于在样品中检测对应于本发明的标记物的mRNA水平的可替换方法包括核酸扩增的方法，例如，通过rtPCR(在美国专利第4,683,195和4,683,202号中阐述的实验实施方式)、COLD-PCR(Li et al.(2008)Nat.Med.14:579)、连接酶链反应(Barany,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:189)、自激序列复制(Guatelli et al.,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:1874)、转录扩增系统(Kwoh et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:1173)、Q-β复制酶(Lizardi et al.(1988)Bio/Technology 6:1197)、滚环式复制(美国专利第5,854,033号)或任何其它核酸扩增方法，接着利用本领域技术人员熟知的技术来检测扩增的分子。如果这样的分子以非常低的数量存在，则这些检测策略可特别用于核酸分子的检测。如此处所使用的，扩增引物被定义为一对可以与基因的5'或3'区(分别是正链和负链，或反之亦然)退火并包含中间的短区域的核酸分子。通常，扩增引物的长度为约10至30个核苷酸并侧接长度为约50至200个核苷酸的区域。在适当的条件下并利用适当的试剂，这样的引物允许包括被引物侧接的核苷酸序列的核酸分子的扩增。

[0115] 对于原位方法，在检测前，并不需要使mRNA与样品(如，体液(如血细胞))分离。在这样的方法中，细胞或组织样品利用已知的组织学方法来制备/处理。然后将样品固定在支持物上，通常载玻片上，随后与可以杂交于编码标记物的mRNA的探针接触。

[0116] 作为基于标记物的绝对表达水平进行确定的备选方案，确定可以是基于标记物的标准化表达水平。通过比较标记物的表达与并非标记物的基因，例如构成型表达的管家基因的表达来校正标记物的绝对表达水平而使表达水平规格化。用于规格化的合适的基因包括管家基因如肌动蛋白基因、或上皮细胞特异性基因。该规格化使来自一种来源的患者样品中的表达水平与来自另一来源的患者样品的表达相比较，例如，使来自个体的吞噬血细胞与来自所述个体的非吞噬血细胞相比较。

[0117] 在另一示例性实施方式中，检测对应于标记物的蛋白或多肽。在某些示例性实施方式中，用于检测本发明的多肽的试剂是能够结合至对应于本发明的标记物的多肽的抗体，如带有可检测标签的抗体。抗体可以是多克隆的，或者更优选地，单克隆的。可以使用完整的抗体、或其片段(如Fab或F(ab')$_2$)。术语"标记的"(相对于探针或抗体)旨在包括通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体，以及通过与另一间接标记的试剂的反应性来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括利用荧光标记的二抗来检测一抗以及用生物素末端标记DNA探针，使得其可以用荧光标记的链霉亲和素检测。

[0118] 可以采用各种模式来确定样品是否包含结合至给定抗体的蛋白。这些的模式的实

例包括但不限于，酶免疫测定(EIA)、放射性免疫测定(RIA)、蛋白质印迹分析、酶联免疫吸收剂分析(ELISA)等。普通技术人员可以容易地采用已知的蛋白/抗体检测方法，用于确定细胞(例如，体液细胞，如血细胞)是否表达本发明的标记物。

[0119] 在一种模式中，抗体、或抗体片段可以用于如蛋白质印迹或免疫荧光技术的方法中以检测表达的蛋白。在这样的应用中，通常优选将抗体或蛋白中的任一种固定在固体支持物上。合适的固相支持物或载体包括任何能够结合抗原或抗体的支持物。熟知的支持物或载体包括玻璃、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、葡聚糖、尼龙、淀粉酶、天然和修饰的纤维素、聚丙烯酰胺、辉长岩、磁铁矿等。

[0120] 本领域的普通技术人员将已知的用于结合抗体或抗原的许多其它合适的载体，并且能够采用这样的支持物用于本发明中。例如，从细胞(如，体液细胞如血细胞)分离的蛋白可以在聚丙烯酰胺凝胶电泳上流动并固定到如硝酸纤维素膜的固相支持物上。然后用合适的缓冲液冲洗支持物，接着用可检测标记的抗体处理。然后第二次用缓冲液冲洗固相支持物以除去未结合的抗体。然后可以通过常规方式来检测固相支持物上的结合标签的量。

[0121] 在某些示例性实施方式中，提供了诊断性分析。在生物样品中用于身体状况、与癌症相关的疾病和/或障碍、感染原、和/或其它疾病的存在与否的示例性方法包括从测试受试者中获得生物样品，然后使该生物样品与能够检测与癌症相关的疾病和/或障碍、感染原、和/或其它疾病或病症的一种或多种标记物的化合物或药剂接触，如标记物核酸(如mRNA、基因组DNA)，或由标记物核酸编码的标记物肽(如，多肽或蛋白)或标记物脂质，使得在生物样品中检测标记物核酸或由核酸编码的标记物肽的存在。在一个实施方式中，用于检测标记物mRNA或基因组DNA的药剂是能够与标记物mRNA或基因组DNA杂交的标记物的核酸探针。核酸探针可以是，例如，全长的标记物核酸或其一部分。此处描述了用于本发明的诊断分析的其它合适的探针。

[0122] 用于检测标记物肽的药剂可以是能够结合于标记物肽的抗体，如带有可检测标签的抗体。抗体可以是多克隆的或单克隆的。可以使用完整的抗体、或其片段(如Fab或F(ab')$_2$)。术语“标记的”(相对于探针或抗体)旨在包括通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体，以及通过与另一间接标记的试剂的反应性来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括利用荧光标记的二抗来检测一抗以及用生物素末端标记DNA探针，使得其可以用荧光标记的链霉亲和素检测。

[0123] 如此处所使用的，术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞(如吞噬细胞、非吞噬细胞、2n细胞、>2n细胞等)和生物液体(如，全血、WBC等)，以及在受试者体内存在的组织、细胞(如，吞噬细胞、非吞噬细胞、2n细胞、>2n细胞等)和体液(如，尿、全血、WBC等)。即，本发明的检测方法可以用于体外以及体内检测生物样品中的标记物多肽、蛋白、碳水化合物、脂质、寡糖、mRNA、微小RNA、基因组DNA等。在一种实施方式中，生物样品包含来自测试受试者的蛋白、多肽、脂质和/或寡糖。可替换地，生物样品可以包含来自测试受试者的mRNA分子和/或来自所述测试受试者的基因组mRNA分子。在一种实施方式中，生物样品是通过常规方法从受试者分离的血清样品、唾液样品或活检样品。

[0124] 在另一个实施方式中，该方法进一步包括从对照受试者(如，非吞噬细胞或2n细胞)中获得对照生物样品，使对照样品(如，非吞噬细胞或2n细胞)与能够在生物样品中检测标记物多肽、蛋白脂质、寡糖、mRNA、微小RNA、基因组DNA等的化合物或药剂接触，并将对照

样品中标记物多肽、蛋白脂质、寡糖、mRNA、基因组DNA等的存在与测试样品(如,吞噬细胞或>2n细胞)中标记物多肽、蛋白脂质、寡糖、mRNA、基因组DNA等的存在相比较。可替换地,测试样品(如,吞噬细胞或>2n细胞)中标记物多肽、蛋白脂质、寡糖、mRNA、基因组DNA等的存在可以与数据库中的信息或对导致检测或诊断的图表相比较。

[0125] 本发明还包括用于在生物样品中检测一种或多种与癌症和/或感染原相关的标记物存在的试剂盒。例如,试剂盒可以包括能够检测生物样品中的标记物多肽、蛋白脂质、寡糖、mRNA、微小RNA、基因组DNA等的标记的化合物或试剂;用于确定样品中标记物的量的装置;以及用于将样品中标记物的量与标准物(如,非吞噬细胞或2n细胞)相比较的装置。该化合物或药剂可以包装在合适的容器内。该试剂盒可以进一步包括使用该试剂盒以检测标记物肽或核酸的说明书。

[0126] 在某些示例性实施方式中,提供了预测分析。此处描述的诊断方法可以另外用来识别具有病症或发展与癌症和/或感染原相关的疾病和/或障碍、或与此处描述的一种或多种标记物的上调(或下调)表达相关的本文描述的另一障碍风险的受试者。例如,此处描述的分析,如前面的诊断分析或随后的分析可以用来识别具有或有发展与癌症和/或感染原相关的疾病和/或障碍和/或本文描述的一种或多种其它障碍风险的受试者。

[0127] 此处描述的预测分析可以用来确定受试者是否可以给予药剂(如激动剂、拮抗剂、拟肽、蛋白、肽、核酸、小分子、或其它药物候选物),以治疗与癌症和/或感染原相关的疾病和/或障碍、或与此处描述的一种或多种标记物相关的本文描述的一种或多种其它障碍。例如,这样的方法可以用来确定受试者是否可以用药剂来有效地处理,从而治疗、缓解或减少与癌症相关的一种或多种症状。因此,本发明提供了用于确定受试者是否可以利用用于与癌症和/或感染原相关的疾病和/或障碍、和/或本文描述的一种或多种其它障碍的药剂来有效地治疗的方法。

[0128] 本发明的方法还可以用来检测标记物基因的基因改变,从而确定具有改变的基因的受试者是否有发展与癌症和/或感染原相关的疾病和/或障碍、和/或通过标记物蛋白活性或核酸表达的误调节表征的本文描述的一种或多种其它障碍,如癌症的风险。在某些实施方式中,该方法包括在来自受试者的细胞(如,体液细胞如血细胞)的样品中检测通过影响编码标记物肽的基因和/或标记基因的完整性的改变表征的基因改变的存在与否。例如,这样的基因改变可以通过确定以下中的至少一种的存在来检测:1)来自一种或多种标记物基因的一个或多个核苷酸的缺失;2)一种或多种标记物基因的一个或多个核苷酸增加;3)一种或多种标记物基因的一个或多个核苷酸的替换,4)一种或多种标记物基因的染色体重排;5)一个或多个标记物基因的信使RNA转录水平的改变;6)一种或多种标记物基因的异常修饰,如基因组DNA的甲基化模式;7)一种或多种标记物基因的信使RNA转录的非野生型剪接模式的存在;8)一种或多种标记物蛋白的非野生型水平;9)一种或多种标记物标记物基因的等位丢失;以及10)一种或多种标记物蛋白的不适当的翻译后修饰。如此处所描述的,存在大量本领域已知的可以用于检测一种或多种标记物基因的改变的分析。

[0129] 在某些实施方式中,改变的检测包括将探针/引物用于聚合酶链反应(PCR)(参见,例如,美国专利第4,683,195号、第4,683,202号和第5,854,033号),如实时PCR、COLD-PCR、锚定PCR、回归PCR或RACE PCR,或可替换地,用于连接链反应(LCR)(参见,例如,Landegran et al.(1998)Science 241:1077,Prodromou and Pearl(1992)Protein Eng.5:827;and

Nakazawa et al.(1994)Proc Natl.Acad.Sci.USA 91:360)，后者特别可用于在标记物基因中检测点突变(参见Abravaya et al.(1995)Nucleic Acids Res.23:675)。该方法可以包括以下步骤：从受试者中收集细胞的样品，从细胞的样品中分离核酸(如，基因组的，mRNA或两者)，使核酸样品与一个或多个引物接触，该一个或多个引物可以在标记基因(如果存在)杂交和扩增发生的条件下特异性地与标记物基因杂交，并且检测扩增产物的存在与否，或检测扩增产物的大小并使所述长度与对照样品的长度相比较。可以预期，结合此处描述的用于检测突变的任何技术，PCR和/或LCR可以期望被用作初级扩增步骤。

[0130] 可替换的扩增方法包括：自激序列复制(Guatelli et al.,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874)、转录扩增系统(Kwoh et al.,(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173)、Q-β复制酶(Lizardi et al.(1988)Bio-Technology 6:1197)、或任何其它核酸扩增方法，接着利用本领域技术人员熟知的技术来检测扩增后的分子。如果这样的分子以非常低的存在，则这些检测策略特别可用于检测核酸分子。

[0131] 在可替换的实施方式中，来自样品细胞的一种或多种标记物基因中的突变可以通过限制酶酶切模式的改变来识别。例如，分离样品和对照DNA，可选地扩增，用一种或多种限制性内切酶消化，以及通过凝胶电泳确定并比较片段长度大小。样品与对照DNA之间的片段长度大小的不同表明在样品DNA中的突变。而且，序列特异性核酶的使用(参见，例如，美国专利第5,498,531号)可以通过产生或失去核酶切割位点用来记录特异性突变的存在。

[0132] 在其它实施方式中，此处描述的一种或多种标记物中的基因突变可以通过将样品和对照核酸如DNA或RNA杂交于包含成百上千的寡核苷酸探针的高密度阵列来识别(Cronin et al.(1996)Human Mutation 7:244;Kozal et al.(1996)Nature Medicine 2:753)。例如，如在Cronin,M.T.等人上文中描述的，在包含产光DNA探针的二维阵列中可以识别标记物核酸中的遗传突变。简单地，通过制造序列重叠探针的线性阵列，探针的第一杂交阵列可以被用来扫描通过样品和对照中的长段DNA，以识别序列之间的碱基变化。该步骤允许识别点突变。该步骤之后是通过使用更小的与检测的变异体或突变互补的专门探针阵列而允许特异性突变的表征的第二杂交阵列。每个突变阵列均由平行的探针组构成，一个与野生型基因互补而另一个与突变基因互补。

[0133] 在又一实施方式中，本领域中已知的各种测序反应中的任一种可以被用来对标记基因进行直接测序，并通过比较样品标记基因的序列与相应的野生型(对照)序列来检测突变。测序反应的实例包括基于Maxam和Gilbert((1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:560)或Sanger((1977)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 74:5463)开发的技术的那些。还期待，当进行诊断分析((1995)Biotechniques 19:448)时，包括通过质谱测序(参见，例如，PCT国际公开号WO 94/16101;Cohen et al.(1996)Adv.Chromatogr.36:127-162;and Griffin et al.(1993)Appl.Biochem.Biotechnol.38:147)，可以利用各种自动测序程序中的任一种。

[0134] 用于在标记物基因中检测突变的其它方法包括这样的方法，其中可以使用由切割试剂的保护以检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链体(Myers et al.(1985)Science 230:1242)中的错配碱基。通常，“错配切割”的本领域技术从提供包含(标记的)RNA或DNA的野生型标记序列与由组织样品获得的潜在突变RNA或DNA杂交而形成的异源双链体开始。双链的双链体用切割双链体的单链区域(诸如由于对照与样品链之间的碱基错配而存在的)的药剂处理。例如，RNA/DNA双链体可以用RNA酶处理并且DNA/DNA杂种用S1核酸酶处理以酶促消

化错配的区域。在其它实施方式中，DNA/DNA或RNA/DNA双链体都可以用羟胺或四氧化锇和用吡啶处理以消化错配区域。在消化错配区域后，所得的物质然后在变性聚丙烯酰胺凝胶上根据大小分开以确定突变的位点。参见，例如，Cotton et al.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:4397;Saleeba et al.(1992)Methods Enzymol.217:286。在一个实施方式中，可以标记对照DNA或RNA以用于检测。

[0135] 在又一个实施方式中，错配切割反应采用一种或多种在规定系统中识别双链DNA的错配碱基对的蛋白(所谓的“DNA错配修复”酶)，用于检测和定位在由细胞样品获得的标记物cDNA中的点突变。例如，大肠杆菌的mutY酶切割G/A错配处的A，而来自HeLa细胞的胸腺嘧啶DNA糖基化酶切割G/T错配处的T(Hsu et al.(1994)Carcinogenesis 15:1657)。根据示例性的实施方式，基于标记序列如野生型标记序列的探针杂交于来自测试细胞的cDNA或其它DNA产物。双链体用DNA错配修复酶处理，并且切割产物(如果有的话)可以根据电泳方案等进行检测。参见，例如，美国专利第5,459,039号。

[0136] 在其它实施方式中，电泳迁移率的改变将可以用来识别标记物基因中的突变。例如，单链构型多态性(SSCP)可以用来检测突变与野生型核酸之间的电泳迁移率的差别(Orita et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:2766，还参见Cotton(1993)Mutat.Res.285:125;以及Hayashi(1992)Genet.Anal.Tech.Appl.9:73)。将样品和对照标记物核酸的单链DNA片段变性并使它们复性。单链核酸的二级结构根据序列而变化，电泳迁移率所得的改变使得能够检测甚至单个碱基的改变。DNA片段可以被标记或用标记的探针检测。分析的敏感性可以通过利用RNA(而不是DNA)而提高，其中二级结构对序列的改变是更敏感的。在一个实施方式中，主题方法利用异源双链体分析以基于电泳迁移率的变化来分离双链异源双链体分子。(Keen et al.(1991)Trends Genet.7:5)。

[0137] 在又一个实施方式中，利用变性梯度凝胶电泳(DGGE)对突变或野生型片段在含有梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中的移动进行分析(Myers et al.(1985)Nature 313:495)。当使用DGGE作为分析的方法时，DNA将被修饰以确保它不会被完全变性，例如通过PCR通过加入一个大约40bp的高熔点的富含GC的DNA的GC封条。在另外的实施方式中，使用温度梯度来代替变性梯度以确定对照和样品DNA迁移率的差异(Rosenbaum and Reissner(1987)Biophys.Chem.265:12753)。

[0138] 用于检测点突变的其它技术的实例包括但不限于，选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如，可以制备寡核苷酸引物，其中已知的突变被置于中部，然后在只有当发现完全匹配才允许杂交的条件下与靶DNA杂交(Saiki et al.(1986)Nature 324:163;Saiki et al.(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:6230)。当寡核苷酸连接至杂交膜并用标记的靶DNA杂交时，这样的等位基因特异性寡核苷酸杂交于PCR扩增的靶DNA或许多不同的突变。

[0139] 可替换地，取决于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以与本发明结合使用。用作用于特异性扩增的引物的寡核苷酸可以携带在分子的中央(使得扩增取决于不同的杂交)(Gibbs et al.(1989)Nucl.Acids Res.17:2437)或在一个引物的最3’端感兴趣的突变，其中，在适当的条件下，错配可以防止或减少聚合酶延伸(Prossner(1993)Tibtech 11:238)。此外，可以期望在突变的区域引入新的限制位点以产生基于切割的检测(Gasparini et al.(1992)Mol.Cell Probes 6:1)。可以期待，在某些实施方式中，也可以

利用用于扩增的Taq连接酶进行扩增(Barany(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189)。在这些的情况中,仅当在5'序列的3'末端存在完全匹配时连接才会发生,使得通过寻找扩增的存在与否可以检测在特异性位点已知突变的存在。

[0140] 应当理解,已经描述的本发明的实施方式仅是本发明的某些原则应用的举例说明。在不偏离本发明的真正精神和范围的情况下,基于此处提供的教导本领域技术人员可以进行多种更改。本申请引用的所有文献、专利和公开的专利申请的全部内容以引用方式并入本文用于所有目的。

[0141] 下面的实施例作为本发明的代表来阐述。这些实施例不应解释成限制本发明的范围,当考虑到本发明的披露内容、图和所附的权利要求时,这些和其它等效实施方式将是显而易见的。

[0142] 实施例1

[0143] 用于从非吞噬细胞分离吞噬细胞的代表性方法I和表达谱的分析

[0144] 1.参照图2和图3,用亲和素(抗生物素蛋白)涂敷板。

[0145] 2.向非吞噬细胞(如T细胞)中加入生物素化的抗体加到孔中,在室温下孵育30分钟,冲洗孔。

[0146] 3.加入磁珠。

[0147] 4.加入WBC血液样品。

[0148] 5.在37℃下孵育(30分钟-1小时)。

[0149] 6.在通过吞噬细胞吞噬磁珠并将亲和素-生物素抗体结合至非吞噬细胞后,将板置于磁铁的顶部并洗涤(内化磁珠的吞噬细胞和结合于抗体的非吞噬细胞会留下;所有其它细胞将会洗掉)。

[0150] 7.去除磁铁并收集吞噬细胞。

[0151] 8.从吞噬细胞(例如,结合于磁珠的细胞)和非吞噬细胞(例如,通过抗-非吞噬细胞生物素化的抗体-亲和素结合而附着于孔的底部的细胞)分离RNA,制备cDNA、cRNA并用来区分吞噬细胞和非吞噬细胞的基因谱(例如,全基因阵列和/或癌症基因阵列)。

[0152] 9.从每个细胞样品分离DNA并识别在吞噬细胞中选择性存在(即,在非吞噬细胞中不存在)的肿瘤-DNA标志;比较谱(如,全基因阵列、在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的DNA突变和/或SNP)。

[0153] 10.从每个细胞样品分离蛋白,利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如,前列腺癌中的PSA和PSMA;结肠癌中的CEA;以及卵巢癌中的CA125),并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱(分布)。可替换地,使用质谱来识别蛋白。

[0154] 11.从每个细胞样品中分离脂质并比较数量和质量,如利用HPLC。

[0155] 实施例2

[0156] 用于从非吞噬细胞中分离吞噬细胞的代表性方法II和表达谱的分析

[0157] 1.参照图2和图3,在血液样品中裂解RBC。

[0158] 2.将WBC细胞旋涂(cytospin)到载玻片上。

[0159] 3.将细胞固定在丙酮/甲醇中(-20℃5分钟)。

[0160] 4.用苏木精和曙红染色剂以及抗T细胞抗体染色。

[0161] 5.利用激光俘获显微镜(LCM)来分离T细胞(非吞噬的)和巨噬细胞(吞噬的)。

[0162] 6.从吞噬细胞和非吞噬细胞中分离RNA，制备cDNA、cRNA并用来区分吞噬细胞和非吞噬细胞的基因谱(如，全基因阵列和/或癌症基因阵列)。

[0163] 7.从每个细胞样品中分离DNA，运行DNA阵列，并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱(分布)(如，全基因阵列、DNA突变和/或SNP)。

[0164] 8.从每个细胞样品中分离蛋白，利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如，前列腺癌中的PSA和PSMA；结肠癌中的CEA；以及卵巢癌中的CA125)，并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱(分布)。可替换地，使用质谱来识别蛋白。

[0165] 9.从每个细胞样品中分离脂质并比较数量和质量，如利用HPLC。

[0166] 实施例3

[0167] 用于从非吞噬细胞中分离吞噬细胞的代表性方法III和表达谱的分析

[0168] 1.参照图2和图3，从血液样品中裂解红细胞。

[0169] 2.利用磁性抗体结合的珠以从全血中分离非吞噬细胞(如T细胞)和吞噬细胞(如，嗜中性粒细胞和/或巨噬细胞和/或单核细胞)。

[0170] 3.从每个细胞样品中分离RNA，制备cDNA、cRNA并用于区分吞噬细胞和非吞噬细胞的基因谱(如，癌基因阵列)。

[0171] 4.从每个细胞样品中分离DNA，运行DNA阵列，并比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。

[0172] 5.从每个细胞样品中分离蛋白，利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如，前列腺癌中的PSA和PSMA；结肠癌中的CEA；以及卵巢癌中的CA125)，并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。可替换地，使用质谱来识别蛋白。

[0173] 6.从每个细胞样品中分离脂质并比较数量和质量，如利用HPLC。

[0174] 实施例4

[0175] 用于从非吞噬细胞中分离吞噬细胞的代表性方法IV和表达谱的分析

[0176] 1.参照图2和图3，用对特定细胞亚群(例如，嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、T细胞等)特异性的荧光抗体对WBC进行染色。

[0177] 2.对细胞进行分类(例如，通过FACS)。

[0178] 3.从每个细胞样品中分离RNA，制备cDNA、cRNA并用于区分吞噬细胞和非吞噬细胞的基因谱(如，癌基因阵列)。

[0179] 4.从每个细胞样品中分离DNA，运行DNA阵列，并比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。

[0180] 5.从每个细胞样品中分离蛋白，利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如，前列腺癌中的PSA和PSMA；结肠癌中的CEA；以及卵巢癌中的CA125)，并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。可替换地，使用质谱来识别蛋白。

[0181] 6.从每个细胞样品中分离脂质并比较数量和质量，如利用HPLC。

[0182] 实施例5

[0183] 用于从非吞噬细胞中分离吞噬细胞的代表性方法V和表达谱的分析

[0184] 1.参照图5和图6，用对每个细胞亚群(例如，嗜中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞、T细胞等)特异的荧光抗体对WBC进行染色，然后用DNA染料(例如，碘化丙啶)进行染色。

[0185] 2.将细胞(FACS)分为T细胞、嗜中性粒细胞(2n)、嗜中性粒细胞(>2n)、巨噬细胞

(2n)、巨噬细胞(>2n)、单核细胞(2n)、以及单核细胞(>2n)。

[0186] 3.从T细胞、嗜中性粒细胞(>2n)、巨噬细胞(>2n)、和单核细胞(>2n)中分离RNA。然后制备cDNA、cRNA并用于区分吞噬细胞和非吞噬细胞的基因谱(例如,癌基因阵列)。

[0187] 4.从T细胞、嗜中性粒细胞(>2n)、巨噬细胞(>2n)、和单核细胞(>2n)中分离DNA。运行DNA阵列,并比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。

[0188] 5.从T细胞、嗜中性粒细胞(>2n)、巨噬细胞(>2n)、和单核细胞(>2n)中分离蛋白。利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如,前列腺癌中的PSA和PSMA;结肠癌中的CEA;以及卵巢癌中的CA125),并且比较在吞噬细胞和非吞噬细胞中获得的图谱。可替换地,使用质谱来识别蛋白。

[0189] 6.从T细胞、嗜中性粒细胞(>2n)、巨噬细胞(>2n)、和单核细胞(>2n)中分离脂质。比较脂质的数量和质量,如利用HPLC。

[0190] 实施例6

[0191] 用于分离吞噬细胞的代表方法IV和表达谱的分析

[0192] 1.参照图5和图6,用对一种或多种吞噬细胞(如,嗜中性粒细胞、巨噬细胞、或单核细胞)特异的荧光抗体对WBC进行染色然后用DNA结合染料(如碘化丙啶)进行染色。

[0193] 2.将细胞(FACS)分成2n和>2n吞噬细胞。

[0194] 3.从2n和>2n吞噬细胞中的每一个中分离RNA。制备cDNA、cRNA并用于区分2n吞噬细胞和>2n吞噬细胞的基因谱(如癌基因阵列)。

[0195] 4.从2n和>2n吞噬细胞中的每一个中分离DNA。运行DNA阵列,并比较由2n吞噬细胞和>2n吞噬细胞获得的图谱。

[0196] 5.从2n和>2n吞噬细胞中的每一个中分离蛋白。利用对被人肿瘤过度表达的蛋白已知的抗体进行蛋白质印迹(如,前列腺癌中的PSA和PSMA;结肠癌中的CEA;以及卵巢癌中的CA125),并且比较由吞噬细胞和非吞噬细胞获得的图谱。

[0197] 6.从2n和>2n吞噬细胞中的每一个中分离脂质。比较脂质的数量和质量,如利用HPLC。

[0198] 实施例7

[0199] 检测由肿瘤携带小鼠获得的吞噬细胞中的肿瘤特异性基因标志

[0200] 根据本发明的实施方式,提供了区分血液或其它体液中“正常非特异性噪声”和“肿瘤特异性”和/或“疾病特异性”标志的方法。来自肿瘤携带小鼠的血液单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞的基因表达谱与来自于同一供体鼠的非吞噬T细胞的进行比较以识别吞噬细胞中的肿瘤特异性标志,这些标志在来自同一肿瘤携带鼠和来自非肿瘤携带鼠的非吞噬细胞中不表达或显著不同地表达。

[0201] 人前列腺LNCaP癌细胞

[0202] 无胸腺的裸小鼠(n=5)用人前列腺LNCaP癌细胞皮下注射(s.c.)。27天后(肿瘤大小=约0.4cm),小鼠通过心脏穿刺放血(约1毫升/小鼠)入含EDTA的试管中,然后离心。分离血沉棕黄层并洗涤,分别利用抗小鼠嗜中性粒细胞的、巨噬细胞的、和T细胞免疫磁性DynaBeads来分离嗜中性粒细胞、巨噬细胞和T细胞。从每个细胞样品中分离RNA(Triazol®)。RNA质量如图3所示来确定。RNA产率示于图20中。制备cDNA和生物素化cRNA

(cRNA-B)。最后,将cRNA-B样品与癌基因人微阵列(OligoGEArray® Human Cancer PathwayFinder Microarry-OHS-033-SuperArray Bioscience)孵育。杂交后,洗涤膜并用亲和素碱性磷酸酶染色,并利用化学发光检测基因(X射线膜)。

[0203] 人LS174T结肠腺癌肿瘤,

[0204] LLC1癌细胞,B16F10小鼠黑色素瘤细胞

[0205] 利用从皮下注射有人LS174T结肠腺癌肿瘤(肿瘤大小=约0.3cm)的无胸腺裸小鼠(n=5),皮下注射有Lewis肺小鼠LLC1癌细胞(肿瘤大小=约0.6cm)的C57B1小鼠(n=5),以及22天前静脉内注射有10^6B16F10小鼠黑色素瘤细胞(当肿瘤细胞是小鼠来源时,cRNA-B样品与OligoGEArray® Mouse Cancer PathwayFinder Microarray-OMM-033-SuperArray Bioscience)的C57B1小鼠(n=5)分离的细胞进行了类似的实验。也从在培养基中指数生长的LS174T、LLC1、B16F10和LNCaP细胞中以及从非肿瘤携带的C57B1和裸小鼠中分离的嗜中性粒细胞、巨噬细胞和T细胞中分离RNA,并且确定它们的癌症相关基因谱。

[0206] 根据由这些实验获得的和图9-图17中所示的数据,从注射有人前列腺或结肠肿瘤细胞的小鼠和从携带小鼠肺癌或黑色素癌的小鼠获得的嗜中性粒细胞和巨噬细胞具有各种癌症相关基因标志,这些标志也在它们对应的肿瘤细胞中发现。这些癌症相关基因没有被(i)从肿瘤携带小鼠分离的非吞噬性T细胞;和(ii)由非肿瘤携带小鼠获得的吞噬嗜中性粒细胞和巨噬细胞表达或最低限度地表达。

[0207] 例如,从携带LNCaP人前列腺癌细胞的裸小鼠的血液分离的嗜中性粒细胞表达多种人肿瘤基因标志(Human Cancer PathwayFinder Microarray),这些标志也在LNCaP细胞中表达(比较图9的A和B中的阵列的图谱(分布))。这些基因在由肿瘤携带小鼠获得的T细胞或从正常小鼠分离的嗜中性粒细胞中不表达或最低限度地表达(参见图9的C和D中的图谱(分布))。类似地,从携带LLC1小鼠肺癌细胞的小鼠的血液分离的嗜中性粒细胞表达多种小鼠肿瘤基因标志(Mouse Cancer PathwayFinder Microarray),这些标志在LLC1细胞中表达(比较图13的A和B中阵列的图谱(分布))。

[0208] 这些基因在由肿瘤携带小鼠获得的T细胞或从正常小鼠分离的嗜中性粒细胞中不表达或最低限度地表达(参见图13的C和D中所示的图谱(分布))。最后,扫描这些阵列,每个基因的密度利用由该公司提供的软件定量,并且那些被吞噬细胞选择性过渡表达的基因如图19和图20所示进行识别。图21和图22列出了通过肿瘤携带小鼠的吞噬性WBC获取并差异性呈现的基因标志。如图21所示,检测到许多致癌基因(用红色示出的基因,如ERBB2和Jun)并且它们经常同时在巨噬细胞和嗜中性粒细胞中表达。

[0209] C57B1小鼠(n=5)被皮下注射1E6Lewis肺小鼠癌细胞(LLC1)。20天后,小鼠被麻醉并通过心脏穿刺放血(约1毫升/小鼠)到含EDTA的试管中。在室温下以2,000rpm离心5分钟后,将血沉棕黄层被转移至试管并用PBS洗涤。

[0210] 抗小鼠巨噬细胞/单核细胞兔IgG抗体(来自AbD Serotec,Raleigh,NC的单核细胞/巨噬细胞标记物-F4/80-IgG2b)与抗兔IgG抗体磁珠(来自INVITROGEN™,Carlsbad,CA的DYNABEAD®绵羊抗兔IgG)孵育(室温30分钟)。然后在PBS中洗涤抗巨噬细胞/单核细胞珠并保存在冰上。

[0211] 抗小鼠嗜中性粒细胞兔IgG(嗜中性粒细胞标记物NIMP-R14-IgG2a-Santa Cruz

Biotechnology,Santa Cruz,CA)与抗兔IgG抗体磁珠(DYNABEAD®绵羊抗兔IgG-INVITROGEN™)孵育(室温30分钟),在PBS中洗涤,并保存在冰上。

[0212] DYNABEAD®小鼠Pan T(Thy1.2)珠(INVITROGEN™)也在PBS中洗涤并保存在冰上。

[0213] 利用抗巨噬细胞/单核细胞珠从上面制备的WBC悬液中分离小鼠血巨噬细胞和单核细胞。大体上,将珠加入到WBC样品中并在它们孵育(4℃30分钟)后,利用磁铁分离巨噬细胞结合的珠并用PBS洗涤3次并保存在冰上。

[0214] 然后从剩下的WBC中分离小鼠T细胞。简单地说,将抗小鼠T细胞珠加入到WBC悬液中,孵育样本(4℃30分钟),利用磁铁分离T细胞结合的珠,用PBS洗涤,并保存在冰上。

[0215] 最后,从剩下的WBC样品中分离小鼠嗜中性粒细胞。将抗小鼠嗜中性粒细胞磁珠加入到细胞中,并孵育样品(4℃30分钟)。利用磁铁分离嗜中性粒细胞结合的珠,用PBS洗涤,并保存在冰上。

[0216] 然后从每个样品中分离RNA(利用TRIZOL®,INVITROGEN™,Carlsbad,CA)。如图7所示,确定RNA质量。RNA产率示于图8中。接着,制备cDNA(生物素化的)并与癌基因人微阵列(OligoGEARRAY®Human Cancer PathwayFinder Microarry OMM-033,SuperArray Bioscience,Frederick,MD)孵育(60℃过夜)。杂交后,洗涤膜并用亲和素碱性磷酸酶染色,然后利用化学发光(X射线胶片)来检测基因。

[0217] 人LS175T结肠腺癌肿瘤,LLC1癌和B16F10小鼠黑色素瘤细胞

[0218] 利用从皮下注射有人LS174T结肠腺癌肿瘤(肿瘤大小=约0.3cm)的无胸腺裸小鼠(n=5),皮下注射有Lewis肺小鼠LLC1癌细胞(肿瘤大小=约0.6cm)的C57/B1小鼠(n=5),以及22天前静脉内注射有10^6B16F10小鼠黑色素瘤细胞(当肿瘤细胞是小鼠来源时,cRNA-B样品与OligoGEARRAY®Mouse Cancer PathwayFinder Microarray-OMM-033-SuperArray Bioscience(当肿瘤是人来源时,使用OligoGEArray®Human Cancer PathwayFinder Microarry-OHS-033)的C57B1小鼠(n=5)分离的细胞进行了类似的实验。也从在培养基中指数生长的LS174T、LLC1、B16F10和LNCaP细胞中以及从非肿瘤携带的C57B1和裸小鼠中分离的嗜中性粒细胞、巨噬细胞和T细胞中分离RNA,并且确定它们的癌症相关基因谱。

[0219] 根据由这些实验获得的和图9、图10、图11、图12、图13、图14、图15、图16中所示的数据,嗜中性粒细胞和巨噬细胞(从注射有人前列腺或结肠肿瘤细胞的小鼠或携带小鼠肺癌或黑色素瘤的小鼠获得的)具有多种癌症相关基因标志,这些标志还在它们对应的肿瘤细胞中发现(图21)。这些癌症相关基因没有被(i)从肿瘤携带小鼠分离的非吞噬性T细胞;和(ii)由非肿瘤携带小鼠获得的吞噬嗜中性粒细胞和巨噬细胞表达或最低限度地表达。

[0220] 例如,从携带LNCaP人前列腺癌细胞的裸小鼠的血液中分离的嗜中性粒细胞表达也在LNCaP细胞中表达的7种人肿瘤基因标志(Human Cancer PathwayFinder Microarry)(比较图9的A和B中阵列的图谱(分布))。这些基因在由肿瘤携带小鼠获得的T细胞或从正常小鼠分离的嗜中性粒细胞中不表达或最低限度地表达(参见图9的C和D中的图谱(分布))。最后,扫描这些阵列,每个基因的密度利用由该公司提供的软件定量,并且那些被吞噬细胞选择性过表达的基因如图19和图20所示进行识别。图21和图22列出了通过肿瘤携带小鼠的

吞噬性WBC获取并差异性呈现的基因标志。如图21所示，检测到许多致癌基因(例如ERBB2和Jun)并且它们经常同时在巨噬细胞和嗜中性粒细胞中表达(通过以绿色突出的基因示出)。

[0221] 实施例8

[0222] 检测从癌症患者获得的吞噬细胞中的肿瘤特异基因标志

[0223] 根据本发明的某些实施方式，将来自癌症患者的血液单核细胞/巨噬细胞和嗜中性粒细胞的基因表达谱与来自同一供体个体的非吞噬T细胞的表达谱进行比较，以识别吞噬细胞内的肿瘤特异性标志，这些标志在非吞噬细胞中不表达或显著不同地表达。

[0224] 具有头颈肿瘤的患者

[0225] 从已知患有颈鳞状细胞癌并计划手术的患者获得10毫升静脉血(到含有EDTA的试管)。在室温下以2,000rpm离心5分钟后，将血沉棕黄层转移到试管中并用PBS洗涤。

[0226] 采用T细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞/单核细胞-兔抗人免疫磁性DynaBeads(来自INVITROGEN™,Carlsbad,CA)来分离细胞。大体上，将珠依次加入到WBC样品中并在单独的4℃、30分钟孵育后，利用磁体来分离T细胞、嗜中性粒细胞、和巨噬细胞/单核细胞结合的珠并用PBS洗涤3次。

[0227] 然后从每个样品中分离RNA(利用TRIZOL®,INVITROGEN™,Carlsbad,CA)。确定RNA数量和质量并制备cDNA和生物素化cRNA(cRNA-B)。最后，将cRNA-B样品与癌基因人微阵列(OligoGEArray®Human Cancer PathwayFinder Microarry-OHS-033-SuperArray Bioscience,Frederick,MD)一起孵育(60℃过夜)。杂交后，洗涤膜并用亲和素碱性磷酸酶染色，然后利用化学发光(X射线胶片)检测基因。

[0228] 根据由这些实验获得的数据，嗜中性粒细胞和巨噬细胞(从头颈癌患者获得的)具有多种癌症相关基因标志，这些标志也在它们对应的肿瘤细胞中发现。这些癌症相关基因没有被非吞噬T细胞表达或最低限度地表达。

[0229] 例如，从一个这样的患者的血液分离的嗜中性粒细胞表达4个人肿瘤基因标志(Human Cancer PathwayFinder Microarry)，这些标志也在由同一患者获得的肿瘤活检中表达(比较图17的B和C中阵列的图谱(分布))。这些基因在正常皮肤活检和从相同血液样品分离的T细胞中不表达或最低限度地表达(分别参见图17的A和D中的图谱(分布))。最后，扫描阵列，利用由该公司提供的软件来定量每一基因的密度，并识别被吞噬细胞选择性过度表达(>2倍)的以下基因：E26病毒致癌基因同系物(ETS2)、HIV-1Tat相互作用蛋白(HTAT1P2)、IL8(嗜中性粒细胞激活和趋化)、Jun致癌基因(JUN)、和基质金属蛋白酶9(MMP9)。

[0230] 卵巢癌患者

[0231] 利用从患有卵巢癌的患者分离的细胞进行类似的实验。根据由这些实验获得的数据，嗜中性粒细胞和巨噬细胞(从患病的妇女获得的)表达许多癌症相关基因，这些基因没有被非吞噬T细胞表达或最低限度地表达。

[0232] 例如，从卵巢癌患者的血液分离的巨噬细胞表达23个人肿瘤基因标志(Human Cancer PathwayFinder Microarry)，这些标志在从相同的血液样品分离的T细胞中不表达或最低限度地表达(比较图18的A和B中的图谱(分布))。最后，扫描阵列，利用由该公司提供的软件定量每一基因的密度，并确定每种细胞类型中每种癌症相关基因的密度。23个在巨

噬细胞中不同上调/过度表达的癌症相关基因的列表以及巨噬细胞与T细胞强度比均示于图22中。应当注意，检测到总共5个致癌基因(在图21中用红色示出)。

[0233] 实施例9

[0234] 检测从携带人前列腺LNCaP肿瘤和人结肠LS174T肿瘤的小鼠获得的巨噬细胞中的肿瘤特异性蛋白标志

[0235] 使用蛋白纯化试剂盒(Norgen,Incorporated,Product#23500)来从小鼠WBC、T细胞、和巨噬细胞中分离和纯化蛋白。该分析非常简单快速(大约30分钟)并且具有高质量和优异的产率(每4毫升血液117.6±10.60μg,n＝5)的分离的蛋白可以用于许多下游的应用，如图23所示的SDS-PAGE分析和蛋白质印迹。

[0236] 从携带LNCaP和LS174T肿瘤的小鼠获得的吞噬(单核细胞/巨噬细胞)和非吞噬(T-淋巴细胞)细胞中分离蛋白样品，其被选择用于这些研究，这是由于前者的细胞系表达PSA(Denmeade et al.(2001)Prostate 48:1;Lin et al.(2001)J.Urol.166:1943)而后者呈现出肿瘤特异性糖蛋白(TAG-72)，一种高分子量粘蛋白(Colcher et al.(1981)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:3199);Colcher et al.(1984)Cancer Res.44:5744;Kassis et al.(1996)J.Nucl.Med.37:343。蛋白质印迹分析采用16μg纯化的蛋白样品进行。大体上，每个样品与2体积的SDS加载缓冲液混合并在10％SDS-PAGE上与未染色的精确度加蛋白标准(Biorad)一起在Tris-甘氨酸-SDS缓冲液(pH 8.4)中以200伏运行。利用Mini Trans-Blot(Biorad)装置将蛋白转移至硝酸纤维素膜(在40℃下过夜)，并且转移含有25mM Tris、pH 8.4、192mM的甘氨酸，和20％甲醇的缓冲液。膜用5％脱脂奶粉封闭(在室温(RT)下60分钟)，然后用B72.3，一种小鼠抗人TAG-72的单克隆抗体，或ER-PR8，一种小鼠抗人PSA的单克隆抗体孵育(1小时，室温)。洗涤杂交物(blots)然后与Immun-Star山羊抗小鼠-HRP结合物(Biorad)，对小鼠IgG特异的二抗一起孵育，并通过用鲁米诺和过氧化物缓冲液(Biorad)的1:1混合物孵育(5分钟，RT)显影，接着进行放射自显影。

[0237] 数据清晰地表明来自LNCaP肿瘤携带小鼠的吞噬细胞对于PSA是阳性的，而这种蛋白在来自同一动物的非吞噬T细胞中不能检测到，如图24所示。类似地，TAG-72通过由LS174T肿瘤携带小鼠获得的单核细胞/巨噬细胞来表达并在来自同一动物的T细胞中完全不存在。这些发现表明通过吞噬细胞“获取”和表达肿瘤特异性蛋白标志。

[0238] 虽然这些数据是对患有癌症的动物和由小鼠的血液获得的吞噬和非吞噬细胞是特异性的，但是描述的方法在人和用从其它体液获得的吞噬和非吞噬细胞诊断和/或检测一种或多种其它障碍和/或疾病中也是有用的。

[0239] 实施例10

[0240] 图谱实验

[0241] 血液吞噬细胞的分离

[0242] 从患者中获得血液样品。将血(约5毫升)转移至含有50微升0.5M EDTA(终EDTA浓度＝约4.8mM)的50mL试管中。轻轻旋转试管并加入25mL RBC裂解缓冲液(Norgen，Incorporated)。再次轻轻旋转试管，在室温下孵育直到溶液的颜色变为亮红色(3-5分钟)，并以2,000rpm离心3分钟。在小心吸出上清后，用40mL没有Ca/Mg的0.1M PBS(含有2％FBS，2mM EDTA，和20mM葡萄糖)洗涤WBC，然后将细胞(10^6/mL)与细胞染色溶液一起孵育(30分钟，4℃，在暗处)，所述染色溶液包含(i)DNA，活细胞渗透染色剂Hoechst 33342(4μg/mL;Em

＝483nm)，(ii)抗人单核细胞/巨噬细胞单克隆抗体(AlexaFluor®647-结合物；Em＝668nm)，该抗体识别通过循环单核细胞/巨噬细胞表达的人F4/80抗原，和(iii)抗人嗜中性粒细胞单克隆抗体(RPE-结合物；Em＝578nm)，该抗体识别人循环嗜中性粒细胞。然后洗涤细胞并分选(BD FACSAria)成嗜中性粒细胞($N_{n=2}$)、嗜中性粒细胞($N_{n>2}$)、单细胞/巨噬细胞($M/M_{n=2}$)、和巨噬细胞($M/M_{n>2}$)。

[0243] 基因谱

[0244] 制备人全基因组基因谱。对于从人肿瘤细胞或嗜中性粒细胞($N_{n=2}$，$N_{n>2}$)和单核细胞/巨噬细胞($M/M_{n=2}$，$M/M_{n>2}$)获得的RNA样品，将使用通过Affymetrix，Incorporated的GeneChip® Human Genome U133Plus 2.0阵列。该阵列分析超过47,000个转录和变异体的表达水平，包括38,500个很好表征的人类基因。通常，提取的RNA将使用上述阵列来确定人基因的表达谱。为了确保阵列的重复性，每个样品将一式三份进行绘图，并且重复实验一次。如下面描述的，微阵列数据将被过滤以用于癌症诱导相关的基因并利用定量实时、逆转录酶，聚合酶链反应(RT-PCR)进行证实。

[0245] 癌症诱导相关基因的上调/下调

[0246] 利用Triazol(Invitrogen，Incorporated)来分离RNA并利用设置在试剂盒中的小试管(cartridges)进行纯化。RNA质量和数量将利用Bioanalyzer 2100(Agilent Technologies，Incorporated，Palo Alto，CA)和Degradometer软件版本1.41(网址：dnaarray.org)来评价。这些实验结果将有助于辨别由于肿瘤存在的结果而扰乱的分子通路。

[0247] 微阵列实验的分析

[0248] 产生的大尺度/高通量分子表达数据的分析将强烈依赖于以下能力：(i)识别具有DNA含量>2n的吞噬细胞中差异表达的基因，(ii)注释识别的基因，和(iii)将注释的基因分配给那些被特异性肿瘤表达的注释基因。可以例如利用dChip软件包来进行微阵列数据的统计学分析，所述软件包可以在它的“分析/比较样本(Analysis/Compare Samples)”菜单中容纳这种类型的基因列表构造。当采用Affymetrix GeneChips时，将采用一个或多个基因芯片和相关的方法以确认原初的微阵列数据的量(Gautier et al.(2004) Bioinformatics 20:307)。此外，还将采用各种背景校正和标准化步骤来达到用于探针组的标准化和归纳化的最佳方案(来产生表达价值)(Huber et al.(2002)Bioinformatics 18(Suppl.1):S96；Wu et al.(2004)Journal of the American Statistical Association 99:909；Seo and Hoffman(2006)BioMed Central Bioinformatics 7:395)。在2步过滤步骤中，我们将比较$P_{n=2}$与$P_{n>2}$的基因谱并构建表达的基因的列表，然后将这些基因与对于每个肿瘤细胞系识别的肿瘤特异基因相比较-如图5所示在过滤$P_{n=2}$的基因谱后。例如，(i)从乳腺癌患者获得血液；(ii)分离嗜中性粒细胞(n>2和n＝2)并且以一式三份确定它们的基因谱；(iii)计算每组的每一识别基因的平均值(来自3个样品)和其各自的标准误差(SE)($N_{n>2}$和$N_{n=2}$)；(iv)然后比较两组的基因谱并根据Welch改进的2样本t试验，基于绝对值≥2倍对数变化($N_{n>2}/N_{n=2}$)来识别表达基因的列表(L-1)；(v)比较$N_{n=2}$和乳腺癌(由肿瘤和正常乳腺组织活检获得)的基因表达谱并识别表达基因的列表(L-2)；以及(vi)通过比较L-1和L-2中的基因(“分析/比较样本/联合比较”，dChip)并过滤共有的基因来识别由$N_{n>2}$

获得/表达的乳腺癌特异性基因标志

[0249] 蛋白谱

[0250] 使来自每种细胞的50-100微克的总蛋白变性并且在60℃下用tris-(2-羧乙基)膦胰蛋白酶(1mM)和0.02％十二烷基磺酸钠还原1小时。随后封闭半胱氨酸，并且在37℃下用胰蛋白酶消化总蛋白12-16小时。所得的肽(用标签113-119和121)iTRAQ标记1小时(4丛或8丛，取决于待比较的细胞类型的数量)。标记后，将分开标记的样品合并并注射到装备有强阳离子交换柱(Applied Biosystems 4.6×100多孔的)的Agilent 1200系列HPLC系统中。然后将96个收集的部分(流分)汇聚成14个部分，并且在反相条件下(LC Packings 15cm×75μm分析柱)将每个部分注射到LC Packings Ultimate HPLC系统中用于第二轮分级(分离)。利用LC Packings Probot将反相部分直接点样到靶板上并且用质谱(Applied Biosystems 4800Plus Proteomics Analyzer)进行分析。数据获取后，利用ProtienPiot软件包(Applied Biosystems MDS Sciex)处理光谱，并且利用ProteinPilot™软件来识别每个细胞类型中的单独的蛋白和它们的相对表达水平(癌症相关蛋白质组标志的分析和识别与图5概述的用于基因组标志的类似)。

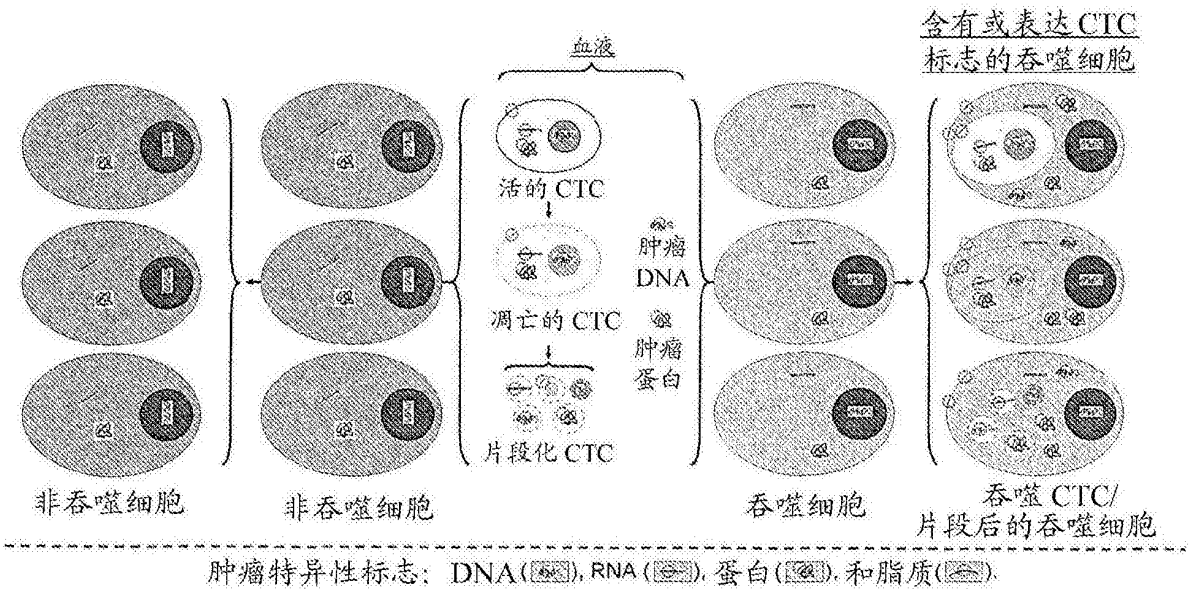

血液
含有或表达CTC
标志的吞噬细胞
活的 CTC
凋亡的 CTC
片段化 CTC
肿瘤
DNA
肿瘤
蛋白
非吞噬细胞
非吞噬细胞
吞噬细胞
吞噬 CTC/
片段后的吞噬细胞
肿瘤特异性标志：DNA(), RNA (), 蛋白(), 和脂质()

图1

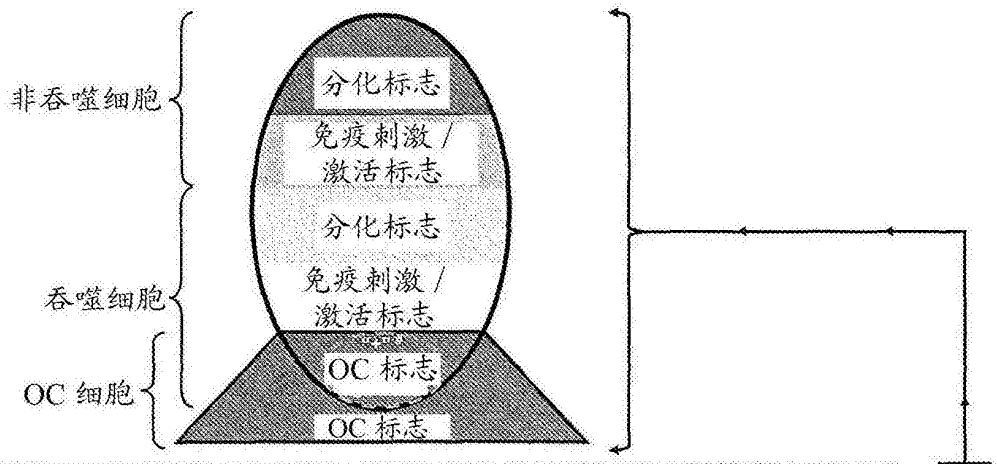


表 1. 在患有卵巢癌的患者的吞噬细胞中癌症标志的表达

	患者基因型特异性标志	分化标志			免疫刺激 / 激活标志*		OC 特异性标志
		P†	NP‡	正常卵巢	P†	NP‡	
P†	+	+	–	–	+	–	
NP‡	+	–	+	–	–	+	–
L_1††	0	+	+	–	+	+	+
OC 细胞	+	–	–	+	–	–	+
正常卵巢	+	–	–	+	–	–	–
L_2††	0	–	–	0	–	–	+

* 不是由于吞噬卵巢 CTC 和 / 或它的其它片段而表达
# 由于吞噬卵巢 CTC 和 / 或它的其它片段而表达
† 吞噬细胞（例如，巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞）
‡ 非吞噬细胞（例如，T 细胞、B 细胞）
†† （例如，使用 dChip 软件）识别的标志的列表

图2

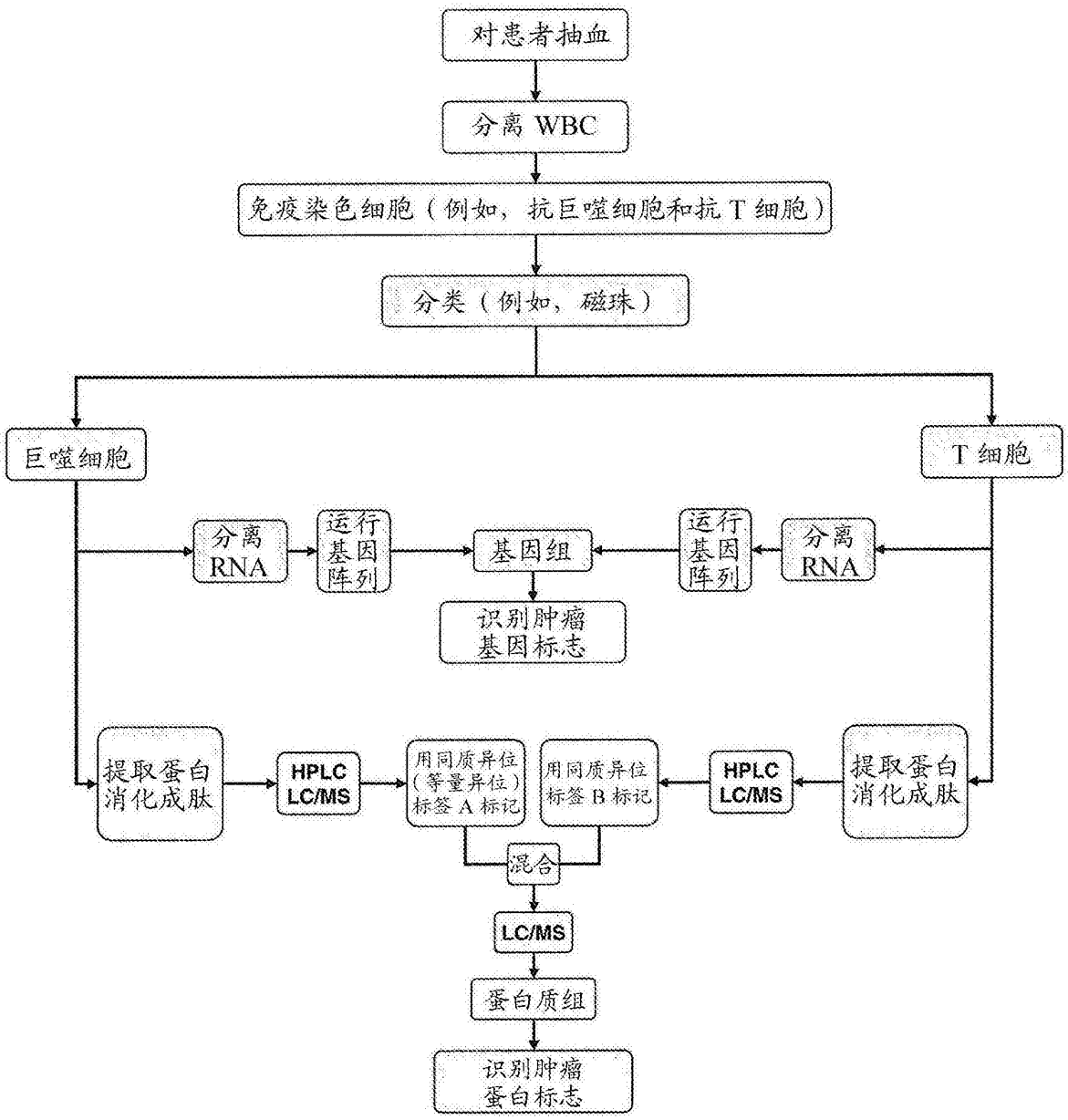

对患者抽血
分离 WBC
免疫染色细胞（例如，抗巨噬细胞和抗 T 细胞）
分类（例如，磁珠）
巨噬细胞
T 细胞
分离 RNA
运行基因阵列
基因组
运行基因阵列
分离 RNA
识别肿瘤基因标志
提取蛋白消化成肽
HPLC LC/MS
用同质异位（等量异位）标签 A 标记
用同质异位标签 B 标记
HPLC LC/MS
提取蛋白消化成肽
混合
LC/MS
蛋白质组
识别肿瘤蛋白标志

图3

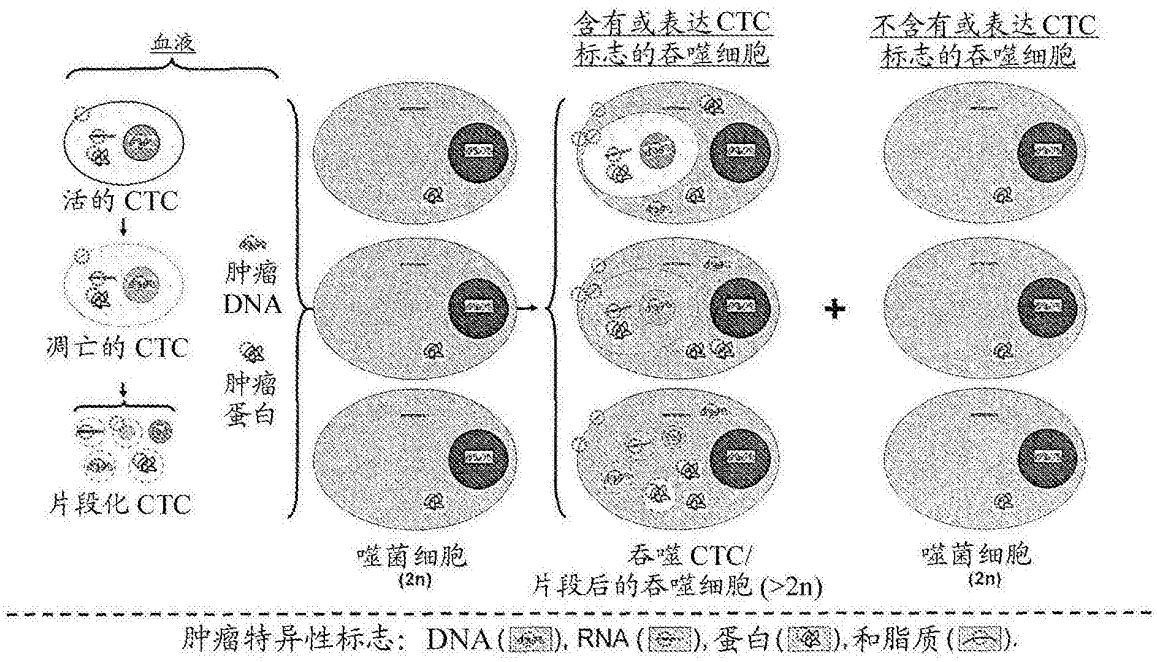

血液
活的 CTC
凋亡的 CTC
片段化 CTC
肿瘤 DNA
肿瘤蛋白
含有或表达CTC标志的吞噬细胞
不含有或表达CTC标志的吞噬细胞
噬菌细胞 (2n)
吞噬 CTC/片段后的吞噬细胞 (>2n)
噬菌细胞 (2n)
肿瘤特异性标志：DNA(), RNA (), 蛋白(), 和脂质 ().

图4

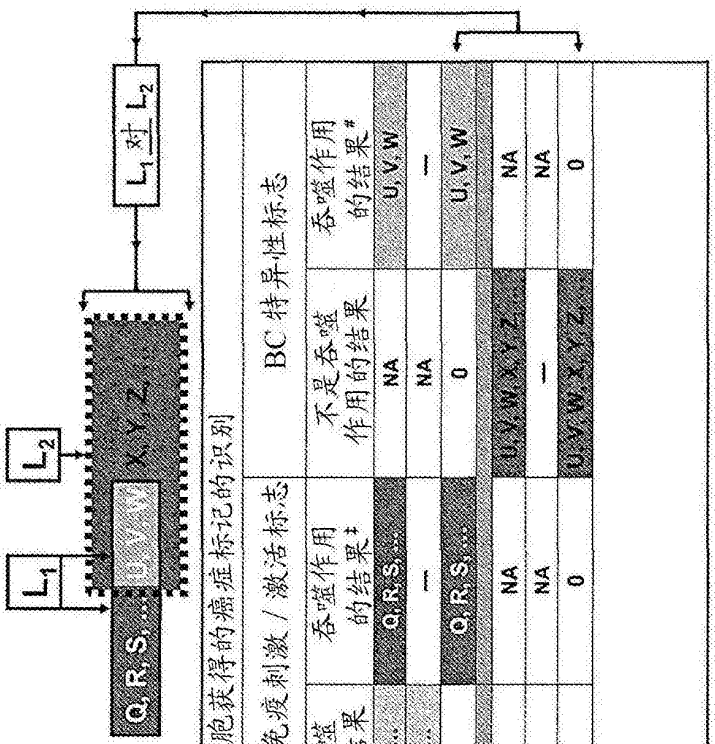


表 2. 由 BC 携带小鼠的吞噬细胞获得的癌症标记的识别

细胞		DNA 含量	小鼠正常细胞基因型标志	分化标志		巨噬细胞免疫刺激 / 激活标志		BC 特异性标志	
				巨噬细胞	正常乳腺	不是吞噬作用的结果	吞噬作用的结果‡	不是吞噬作用的结果	吞噬作用的结果#
巨噬细胞		>2n	A,B,C,...	E,F,G,...	NA**	M,N,O,...	Q,R,S,...	NA	U,V,W
		2n	A,B,C,...	E,F,G,...	NA	M,N,O,...	—	NA	—
	L_1*		0	0	0	0	Q,R,S,...	0	U,V,W
BC 细胞		≥2n	A,B,C,...	NA	I,J,K,...	NA	NA	U,V,W,X,Y,Z,...	NA
正常乳腺		2n	A,B,C,...	NA	I,J,K,...	NA	NA	—	NA
	L_2*		0	0	0	0	0	U,V,W,X,Y,Z,...	0

*伴随基因组筛选识别的标志的列表
**不可用
‡由于吞噬除了乳腺 CTC 和 / 或其片段而表达的
#由于吞噬 BC CTC 和 / 或其片段而表达的

图5

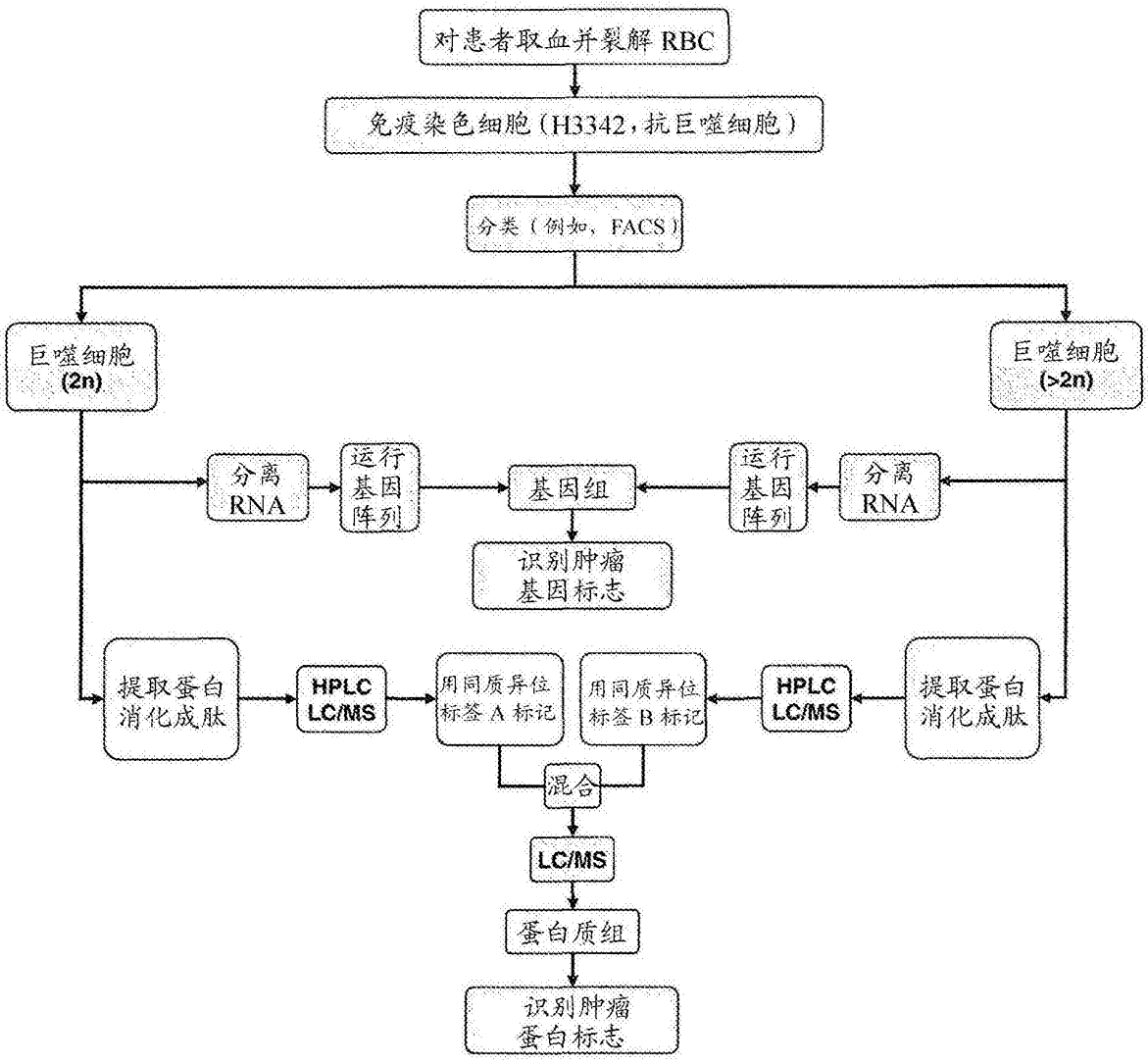

对患者取血并裂解 RBC
免疫染色细胞（H3342，抗巨噬细胞）
分类（例如，FACS）
巨噬细胞 (2n)
巨噬细胞 (>2n)
分离 RNA
运行基因阵列
基因组
运行基因阵列
分离 RNA
识别肿瘤基因标志
提取蛋白消化成肽
HPLC LC/MS
用同质异位标签 A 标记
用同质异位标签 B 标记
HPLC LC/MS
提取蛋白消化成肽
混合
LC/MS
蛋白质组
识别肿瘤蛋白标志

图6

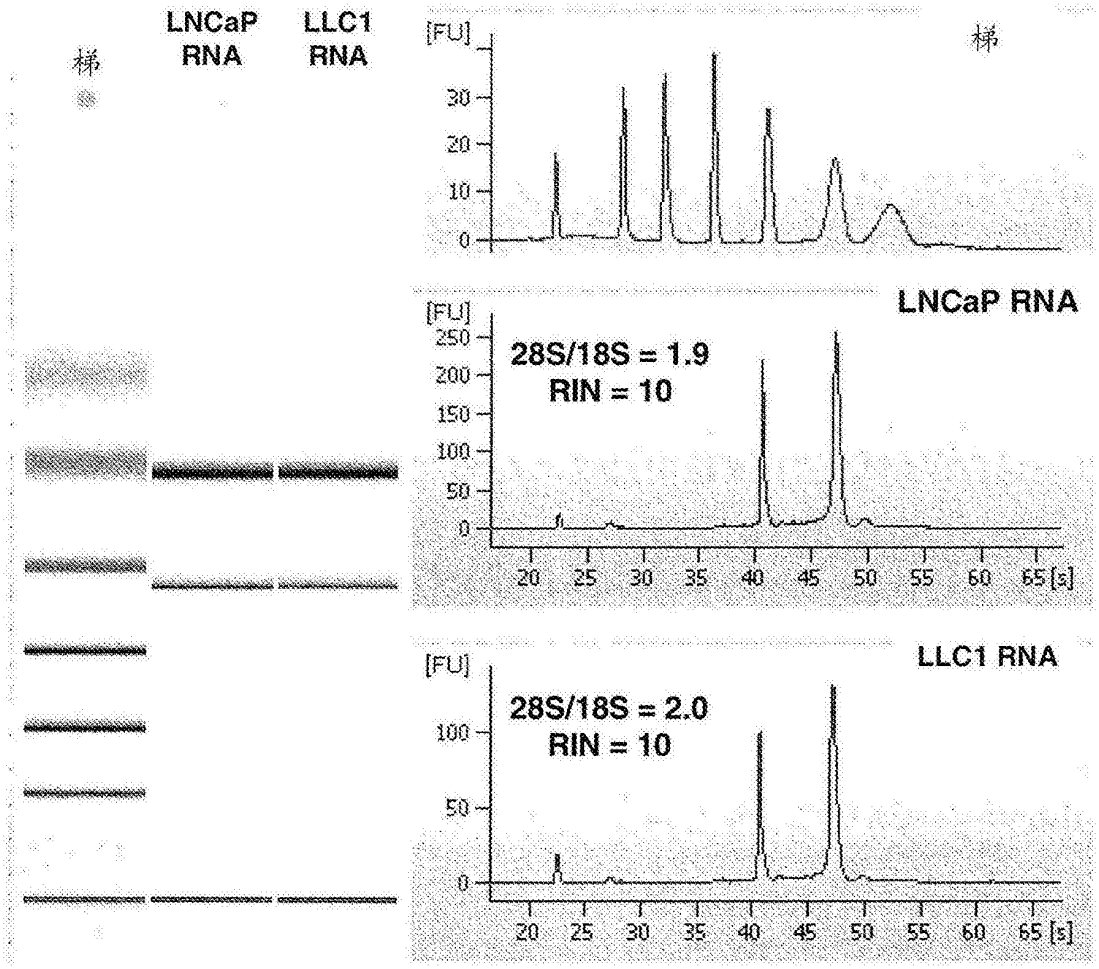


图7

	产率 (μg)	28S/18S 比率	RNA 完整性数量 (RIN)
巨噬细胞*	0.53 ± 0.22	1.9 ± 0.2	9.4 ± 0.8
T 细胞*	0.42 ± 0.20	1.9 ± 0.3	8.4 ± 0.9
嗜中性粒细胞*	0.62 ± 0.16	1.9 ± 0.3	9.6 ± 0.7

图8

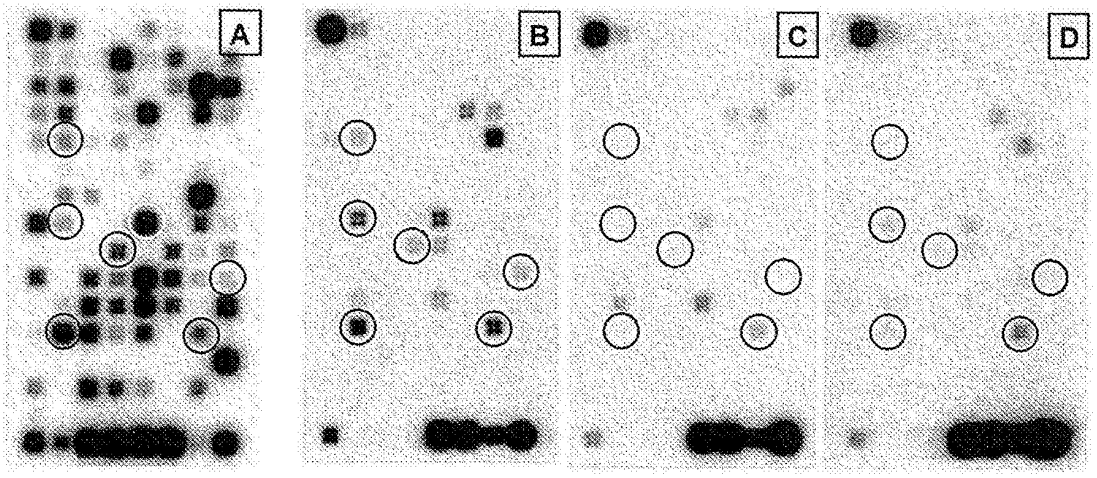


图9

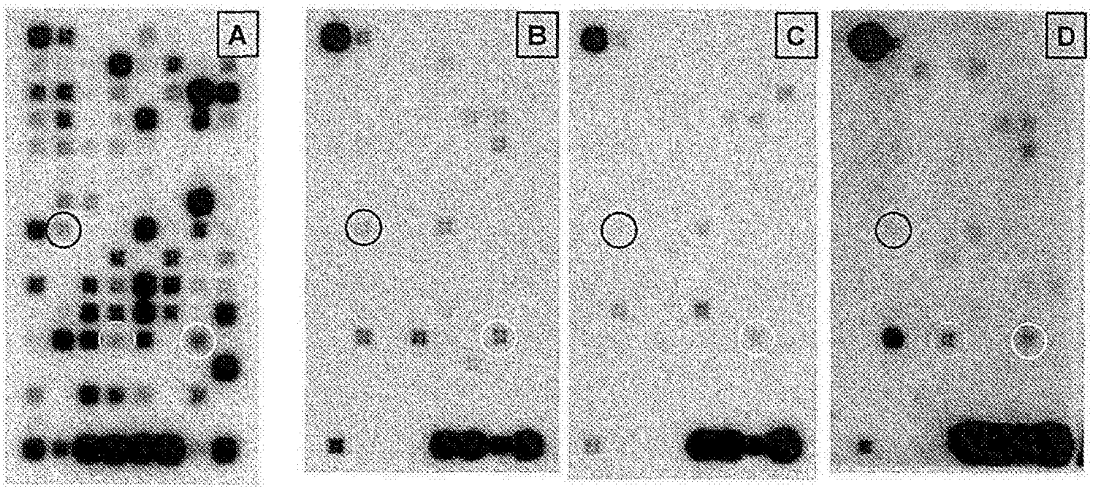


图10

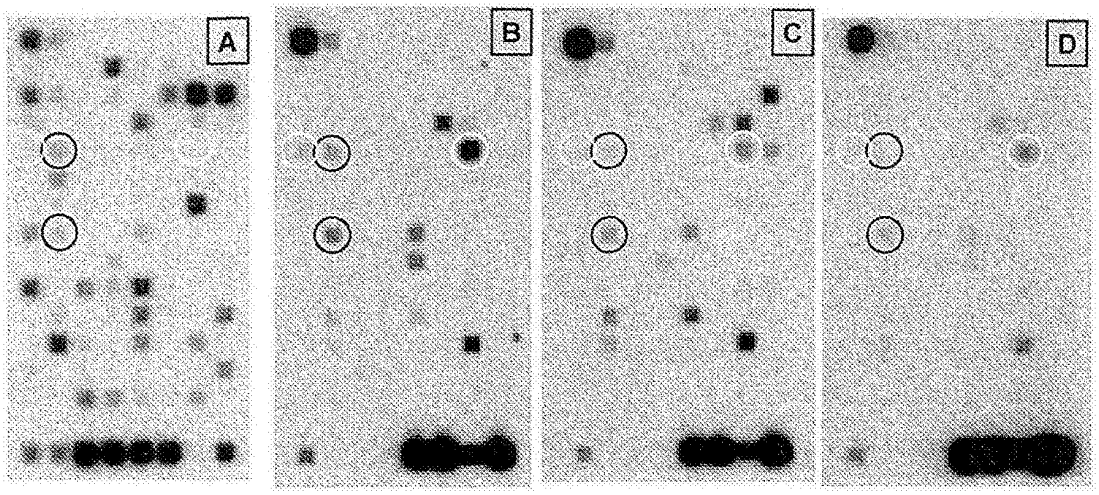


图11

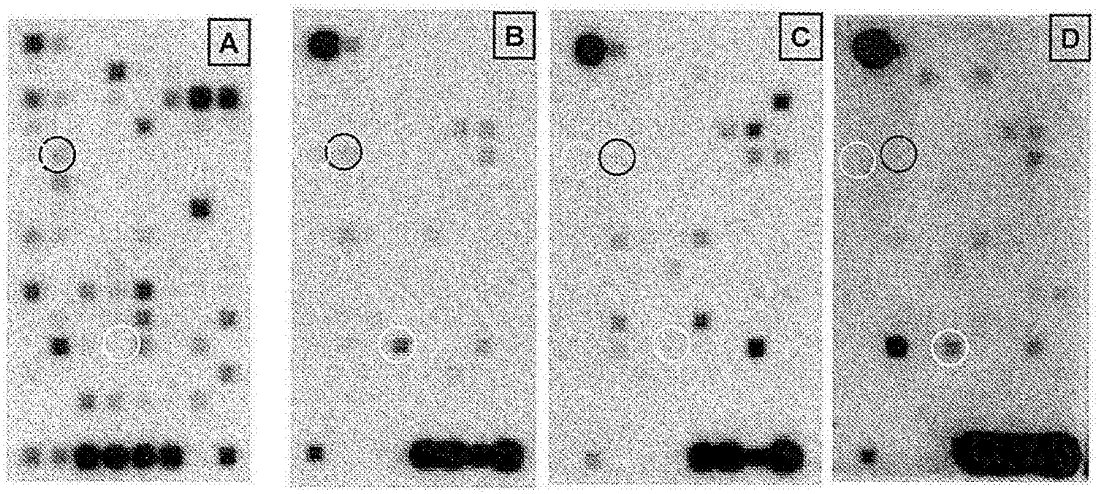


图12

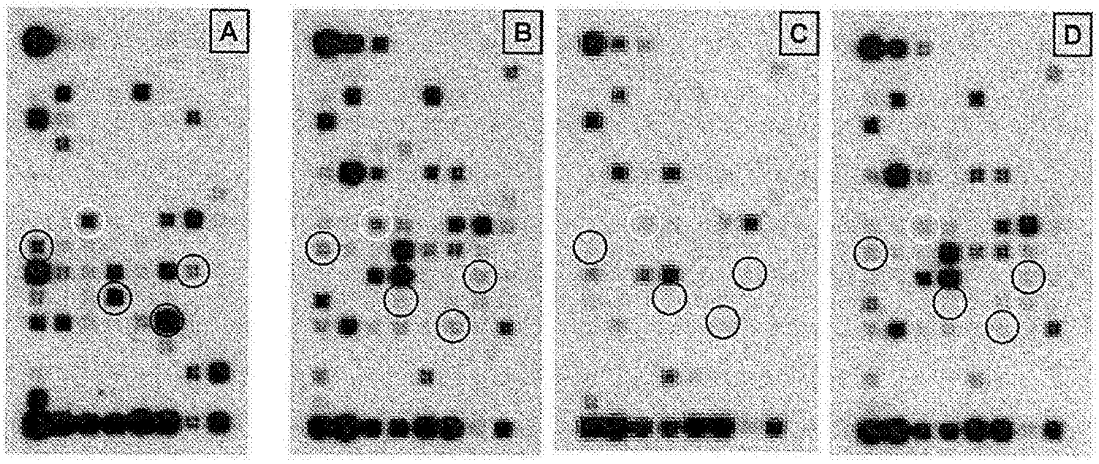


图13

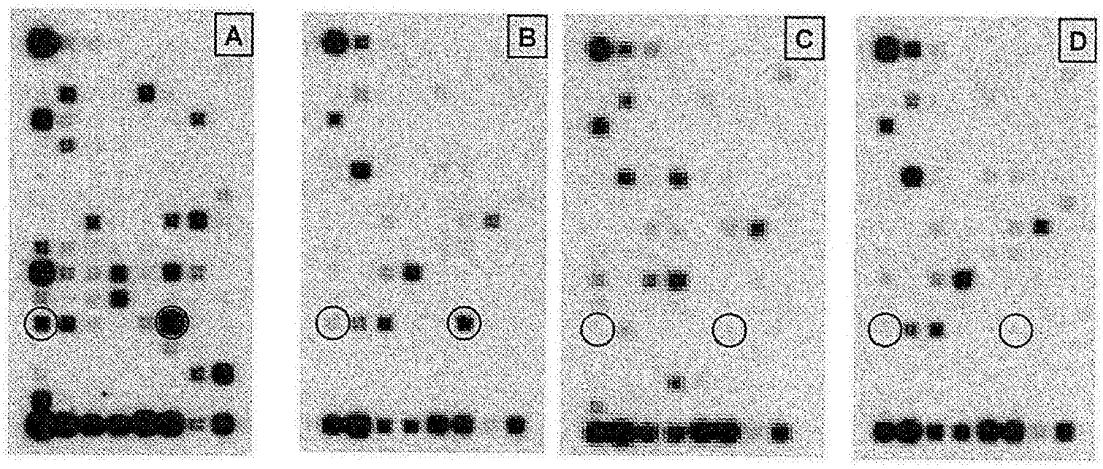


图14

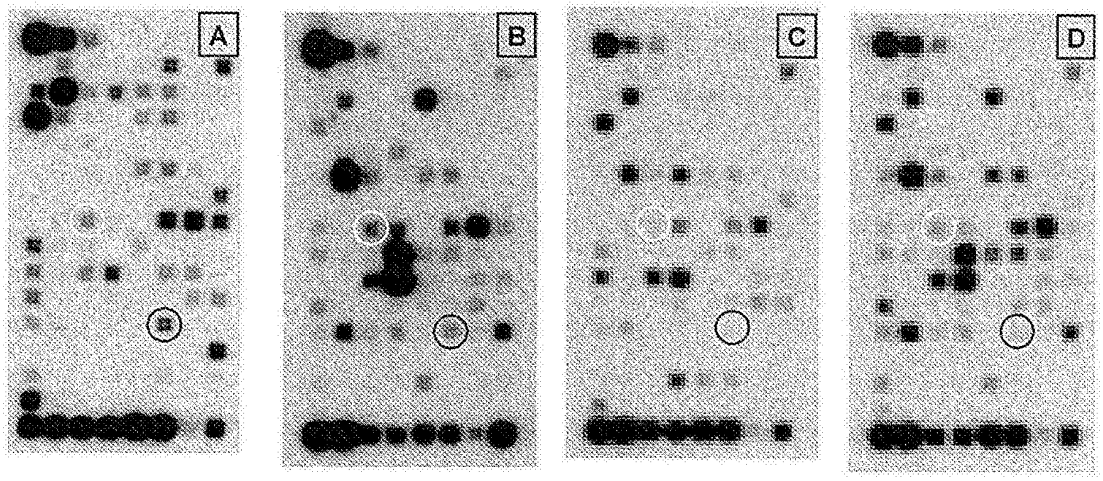


图15

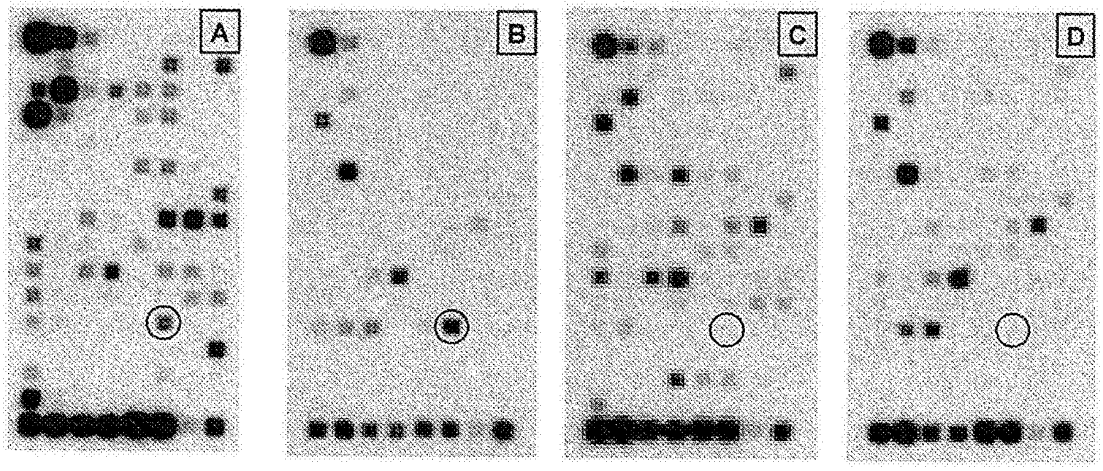


图16

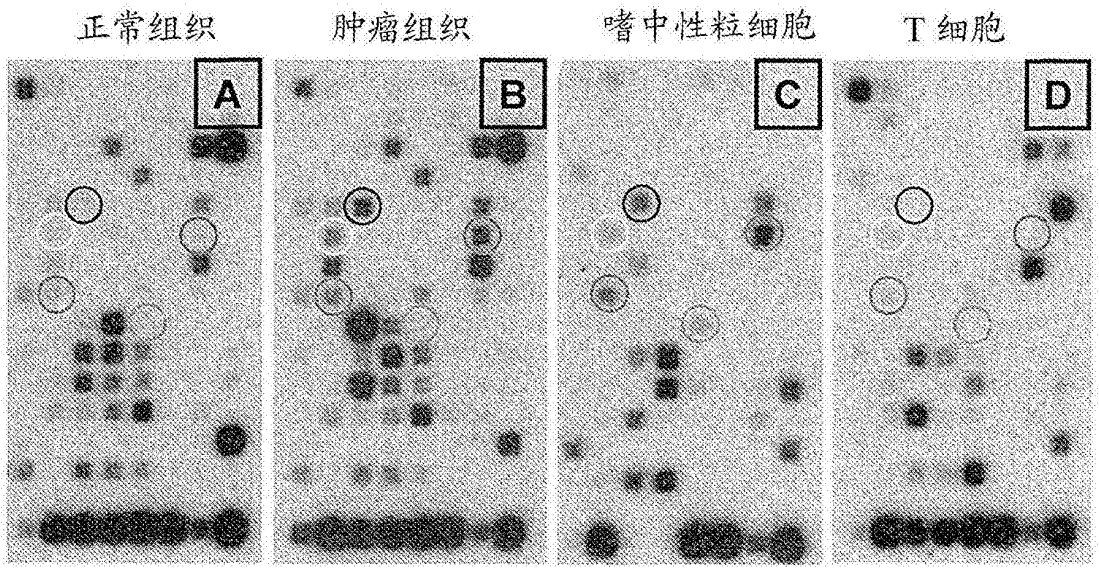


图17

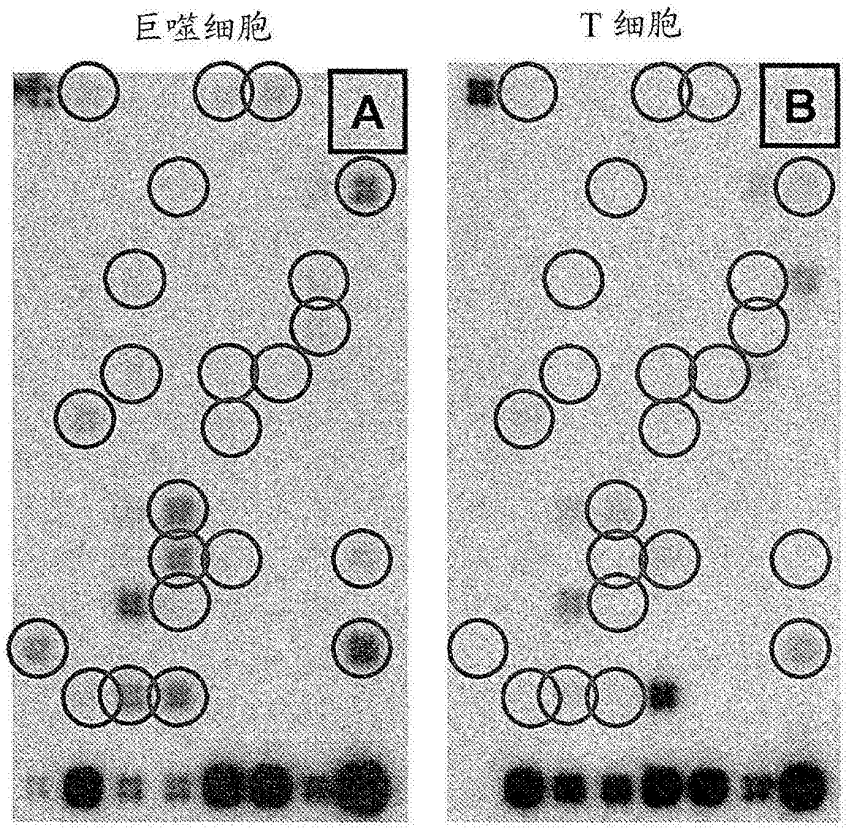


图18

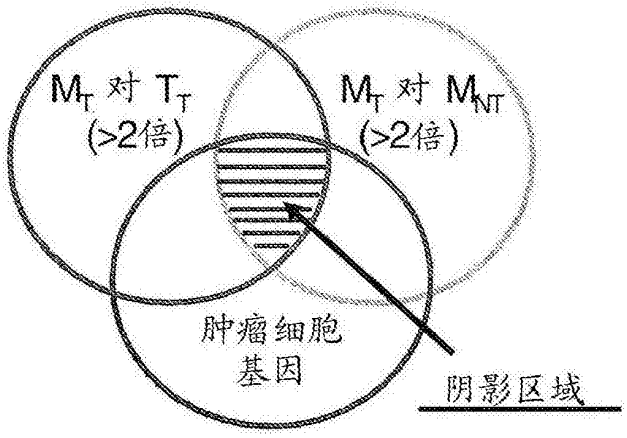

M_T 对 T_T
(>2倍)
M_T 对 M_{NT}
(>2倍)
肿瘤细胞
基因
阴影区域

图19

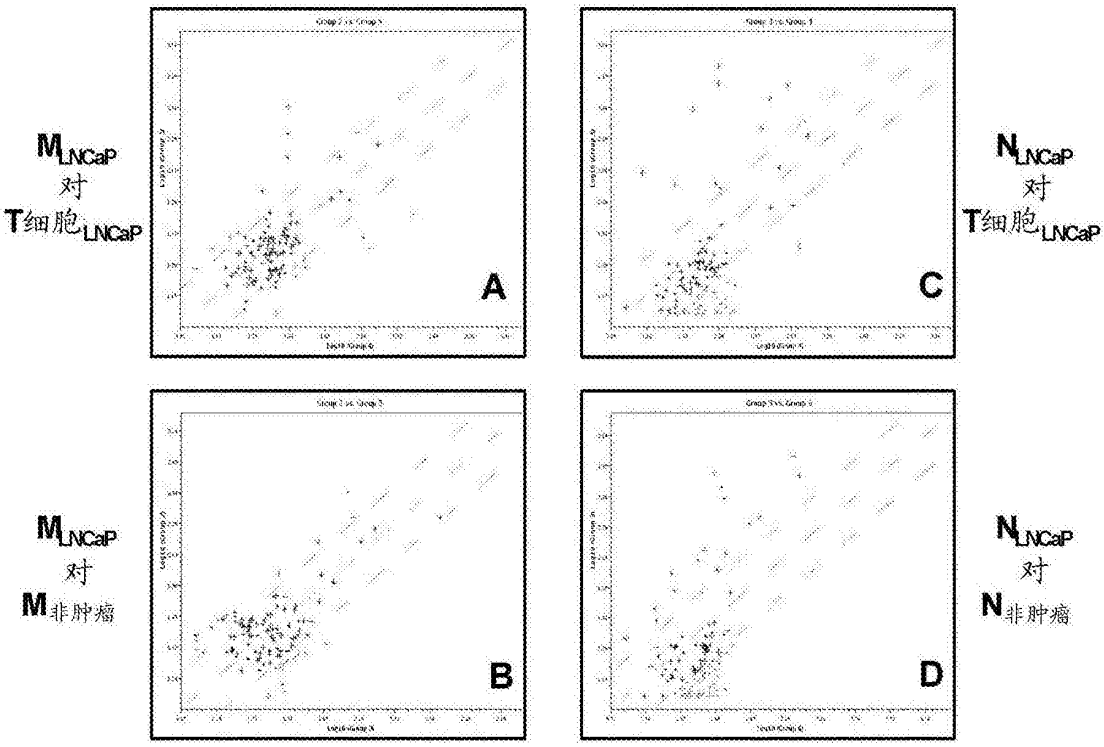

M_{LNCaP}
对
$T细胞_{LNCaP}$
A
N_{LNCaP}
对
$T细胞_{LNCaP}$
C
M_{LNCaP}
对
$M_{非肿瘤}$
B
N_{LNCaP}
对
$N_{非肿瘤}$
D

图20

表 5. 吞噬的嗜中性粒细胞（N）和巨噬细胞（M）中的癌症相关基因的表达

	过度表达的基因	LNCaP（人前列腺癌）（裸小鼠）		LS174T（人结肠癌）（裸小鼠）		B16F10（小鼠黑色素瘤）（黑小鼠）		LLC1（小鼠肺癌）（黑小鼠）	
		M	N	M	N	M	N	M	N
	BAK1	–	–	–	–	+	+	–	–
	EGFR	–	–	+	+	–	–	–	–
	ERBB2	–	+	+	+	–	–	–	–
	FOS	–	–	–	+	–	–	–	–
	JUN	+	+	–	+	–	–	–	+
	MAP2K1	–	+	–	–	–	–	–	–
	Mdm2								+
	MMP2	–	+	–	–	–	–	–	–
	PDGFB	–	+	–	–	–	–	–	+
	Plaur								+
	RB1	–	+	–	–	–	–	+	–
	SNCG	+	+	–	–	–	–	–	–
	SERPINB2	+	–	+	–	–	–	–	–
	SPP1	–	–	–	–	–	+	+	+
总共	12	3	7	3	4	1	2	2	5
在吞噬细胞（M+N）中过度表达的基因：		8		5		2		6	

红色 = 致癌基因；蓝色 = 肿瘤特异性基因；而黑色 = 肿瘤相关基因
= 由 M 和 N 同时获得 / 表达的基因

图21

基因符号	巨噬细胞/T细胞
*AKT1**	4.62
APAF1	**4.95**
ATM	**5.26**
CDC25A	**2.01**
CDKN1A	**4.57**
ETS2	3.47
FOS	6.49
IL8	**3.62**
ITGA4	**6.58**
ITGA6	**3.53**
ITGAV	**2.50**
JUN	3.01
MAP2K1	**3.09**
NFKBIA	**2.77**
PLAU	**2.13**
PLAUR	**38.79**
RAF1	8.13
SERPINB2	**5.37**
SYK	**20.81**
TIMP1	**2.04**
TNF	**3.75**
TNFRSF10B	**3.67**
TNFRSF1A	**6.96**

图22

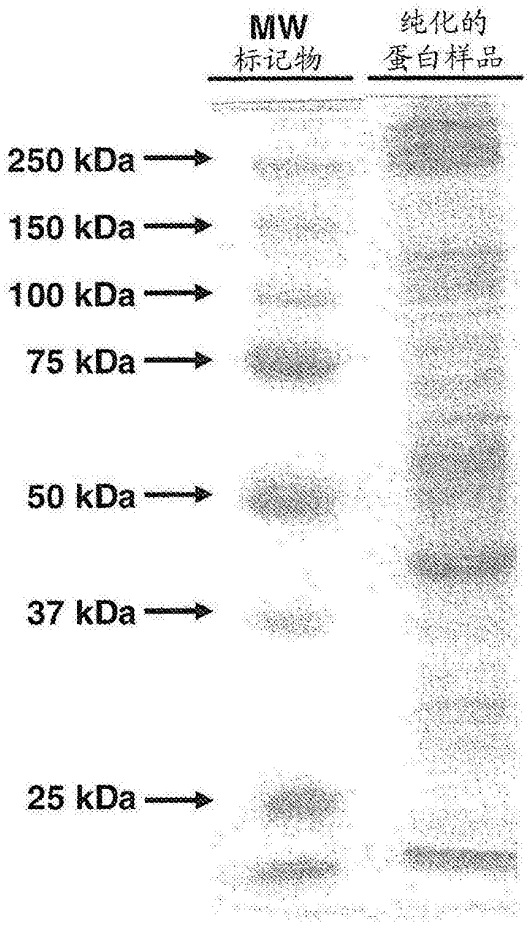

MW
标记物
纯化的
蛋白样品
250 kDa
150 kDa
100 kDa
75 kDa
50 kDa
37 kDa
25 kDa

图23

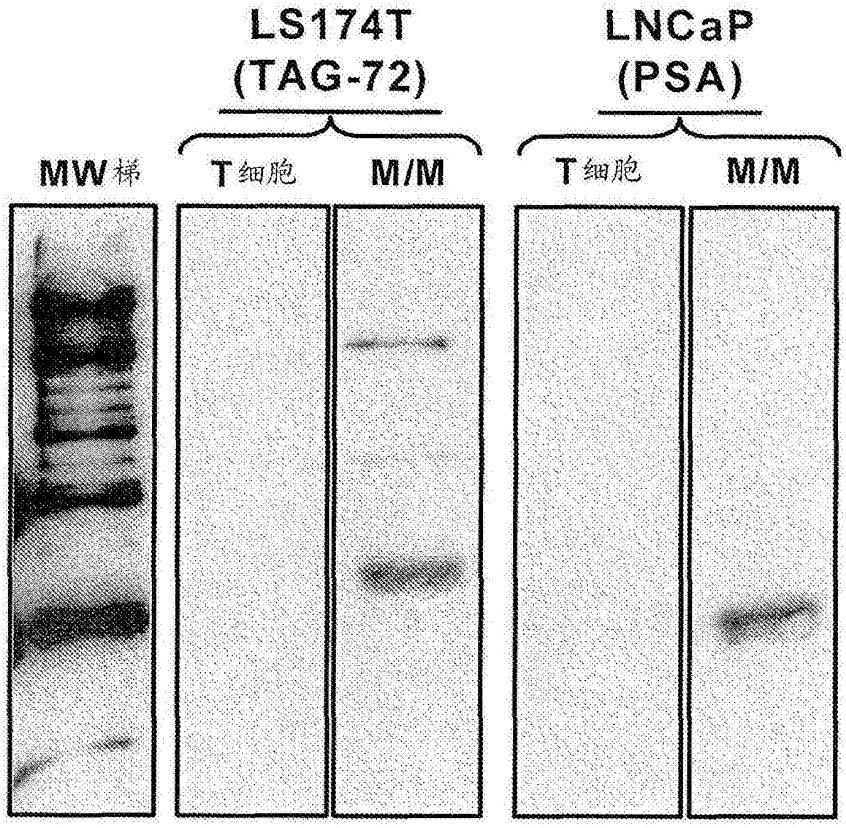


图24

Abstract

Methods and compositions for diagnosing the presence of a cancer cell in an individual are provided. Methods and compositions for identifying a tumor-specific signature in an individual having cancer are also provided. Methods and compositions for diagnosing the presence of an infectious agent in an individual and/or for identifying an infectious agent- specific signature in an infected individual are provided. Methods and compositions for diagnosing the presence of a disease in an individual are also provided. Methods and compositions for identifying a disease-specific signature in an individual having the disease are also provided.