



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111133106 A

(43)申请公布日 2020.05.08

(21)申请号 201880046403.6

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

(22)申请日 2018.07.12

代理人 翟建伟 彭昶

(30)优先权数据

62/531845 2017.07.12 US

62/678853 2018.05.31 US

(51)Int.Cl.

G12N 15/10(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/041884 2018.07.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/014486 EN 2019.01.17

(71)申请人 外来体诊断公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M.舍尔 E.埃坦 C.科蒂基亚

J.斯科格 R.基钦 S.余

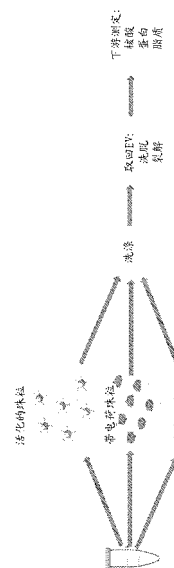
权利要求书4页 说明书29页 附图35页

(54)发明名称

用于分离和富集生物流体来源的细胞外囊泡的方法及其使用方法

(57)摘要

本发明总体涉及用于分离EV的亚群以鉴定生物标志物的方法,所述生物标志物可用于鉴定疾病(包括神经系统疾病),确定疾病(包括神经系统疾病)的进展和/或预后疾病(包括神经系统疾病)。更具体地,本发明涉及各种外排体生物标志物(包括蛋白、蛋白修饰、糖、RNA、DNA、脂质和代谢物及其组合)的检测技术。



1. 方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞外囊泡 (EV) 细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与所述官能化的捕获表面接触,其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化;

b. 将在所述官能化的捕获表面和所述至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与所述生物样品的未结合部分分离以获得捕获的复合物,和保留捕获的复合物;

c. 洗涤在所述官能化的捕获表面和所述至少一种细胞表面标志物之间形成的捕获的复合物;

d. 通过重复步骤b.-c.来富集所述生物样品内具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行上述a.-d.步骤来分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

2. 权利要求1的方法,其中所述至少一种靶标生物标志物是核酸、蛋白、碳水化合物或脂质。

3. 权利要求1-2中任一项的方法,其中所述至少一种细胞表面标志物存在于所述EV的表面上,或者其中所述生物标志物从所述EV内提取。

4. 权利要求1-3中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括抗体或抗体的混合物。

5. 权利要求1-4中任一项的方法,其进一步包括定量EV的亚群中的至少一种靶标生物标志物的存在。

6. 权利要求1-5中任一项的方法,其中所述至少一种靶标生物标志物的存在与从所述生物样品分离的亚群中的至少一个中的EV的数量直接相关。

7. 权利要求6的方法,其中所述至少一种生物标志物的存在使用转录组测定、蛋白质组测定、定量PCR、纳米串测定或微阵列来测定。

8. 权利要求1的方法,其进一步包括步骤f.,从分离和纯化的EV的亚群提取至少一种靶标生物标志物。

9. 权利要求8的方法,其中所述至少一种靶标生物标志物选自具有或没有任何修饰的 α -突触核蛋白、Tau、磷酸化Tau、SOD1、TDP43、感染性蛋白、HTT、SMA、淀粉样蛋白 β 、突触蛋白、簇蛋白和DRP1。

10. 权利要求1-9中任一项的方法,其进一步包括以下步骤:

g. 比较来自从受试者分离和纯化的EV的亚群的至少一种靶标生物标志物的水平与一种或多种预定义阈值;和,

h. 如果所述至少一种生物标志物的水平超过或不同于一种或多种预定义阈值,则将所述受试者鉴定为具有疾病或病况;和/或鉴定所述受试者中的疾病进展的风险;和/或将所述受试者鉴定为适合于疗法。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中所述细胞表面标志物是GluR2。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括一种或多种维生素、蛋白、配体、凝集素、肽、寡核苷酸、适体或其任何组合。

13. 权利要求1-7或10-12中任一项的方法,其中富集过程包括保留在所述试剂和来自

所述生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物。

14. 权利要求1-7或10-13中任一项的方法,其中所述生物样品选自血液、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流体、泪液、唾液、母乳、来自淋巴系统的流体、精液、脑脊液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水及其组合。

15. 权利要求1-7或10-14的方法,其中所述生物样品是血浆或血清。

16. 权利要求1-7或10-15中任一项的方法,其中纯化EV的亚群的步骤包括以完整形式洗脱所述EV。

17. 权利要求1-7或10-16中任一项的方法,其中纯化EV的亚群的步骤包括裂解所述EV,并从裂解的EV提取至少一种生物标志物。

18. 权利要求17的方法,其中提取的生物标志物包含RNA或RNA种类。

19. 权利要求1-7或10-18中任一项的方法,其中所述官能化的捕获表面包括珠粒的群体或珠粒的群体的混合物。

20. 权利要求19的方法,其中所述珠粒是磁性珠粒。

21. 权利要求1-7或10-20中任一项的方法,其中所述官能化的捕获表面包括一个或多个膜、芯片、纳米颗粒或纳米颗粒的群体、纳米管或纳米管的群体、载片、色谱介质或其任何组合。

22. 权利要求1-7或10-21中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括抗体或抗体的混合物。

23. 权利要求1-7或10-22中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂对于选自以下的细胞类型是特异性的:免疫细胞、T-细胞、B-细胞、NK细胞、单核细胞、内皮细胞、上皮细胞、血小板、红细胞、网织红细胞、神经元细胞、癌细胞、胚胎细胞或组织、星形胶质细胞、少突胶质细胞或其任何组合。

24. 权利要求1-23中任一项的方法,其中所述生物样品来自神经退行性疾病的患者,所述神经退行性疾病来自以下组成的列表:帕金森氏病(PD)、阿尔茨海默氏病(AD)、血管疾病性痴呆、额颞痴呆(FTD)、皮质基底变性(CBD)、进行性核上性麻痹(PSP)、路易氏体痴呆、以缠结为主的老年性痴呆、皮克氏病(PiD)、嗜银颗粒病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、其他运动神经元疾病、关岛帕金森氏病-痴呆复合症、FTDP-17、Lytic-Bodig病、多发性硬化和脑外伤(TBI)。

25. 权利要求1-24中任一项的方法,其中在使所述生物样品与所述官能化的捕获表面接触之前对所述生物样品进行预处理。

26. 用于进行根据权利要求1-25中任一项所述的方法的试剂盒,其包含至少一种试剂、缓冲液和使用说明书。

27. 方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与所述官能化的捕获表面接触,其中所述官能化的捕获表面包含对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂;

b. 将在所述官能化的捕获表面和所述至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与所述生物样品的未结合部分分离,和保留未结合的部分;

c. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行步骤a.-b.,通过保留所述生物样品的未结合部分,从所述生物样品耗竭具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,任选地,

d. 在足以在第二官能化的捕获表面和所述未结合部分中存在的至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使所述未结合部分与第二官能化的捕获表面接触;

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则与步骤d.依次或同时,从所述生物样品的未结合部分富集具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

f. 从所述生物样品的未结合部分分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

28. 权利要求27的方法,其中所述至少一种生物标志物是核酸、蛋白、碳水化合物或脂质。

29. 权利要求27-28中任一项的方法,其中所述至少一种细胞表面标志物存在于所述EV的表面上,或者其中所述至少一种生物标志物从所述EV内提取。

30. 权利要求27-29中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括抗体或抗体的混合物。

31. 权利要求27-30中任一项的方法,其进一步包括定量EV的亚群中的至少一种靶标生物标志物的存在。

32. 权利要求27-31中任一项的方法,其中所述至少一种靶标生物标志物的存在与从所述生物样品分离的亚群中的至少一个中的EV的数量直接相关。

33. 权利要求27-32中任一项的方法,其中所述至少一种生物标志物的存在使用转录组测定、蛋白质组测定、定量PCR、纳米串测定或微阵列来测定。

34. 权利要求27-33中任一项的方法,其中所述生物样品的未结合部分包含EV。

35. 权利要求27-34中任一项的方法,其中所述生物样品选自血液、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流体、泪液、唾液、母乳、来自淋巴系统的流体、精液、脑脊液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水及其组合。

36. 权利要求35的方法,其中所述生物样品是血浆或血清。

37. 权利要求27-36中任一项的方法,其进一步包括以下步骤:

g. 比较来自从受试者分离和纯化的EV的亚群的至少一种生物标志物的水平与一种或多种预定义阈值;和,

h. 如果至少一种生物标志物的水平超过或不同于一种或多种预定义阈值,则将所述受试者鉴定为具有疾病或病况;和/或鉴定所述受试者中的疾病进展的风险;和/或将所述受试者鉴定为适合于疗法。

38. 权利要求27-37中任一项的方法,其中纯化EV的亚群的步骤包括以完整形式洗脱所述EV。

39. 权利要求27-38中任一项的方法,其中纯化EV的亚群的步骤包括裂解所述EV,并从裂解的EV提取至少一种生物标志物。

40. 权利要求39的方法,其中提取的生物标志物包含RNA或RNA种类。

41. 权利要求27-40中任一项的方法,其中所述官能化的捕获表面包括珠粒的群体或珠

粒的群体的混合物。

42. 权利要求41的方法,其中所述珠粒是磁性珠粒。

43. 权利要求27-42中任一项的方法,其中所述官能化的捕获表面包括一个或多个膜、芯片、纳米颗粒或纳米颗粒的群体、纳米管或纳米管的群体、载片、色谱介质及其任何组合。

44. 权利要求27-43中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括一种或多种维生素、蛋白、配体、凝集素、肽、寡核苷酸、适体或其任何组合。

45. 权利要求27-44中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂对于选自以下的细胞类型是特异性的:免疫细胞、T-细胞、B-细胞、NK细胞、单核细胞、内皮细胞、上皮细胞、血小板、红细胞、网织红细胞、神经元细胞、癌细胞、胚胎细胞或组织、星形胶质细胞、少突胶质细胞或其任何组合。

46. 权利要求27-45中任一项的方法,其中所述对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂选自表1A-1B中显示的标志物。

47. 用于进行根据权利要求27-46中任一项所述的方法的试剂盒,其包含至少一种试剂、缓冲液和使用说明书。

用于分离和富集生物流体来源的细胞外囊泡的方法及其使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请要求2017年7月12日提交的美国临时申请号62/531,845和2018年5月31日提交的美国临时申请号62/678,853的优先权和权益,所述申请以其整体通过引用并入本文。

[0002] 背景

细胞外囊泡 (EV), 例如外排体和其他微囊泡, 是由细胞释放至细胞外环境中的小的脂质双层包封的微粒。细胞外囊泡的直径大小范围通常为30 nm至10微米。EV从大多数 (如果不是全部) 细胞类型分泌, 并且存在于体液 (包括血浆、血清、尿液和脑脊液) 中。EV充当天然载体, 用于在细胞之间递送大分子, 包括蛋白、核酸 (诸如DNA和RNA)、生物活性脂质和碳水化合物。已显示EV信号传导在各种各样的生理和病理病况 (包括致癌性疾病、神经退行性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病和代谢病症) 中发挥重要作用。EV表面含有从起源的细胞的表面继承的标志物 (蛋白/碳水化合物), 允许对细胞和组织特异性EV进行分类和靶向。EV货物 (包括但不限于蛋白和RNA) 取决于其起源细胞, 供体病理生理状态, 细胞状况、诸如氧化应激或代谢应激以及供体对治疗干预的应答, 且因此可以充当特定身体或疾病状况的生物标志物的来源。血液在全身循环, 并且在临床实践中定期收集, 使其成为疾病生物标志物的理想来源。血清和血浆, 血液的液体和无细胞相, 含有EV以及其他颗粒, 循环的游离蛋白, 循环的游离DNA和脂质。血浆样品中的某些组分 (诸如白蛋白和补体系统) 的丰度使得检测稀有代谢物和蛋白特别有挑战性。蛋白检测主要基于抗体-抗原相互作用, 通常被称为免疫测定。传统的方法、如凝胶电泳 (western印迹) 和酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和免疫化学发光以及较新的数字方法、如单分子阵列 (Simoa) 和Erenna使用该原理。免疫测定性能取决于抗体的质量 (灵敏度和特异性), 与检测方法无关。抗体-抗原相互作用特性取决于抗体特异性和相互作用的环境, 其包括: 盐和蛋白的缓冲液浓度、pH和抗原的可用性。血浆和血清富含不同组分、诸如蛋白和代谢物, 并且具有丰富蛋白的该复杂环境对于蛋白免疫测定而言是不良的环境, 尤其是如果靶标分析物丰度较低。使用EV克服该问题, 因为EV或EV的亚群的纯化将减少样品的复杂性, 并且允许从样品检测低丰度的靶标或表位。此外, 生物流体 (诸如血浆或血清) 中的RNA本质上是不稳定的, 并且经受将其消化的各种类型的RNA酶。

[0003] 目前, 通过有或没有密度梯度的超速离心分离EV。尽管该过程产生相对纯的EV群体, 但其费力, 效率低下, 并且生成高样品间差异。其他方法包括化学沉淀, 其共同分离检测测定中可以干扰的非囊泡组分。因此, 对于免疫测定方法以及其他检测方法, 具有低EV纯度的分离方法不是最优的。此外, 这些方法富集血浆中发现的许多种类的EV, 代表从多种细胞类型分泌的EV的高度异质的群体。来自不同细胞起源的EV类型的大型混合物可以干扰免疫测定, 或过度代表来自正常组织和细胞的蛋白和RNA特征, 其掩蔽来自疾病EV的概况。由于这些原因, 用于分离总EV群体或纯化EV的特定亚群的简单且可重现的方法可以显著增强基于EV相关的蛋白和RNA的生物标志物的检测。

[0004] 神经退行性疾病经数十年发展, 并且必须在发生不可逆的神经元损伤之前开始有效的预防性疗法。不幸的是, 神经退行性疾病经常直至到达晚期才被认识到, 因为诊断基于

临床症状,所述临床症状直至严重的神经系统损害已经发生才显现。诊断的验证需要昂贵的生物成像程序和/或对脑脊液的侵入性研究。即便如此,只有通过脑组织的死后神经解剖学和神经化学分析,才可能进行明确的诊断。许多值得注意的药物试验失败中显现无法在晚期医学干预神经退行性疾病,导致尚未对主要的神经退行性疾病(诸如阿尔茨海默氏病)进行任何改变疾病的治疗。基于EV的生物标志物可能填补该空白,以使得能够早期检测,和非侵入性连续监测,甚至在疾病症状发生之前。

[0005] 因此,在本领域中需要准确、安全、廉价和精确的测试,其可以在早期预测疾病的风险,鉴定疾病并在早期监测疾病(包括神经退行性疾病)的进展和对疾病(包括神经退行性疾病)的疗法的应答。

[0006] 出于公开本发明的目的,核酸、蛋白、脂质和碳水化合物被称为呈分离的纯形式(呈单体或呈寡聚物)或呈在这些大分子间形成的复合物。另外,EV、外排体和微囊泡在本公开中可互换使用。

[0007] 发明概述

本发明涉及从生物样品获得细胞外囊泡的新型方法,其可用于提供预后疾病(包括,但不限于癌症、代谢性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病和神经退行性疾病)、监测疾病(包括,但不限于癌症、代谢性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病和神经退行性疾病)中的治疗和治疗应答的有效性以及用于患者分层以用于疾病(包括,但不限于癌症、代谢性疾病、心血管疾病、自身免疫性疾病和神经退行性疾病)中的临床试验。本发明进一步提供了鉴定这些疾病中有用的生物标志物的方法。

[0008] 在一个方面,本发明涉及方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种EV细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与官能化的捕获表面接触,其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化;

b. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离以获得捕获的复合物,和保留捕获的复合物;

c. 洗涤在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的捕获的复合物;

d. 通过重复步骤b.-c.来富集生物样品内具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行上述a.-d.步骤来分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

[0009] 在一些实施方案中,步骤e.包括以完整形式洗脱EV的一个或多个亚群。在一些实施方案中,步骤e.包括裂解EV的一个或多个亚群并提取至少一种靶标生物标志物。在一些实施方案中,至少一种生物标志物包括核酸、蛋白、脂质、代谢物或碳水化合物。

[0010] 在相关方面,所述富集方法进一步包括以下步骤:

f. 比较来自从受试者分离和纯化的EV的亚群的至少一种靶标生物标志物的水平与一种或多种预定义阈值;和,

g. 如果至少一种生物标志物的水平超过或不同于一种或多种预定义阈值,则将受试者鉴定为具有疾病或病况;和/或鉴定受试者中的疾病进展的风险;和/或将受试者鉴定为适合于疗法。

[0011] 在一个方面,本发明涉及方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种EV细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与官能化的捕获表面接触,其中所述官能化的捕获表面包含对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂;

b. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离,和保留未结合的部分;

c. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行步骤a.-b.,通过保留生物样品的未结合部分,从生物样品耗竭具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,任选地

d. 在足以在第二官能化的捕获表面和未结合部分中存在的至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使未结合部分与第二官能化的捕获表面接触;

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则与步骤d.依次或同时从生物样品的未结合部分富集具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

f. 从生物样品的未结合部分分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

[0012] EV表面含有从起源的细胞的表面继承的标志物(蛋白/碳水化合物),允许对细胞和组织特异性EV进行分类和靶向。这是根本的,因为当在捕获材料和本文提供的至少一种细胞表面标志物之间形成复合物时,形成的复合物包含外排体。

[0013] 封装在EV内的情况下,RNA分子受到保护,且因此提供了独特类别的生物标志物,其反映EV起源的细胞或组织的疾病/健康状态。EV从其起源的细胞/组织携带的另一特征是表面标志物。细胞表面标志物通常是在细胞的表面上表达的膜蛋白,其经常方便地充当特定细胞类型的标志物。例如,T细胞和B细胞表面标志物鉴定它们在分化过程中的谱系和阶段。这些淋巴细胞分化为多种细胞亚型,且因此表达不同的表面受体或标志物,其可用于鉴定细胞亚型,诸如祖细胞或终末分化的T辅助细胞。在癌细胞中,许多药物成功针对靶向的致癌受体,尤其是酪氨酸激酶的类型,在许多癌症的发展和进展中发挥关键作用,包括但不限于cMET、EGFR、VEGFR、NGFR、PDGFR、RET、ROS和FGFR。可以利用EV膜上携带的这些和其他细胞膜标志物用于询问EV起源的细胞/组织的状态。

[0014] 在一个实施方案中,EV(尤其是外排体)不仅含有RNA/蛋白货物,而且含有在本文公开的富集/耗竭过程中使用的表面特征/蛋白。

[0015] 在一些实施方案中,所述方法包括从生物流体分离表达至少一种细胞表面标志物的细胞外囊泡(包括例如外排体和微囊泡)的全部和亚群,其方式适合于下游特定蛋白、DNA、RNA、脂质、代谢物和碳水化合物(例如凝集素)检测。生物流体的实例包括血浆、血清、尿液、唾液、精液和/或脑脊液(CSF)。

[0016] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在耗竭过程之后从生物样品分离EV的方法,其中基于一种或多种细胞表面标志物的表达从生物样品排除不相关的EV。

[0017] 在一些实施方案中,本公开还提供了用于基于细胞表面标志物(其可以包括蛋白、脂质或碳水化合物(糖或寡糖))的表达使用本文公开的过程富集EV的一个或多个亚群的方法。

[0018] 在一些实施方案中,本公开提供了用于从生物样品分离纯化的EV的群体的方法,

其包括：(a) 提供生物样品；(b) 产生官能化的捕获表面（例如板或珠粒），其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化；(c) 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下，使生物样品与官能化的捕获表面接触；(d) 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离；和(e) 通过进行富集过程来将纯化的EV的群体和与接触表面结合的生物样品（即 - 捕获的复合物）分离，或通过进行耗竭过程来将纯化的EV的群体与生物样品的未结合部分分离。

[0019] 在一些实施方案中，所述耗竭过程包括除去在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物，并保留生物样品的未结合部分。

[0020] 在一些实施方案中，在耗竭过程之后，在足以将生物样品的未结合部分中的EV的至少一部分保留在捕获表面上或捕获表面中的条件下，使生物样品的未结合部分与捕获表面接触。

[0021] 在一个实施方案中，所述富集过程包括保留在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物。

[0022] 在一个实施方案中，仅进行富集过程，即 - 其之前、同时或之后都没有进行耗竭过程。在一些实施方案中，当首先进行耗竭过程时，在耗竭过程之后可以进行富集过程。在其他实施方案中，耗竭过程与富集过程组合进行。

[0023] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括从EV的亚群提取至少一种生物标志物的步骤。在一些实施方案中，所述生物标志物被包封在EV内。在其他实施方案中，所述生物标志物可以包括核酸、蛋白、脂质、代谢物和/或碳水化合物。在又一个实施方案中，所述生物标志物在细胞表面或EV的表面上。

[0024] 在一些实施方案中，所述耗竭过程包括除去在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物，并保留生物样品的未结合部分。在一些实施方案中，在耗竭过程之后，在足以将生物样品的未结合部分中的EV的至少一部分保留在捕获表面上或捕获表面中的条件下，使生物样品的未结合部分与捕获表面接触。

[0025] 在一些实施方案中，将提取的核酸进行进一步下游分析。各种核酸测序技术被用于检测和分析从来自生物样品的EV级分提取的核酸，诸如无细胞DNA和/或RNA。因为其中EV可容易收集的非侵入性质，为了诊断目的而分析从EV提取的核酸，诸如无细胞DNA和/或核酸具有广泛的意义。

[0026] 在一个方面，本公开提供了用于从生物样品分离纯化的EV的全部或亚群的方法，其包括：

- a. 提供生物样品；
- b. 产生官能化的捕获表面，其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化；
- c. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下，使生物样品与官能化的捕获表面接触；
- d. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离以获得捕获的复合物，和保留捕获的复合物用于富集过程或保留未捕获的部分用于耗竭过程；

- e. 进行富集过程或耗竭过程;和,
- f. 从生物样品分离和纯化EV的亚群。

[0027] 在一些实施方案中,所述耗竭过程包括除去在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物,和保留生物样品的未结合部分,其包括EV。

[0028] 在一些实施方案中,在耗竭过程之后,在足以将生物样品的未结合部分中的EV的至少一部分保留在捕获表面上或捕获表面中的条件下,使生物样品的未结合部分与捕获表面接触。在一些实施方案中,所述方法进一步包括从EV提取一种或多种核酸、蛋白或脂质。在一些实施方案中,所述耗竭过程随后为富集过程。在另一个实施方案中,耗竭过程与富集过程组合实施。在一些实施方案中,所述富集过程包括保留捕获的在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物。

[0029] 在一些实施方案中,所述富集过程包括保留捕获的在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物。在一些实施方案中,所述方法进一步包括从EV提取一种或多种核酸、蛋白、碳水化合物或脂质的步骤。

[0030] 在一些实施方案中,所述耗竭过程包括除去在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物,并保留生物样品的未结合部分。在一些实施方案中,在耗竭过程之后,在足以将生物样品的未结合部分中的EV的至少一部分保留在捕获表面上或捕获表面中的条件下,使生物样品的未结合部分与捕获表面接触。

[0031] 在一些实施方案中,所述富集过程包括洗涤已经与生物样品接触的官能化的捕获表面。

[0032] 在一些实施方案中,本文公开的分离和纯化步骤包括以完整形式洗脱EV。在一些实施方案中,本文公开的分离和纯化步骤包括裂解所述EV,和从裂解的EV提取一种或多种核酸、蛋白、碳水化合物或脂质。

[0033] 在一些实施方案中,对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括一种或多种维生素、蛋白、配体、凝集素、肽、寡核苷酸、适体及其任何组合。

[0034] 在一些实施方案中,对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂选自表1A-1B和图11中显示的标志物。

[0035] 在另一个方面,本发明涉及基于其表面抗原装饰来鉴定和分离血浆样品中的神经元起源的细胞外囊泡且然后测定神经元来源的囊泡的蛋白和RNA货物用于神经退行性病症的鉴定或预后的方法。所述方法可以包括早期检测受试者的神经退行性病症的风险,患者分层用于临床登记或预测或监测治疗应答。

[0036] 在一些实施方案中,所述测定包括基于在外排体表面上的神经元标志物GluR2的存在来富集神经元来源的外排体(NDE),和测量由特定蛋白(包括 α -突触核蛋白、Tau、磷酸化的Tau、泛素化的蛋白和突触蛋白)以及不同疾病相关基因的mRNA组成的不同组的生物标志物,以评价与GluR2装饰的外排体相关的一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,所有RNA的水平可以通过RNAseq或任何其他转录组概况分析方法测定。发现的RNA特征可以充当进一步生物标志物发现的平台,或直接指导医学干预。在其他实施方案中,可以通过不同的组学方法(包括但不限于质谱和抗体阵列)表征GluR2装饰的外排体的蛋白或脂质货物。

[0037] 现在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,否则单数术语应包括复数,且复数术语应包括单数。

[0038] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域普通技术人员通常理解的具有相同含义。尽管与本文所述的方法和材料类似或等效的方法和材料也可以用于实施或测试本发明,但下文描述合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其整体通过引用并入。在冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的,并不旨在进行限制。

[0039] 所有鉴定的专利、专利申请和出版物通过引用明确并入本文,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。仅提供这些出版物用于其在本申请的申请日之前的公开。在这方面,任何内容都不应被解释为承认本发明人无权凭借在先发明或任何其他原因而先于这种公开。关于日期的所有陈述或关于这些文件的内容的代表都基于申请人可得的信息,并且不构成关于这些文件的日期或内容的正确性的承认。

[0040] 附图简述

上述方面和实施方案中的任一个可以与此处概述和/或详述部分中公开的任何其他方面或实施方案组合。

[0041] 本专利或申请文件含有至少一个以颜色绘制的图。本专利或专利申请公开的具有彩图的拷贝将在请求和支付必要费用后由专利和商标局提供。

[0042] 当与附图结合时,通过参考以下详述和所附权利要求,本发明的各种目的和优点以及更完全的理解是显而易见的,并且更容易理解,在所述附图中:

图1是具有EV分离的三种不同变体的过程的概览。

[0043] 图2A和2B是一系列图,且图2C是描绘抗GYPA (CD235) 抗体耗竭红细胞和网织红细胞来源的EV的能力(如通过RNA和蛋白水平所测量)的表。耗竭网织红细胞和红细胞EV的结果是,血浆中最丰富的mRNA (HBB、HBA1和HBA2) 被除去超过60%,如通过RNASeq所见。

[0044] 图3A和3B是一系列图,且图3C是描绘抗SELP (CD62P) 抗体耗竭血小板来源的EV的能力(如通过RNA和蛋白水平所测量)的表。耗竭血小板EV的结果是,血浆中血小板相关的mRNA (PPBP、PF4V1、PF4) 被除去60%至99%,如通过RNASeq所见。

[0045] 图4A是描绘耗竭红细胞和血小板来源的EV以及EV的RNAseq中蛋白编码、lncRNA和tRNA的增加的覆盖范围的图。图4B和4C是一系列列表,其描绘在EDDE过程后在EV中检测到的代表性蛋白编码基因的数量。

[0046] 图5是使用抗CD44和抗CD184抗体的EDDE过程从样品捕获乳腺癌来源的EV的能力的图。

[0047] 图6是一系列图,其描绘EDDE过程改进丰富生物标志物的特异性的能力。

[0048] 图7A、7B、7C和7D是一系列图,其描绘使用EDDE过程来富集EV的亚群实现测量血浆样品中的先前无法检测的蛋白和RNA的能力。

[0049] 图8是EDDE过程使用检测到的血浆RNA水平准确地区分仅在伊匹单抗使用2-4周后将对免疫疗法应答的患者的能力的举例说明。

[0050] 图9举例说明使用抗GYPA (CD235) 抗体来耗竭红细胞和网织红细胞来源的EV的EDDE耗竭结果,如通过RNA水平所测量。EDDE耗竭网织红细胞和红细胞EV的结果是,血浆中最丰富的mRNA (HBB、HBA1和HBA2) 被除去超过50%,如通过RNASeq以每百万转录物数测量值

所分析。

[0051] 图10举例说明使用细胞表面标志物CD63、CD81以及胶质母细胞瘤细胞系(Gli36)表面标志物EGFR1的EDDE富集结果,如使用qPCR通过富集EV的特定亚群的方式的GAPDH1的量增加(与IgG对照相比)所表明。

[0052] 图11举例说明概述用于耗竭或用于富集目的待用EDDE平台靶向的潜在细胞表面蛋白的列表。

[0053] 图12概述使用血小板表面标志物CD42和CD62的EDDE耗竭的结果,如通过免疫下拉珠粒上的血小板生物标志物PPBP的量增加(与对照IgG相比)(图12A),但血浆上清液(未结合部分)中的量减少(图12B)所表明。

[0054] 图13举例说明与IgG对照相比,当使用抗CD171(L1CAM)抗体时,EDDE富集导致通过qPCR分析的神经元基因的丰度增加。

[0055] 图14举例说明EDDE富集,其导致使用抗CD44 Ab的黑色素瘤表面蛋白标志物cMET的丰度增加,其比较正常人的血浆样品和来自两个黑色素瘤患者的血浆样品(右部分),清楚地将黑色素瘤与正常人区分开。如果未进行EDDE富集,则通过使用纯净血浆用于cMET分析否则无法区分患者和正常人(左部分)。

[0056] 图15A是外排体独特的表面标志物(FLOT1和CD81)和细胞表面标志物EGFRvIII的western印迹分析。图15B概述与使用EGFR抗体以IgG为对照的正常健康人相比,来自GBM患者的cMET蛋白生物标志物的EDDE富集的结果。在同一实验中,EGFRvIII EDDE没有富集cMET,因为该患者不表达EGFRvIII表面标志物。

[0057] 图16举例说明使用基于L1CAM(CD171)的EDDE富集过程,与年轻血浆相比,年长血浆中升高的Tau蛋白生物标志物。作为对照,将年长血浆通过超速离心针对EV级分进行预先耗竭,其消除Tau信号,甚至当进行EDDE富集时。PBS是EDDE过程的另一种样品对照。在没有EDDE富集的情况下,在所有样品中的纯净血浆中未检测到生物标志物Tau蛋白水平。

[0058] 图17举例说明使用抗CD235抗体的EDDE耗竭过程后的HBB基因分析的结果(左部分)。当比较基于CD235的EDDE与基于IgG的EDDE时,观察到在EDDE上清液(未结合部分)中的HBB基因水平降低超过4倍(2.8 Ct变化),如通过qPCR所分析。图的右部分表明当进行L1CAM EDDE时正常人血浆中的p-181-Tau蛋白水平的3.6倍富集(右部分)。

[0059] 图18A-D举例说明使用L1CAM细胞表面标志物(作为对照)、IgG EDDE、EDDE-L1CAM(使用PBS作为样品)的人血浆中的生物标志物Tau(图18A)和p-Tau(图18B)的EDDE富集结果,并且使用用EV-耗竭的血浆样品的EDDE-L1CAM。对于手动过程、半自动过程(King Fisher Flex)和96-孔EDDE手动过程比较使用L1CAM的EDDE神经元富集(图18C)。与IgG-EDDE相比,使用L1CAM-EDDE(EDDE-neuro1)或GluR2-EDDE(EDDE-neuro2)平台都富集p-tau、Tau、EN02和SNCA的神经元生物标志物蛋白水平。作为对照,使用神经元特异性EDDE过程没有富集非神经元生物标志物蛋白HBB(图18D)。

[0060] 图19A-D举例说明使用L1CAM-EDDE(EDDE-neuro1)或GluR2-EDDE(EDDE-neuro2)平台的人血浆中的神经元特异性基因生物标志物NEFL、NRGN、EN02、SNSR4和GRP139的EDDE富集结果(图19A)。作为对照,使用IgG EDDE。使用qPCR分析(Ct)来定量生物标志物(图19A),其与总EV(图19B)、方差系数分析(图19C)和原始Ct(图19D)相比进行回收率分析。图20描述在血浆中使用L1CAM和GluR2细胞表面标志物的稳健EDDE生物标志物富集方案。使用

L1CAM和GluR2的SNCA蛋白富集的水平以血浆依赖性方式增加。输入血浆的渐增体积增加 α -突触核蛋白的EDDE神经元富集,但EDDE-IgG对照没有,表明EDDE方案的特异性(图20A)。两个操作人员的可重复性研究稳健地显示EDDE神经元样品中 α -突触核蛋白(SNCA)的丰度增加(图20B),以及通过EDDE过程的SNCA/HBB蛋白水平的信噪比增加(图20C)。

[0061] 图21A-D表明使用L1CAM(图21C)或GluR2(图21D)的EDDE富集在通过分析蛋白质生物标志物SNCA(α -突触核蛋白)来区分帕金森氏病患者(10)与健康个体(10)中的临床效用。作为对照,在没有纯净血浆中的EDDE富集的情况下(图21A)或通过IgG-EDDE(图21B),无法实现这种区分。

[0062] 图22A-B描述使用L1CAM和GluR2进行的EDDE富集,与使用IgG的EDDE过程和使用非神经元表面标志物DRD5的EDDE相比,其显示更多的神经元mRNA生物标志物,如通过qPCR(来自IgG-EDDE的Ct减去来自靶标Ab-EDDE的Ct之间的 Δ Ct)所分析(图22A)。图22B描述使用qPCR对分析中的非丰富基因的数字读出值。

[0063] 图23描述使用L1CAM或GluR2的EDDE富集,与使用IgG的EDDE过程相比,其显示帕金森氏病相关的mRNA生物标志物(但非HBB)的丰度的富集,如通过qPCR所分析。作为对照,进行总外排体分离以充当富集起点的比较。

[0064] 图24A-B表明,与不使用特异性抗体的EDDE过程相比,通过经由qPCR分析一些帕金森氏病相关基因,使用L1CAM或GluR2的EDDE富集清楚地地区分帕金森氏症与健康个体(图24A)和(图24B)。

[0065] 图25举例说明使用L1CAM或GluR2的帕金森氏病生物标志物 α -突触核蛋白的EDDE富集。在相同过程中,蛋白水平不牵涉于帕金森氏病中的GFAP保持相对恒定。

[0066] 发明详述

本公开提供了用于使用过程分离细胞外囊泡(EV)的组合物、试剂盒和方法,所述过程增加测量生物样品(诸如例如生物流体样品)中的一种或多种EV相关蛋白、核酸或代谢物的表达水平的灵敏度。

[0067] 进一步,本发明涉及这样的发现:神经元外排体可以穿过血脑屏障并且存在于血浆样品中。其涉及这样的发现:这些外排体及其货物可以充当鉴定神经系统疾病、病症或病况的基础。

[0068] 在一些实施方案中,一些非限制性神经系统病症、疾病或病况包括帕金森氏病(PD)、阿尔茨海默氏病(AD)、血管疾病性痴呆、额颞痴呆(FTD)、皮质基底变性(CBD)、进行性核上性麻痹(PSP)、路易氏体痴呆、以缠结为主的老年性痴呆、皮克氏病(PiD)、嗜银颗粒病、肌萎缩性侧索硬化症(ALS)、其他运动神经元疾病、关岛帕金森氏病-痴呆复合症、FTDP-17、Lytico-Bodig病、多发性硬化和脑外伤(TBI)。

[0069] 本文提供的过程以生物样品开始,并以总EV的纯化群体为结果。在一些实施方案中,基于检测特定的表面标志物,进一步完善EV的群体以鉴定和分离特定亚群或其他亚群。在缓冲液中进行EV群体的分离和亚群的任何进一步分离,所述缓冲液适用于大多数对蛋白、蛋白修饰、糖、脂质、RNA、DNA和代谢物的下游测量测定,包括但不限于Western印迹、ELISA、qPCR、RNASeq、DNASeq、流式细胞术、免疫荧光、免疫金电子显微镜和质谱法及其任何组合。本文提供的用于分析EV的纯化的群体和/或亚群及其提取的生物标志物的任何本领域公认的技术均适用于本文所述的过程中。

[0070] 在一些实施方案中,总EV的分离基于在带正电荷或负电荷的捕获表面(诸如,通过非限制性实例的方式,珠粒和/或柱)上捕获EV。在一些实施方案中,使用可以用针对表面蛋白或其他细胞表面标志物的配体官能化的任何合适的捕获表面捕获或以其他方式分离来自生物样品的总EV的群体或EV的一个或多个亚群。在一些实施方案中,所述细胞表面标志物可以用于鉴定期望的亚群或两个或更多个期望的亚群的组合。

[0071] 在一些实施方案中,所述捕获表面用针对EV上的不同细胞表面标志物的抗体、重组抗体、辅酶、维生素、蛋白、肽、适体、受体配体或凝集素进行官能化。在一些实施方案中,所述捕获表面是用针对EV上的一个或多个不同表面表位的抗体、适体、配体或凝集素官能化的珠粒的群体。在一些实施方案中,所述捕获表面是磁性、琼脂糖、树脂、乳胶或硅珠粒。在一些实施方案中,所述捕获表面是纳米颗粒、芯片、琼脂糖、Sephadex、色谱柱、亲和柱或纳米管。

[0072] 在一些实施方案中,术语“捕获表面”和“捕获材料”在这里可互换使用。

[0073] 从捕获表面除去用于分离EV(总EV或EV的亚群)的捕获表面上的其他非特异性结合的血浆代谢物。在一些实施方案中,非特异性结合的血浆代谢物用具有0.1%-5% tween和6.0-9.0的范围内的pH的改良的TBST缓冲液洗涤。在一些实施方案中,非特异性结合的血浆EV用具有0.1%-3% tween或0.1-8% BSA的PBS洗涤。在一些实施方案中,使用去污剂如0.01-0.5% Triton x-100来除去非特异性结合的血浆EV。在一些实施方案中,使用还原剂如0.1-5% DTT或0.5-8% 2-巯基乙醇来除去非特异性结合的血浆EV。

[0074] 在一个实施方案中,从捕获表面洗脱EV货物。在一些实施方案中,从捕获表面洗脱完整的EV货物。在一些实施方案中,通过与裂解缓冲液一起孵育,从捕获表面洗脱EV货物。在一些情况下,所述洗脱过程可以任选含有至少一个冻-融循环。在一些实施方案中,所述冻-融循环发生在-20℃,有时在-80℃或其之间的某个温度。在一些实施方案中,所述孵育为在室温下至少30分钟直至6小时。在一些实施方案中,所述孵育在约2-4小时的范围内。在一些实施方案中,所述孵育为在较低温度下,诸如例如在+4℃下,在约6-24小时的范围内。

[0075] 本文提供的过程允许用户使用不同的生物流体作为起始材料。在一些实施方案中,所述生物样品可以合适地包含来自受试者的体液。所述体液可以是受试者的身体的任何地方(诸如例如外周部位)分离的流体,包括但不限于,例如血液、血浆、血清、尿液、痰液、脊髓液、脑脊液、胸膜液、乳头抽吸液、淋巴液、呼吸道、肠道和泌尿生殖道的流体、泪液、唾液、母乳、来自淋巴系统的流体、精液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水和细胞培养上清液及其组合。生物样品也可以包括粪便或盲肠样品,或从其中分离的上清液。

[0076] 本文提供的过程允许用户选择抗体的不同选择用于分离EV的特定亚群。该过程适用于测量蛋白、蛋白修饰、糖、脂质、RNA、DNA、RNA/DNA修饰和突变以及代谢物及其任何组合。

[0077] 本文公开的过程通常被称为“EDDE过程”或“EDDE”。本领域普通技术人员将理解,EDDE过程可以以各种方式中的任一种来使用。例如,在一些实施方案中,EDDE过程可用于基于在EV的富集亚群上检测到的细胞表面标志物的存在来富集分离的EV群体。该方法在本文中被称为EDDE富集过程。在一些实施方案中,EDDE过程可用于基于待从总EV群体耗竭的EV的亚群上检测到的细胞表面标志物的存在,耗竭从EV的一个或多个不同亚群分离的EV群体。该方法在本文中被称为EDDE耗竭过程。

[0078] 如本文所用,术语“EDDE过程”或“EDDE”是指以下一般方法:i)将捕获表面用对于一般EV上的一种或多种细胞表面标志物特异性或对于EV的一个或多个亚群上的一种或多种细胞表面标志物特异性的试剂官能化,以从生物样品分离总EV群体或EV的一个或多个亚群;ii)使官能化的捕获表面与生物样品接触;iii)进行耗竭步骤,或进行富集步骤,或其组合,以产生纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群;和iv)洗脱纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群,或进一步操纵纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群,例如,通过裂解纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群内的EV。在一些实施方案中,然后对洗脱的纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群进行进一步的下游分析(例如,提取靶标生物标志物,随后分析和/或比较这些生物标志物各自的水平,或如本文进一步公开的其他分析)。在一些实施方案中,对于耗竭过程,步骤iii)至少包括将来自步骤ii)的上清液转移至新管或其他容器中,和使用合适的捕获表面将EV与上清液分离。在一些实施方案中,来自上清液的EV从合适的分离捕获表面完整洗脱。在一些实施方案中,裂解来自上清液的EV,并提取来自裂解的EV的核酸或蛋白。在一些实施方案中,然后对洗脱的完整EV或从其中提取的核酸或蛋白进行进一步的下游分析。在一些实施方案中,对于富集过程,步骤iii)包括洗涤已经与来自步骤ii)的生物样品接触的官能化的捕获表面,并将洗涤的捕获表面转移至新管或其他容器中。在一些实施方案中,从洗涤的捕获表面完整洗脱EV。在一些实施方案中,裂解EV,并提取来自裂解的EV的核酸或蛋白。在一些实施方案中,然后对洗脱的完整EV或从其中提取的核酸或蛋白进行进一步的下游分析,如本文所述。

[0079] 在一个实施方案中,通过本文进一步公开的一系列富集或耗竭步骤,富集和耗竭过程利用细胞表面标志物的使用来捕获并获得含有至少一种生物标志物的EV的亚群。在一个实施方案中,将本文公开的至少一种生物标志物最初包封在EV内,并且在本文公开的富集和/或耗竭过程之后,从EV的分离的和/或纯化的亚群提取这些生物标志物。在一个实施方案中,术语“生物标志物”和“靶标生物标志物”是指在本文公开的富集或耗竭过程之后提取的核酸、蛋白、脂质、代谢物和/或碳水化合物。

[0080] 在一个实施方案中,提供了方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与官能化的捕获表面接触,其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化;

b. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离,和保留捕获的复合物;

c. 洗涤在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的捕获的复合物;

d. 通过重复步骤b.-c.来富集生物样品内具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行上述a.-d.步骤,分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

[0081] 在一个实施方案中,至少一种细胞表面标志物用于EDDE富集,用于分析至少另一种细胞表面蛋白作为生物标志物。

[0082] 在另一个实施方案中,提供了方法,其包括:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件

下,使生物样品与官能化的捕获表面接触,其中所述捕获表面用对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂进行官能化;

b. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离,和保留捕获的复合物;

c. 洗涤在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的捕获的复合物;

d. 通过重复步骤b.-c.来富集生物样品内具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

e. 分离EV的一个或多个亚群;和,

f. 纯化EV的一个或多个亚群,其中所述EV含有至少一种靶标生物标志物。

[0083] 在一个实施方案中,提供了方法,其包括以下步骤:

a. 在足以在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使生物样品与官能化的捕获表面接触,其中所述官能化的捕获表面包含对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂;

b. 将在官能化的捕获表面和至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离,和保留未结合的部分;

c. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则通过依次或同时进行步骤a.-b.,通过保留生物样品的未结合部分,从生物样品耗竭具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,任选地,

d. 在足以在第二官能化的捕获表面和未结合部分中存在的至少一种细胞表面标志物之间形成复合物的条件下,使未结合部分与第二官能化的捕获表面接触;

e. 如果使用多于一种细胞表面标志物,则与步骤d.依次或同时从生物样品的未结合部分富集具有至少一种细胞表面标志物的EV的一个或多个亚群;和,

f. 从生物样品的未结合部分分离和纯化具有至少一种靶标生物标志物的EV的一个或多个亚群。

[0084] 在另一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:

g. 比较来自从受试者分离和纯化的EV的亚群的至少一种靶标生物标志物的水平与一种或多种预定义阈值;和,h. 如果至少一种生物标志物的水平超过或不同于一种或多种预定义阈值,则将受试者鉴定为具有疾病或病况;和/或鉴定受试者中的疾病进展的风险;和/或将受试者鉴定为适合于疗法。在一个实施方案中,本文公开的方法进一步包括比较来自从受试者分离和纯化的EV的亚群的至少一种靶标生物标志物的水平与一种或多种预定义阈值;和,如果至少一种生物标志物的水平超过或不同于一种或多种预定义阈值,则将受试者鉴定为具有疾病或病况;和/或鉴定受试者中的疾病进展的风险;和/或将受试者鉴定为适合于疗法。

[0085] 阈值的实例包括生物标志物的存在/不存在,生物标志物以高于测定的一些本底噪声/检测限值的丰度的存在,生物标志物以高于或低于源自疾病知识的某一预定绝对水平(诸如设定的浓度或拷贝数)的丰度的存在,生物标志物相对于另一种可以充当归一化物/校准物的分子的丰度,其中绝对阈值可以由于样品输入量的变化/降解/等而被损害。此类损害因素可以类似地影响生物标志物和归一化分子,且因此分开。在一些实施方案中,相对生物标志物/归一化物丰度可以在某一量以上/以下增加或减少,其在这种情况下将构成

阈值。

[0086] 在一些实施方案中,所述方法包括耗竭过程,其中将来自抗体/珠粒复合物和血浆样品的孵育组合的上清液转移至新管中,并分离EV群体或从EV群体提取的RNA,如上所述。

[0087] 在一些实施方案中,所述方法包括富集过程,其中将来自步骤iv)的管中的珠粒用pH在3至8之间的缓冲液洗涤1-3次,随后添加pH 3至8的另一种缓冲液。在一些实施方案中,将所述捕获表面转移至新容器。

[0088] 本领域普通技术人员还将理解,一般EDDE过程必要时可以包括额外步骤,以分离一个或多个EV亚群和/或进一步分析分离的EV群体(总EV群体或一个或多个EV群体)。

[0089] 在一些实施方案中,所述EDDE过程包括以下步骤:i)洗涤珠粒或捕获表面;ii)将对于一种或多种细胞表面标志物特异性的抗体、蛋白或配体或抗体的组合添加至洗涤的表面;iii)将活化的表面或珠粒复合物添加至生物流体中并使抗体蛋白或配体暴露于体液中的抗原或蛋白;iv)在步骤iii)之后,进行耗竭过程或富集过程或其组合;v)从捕获表面洗脱或裂解EV,并分离上清液;和vi)用酸性/碱性缓冲液洗脱上清液,或用可溶性、竞争性抗原进行竞争性洗脱,或通过裂解抗体与珠粒的连接或任何其他化学/物理方式来从抗体剥离珠粒,以从其抗原剥离抗体。在一些实施方案中,对完整外排体进行洗脱以用于EV含量的下游分析,如本文别处所述。在一些实施方案中,可以替代地使用用针对脱硫生物素化的抗体-珠粒-外排体复合物的生物素化的抗体的洗脱。

[0090] 在一些实施方案中,所用的珠粒的体积变化,例如在约50至200 μ l的范围内变化。在一些实施方案中,使用磁性珠粒,例如,Dynabeads 2.7 μ m或4.5 μ m;EXO-Flow (SBI);exoCap (MBL),OceanNano (50 nm-100 nm珠粒)或任何其他合适的市售磁性珠粒。在一些实施方案中,使用树脂、琼脂糖、乳胶或硅珠粒。在一些实施方案中,使用具有蛋白A/G的珠粒。在一些实施方案中,使用具有链霉抗生物素蛋白的珠粒。可以在本文所述的过程中使用用于将抗体化学偶联至珠粒的任何其他合适的手段。

[0091] 在一些实施方案中,在不同的洗涤缓冲液中洗涤珠粒。在一些实施方案中,所述洗涤缓冲液不含BSA。在一些实施方案中,所述洗涤缓冲液含有TBST。

[0092] 在一些实施方案中,抗体的量可以在抗原之间以及在耗竭/富集过程之间变化。在一些实施方案中,用于使捕获表面官能化的抗体的量在2-40 μ g之间的范围中。在一些实施方案中,捕获表面(例如,珠粒)和试剂(例如,抗体)的孵育在约30分钟至最多达约12小时之间的范围中。在一些实施方案中,捕获表面(例如,珠粒)和试剂(例如,抗体)的孵育在旋转或不旋转的情况下进行。在一些实施方案中,捕获表面(例如,珠粒)和试剂(例如,抗体)的孵育在室温下进行。在一些实施方案中,捕获表面(例如,珠粒)和试剂(例如,抗体)的孵育在4 $^{\circ}$ C下进行。

[0093] 在一些实施方案中,在捕获表面(例如,珠粒)和试剂(例如,抗体)的孵育后,官能化的捕获表面用缓冲液洗涤至少一次。在一些实施方案中,官能化的捕获表面洗涤1至8次。在一些实施方案中,官能化的捕获表面用PBS或基于PBS的缓冲液,诸如例如其中并入0.5-7.5% BSA的PBS缓冲液洗涤。在一些实施方案中,官能化的捕获表面用TBST或基于TBST的缓冲液,诸如例如其中并入0.5-7.5% BSA的TBST缓冲液洗涤。

[0094] 在一些实施方案中,所述生物样品是变化的。在一些实施方案中,用于生物样品的起始材料是细胞培养条件培养基、尿液、CSF或任何其他生物流体。在一些实施方案中,在有

或没有样品的预处理的情况下使用起始材料,所述预处理,诸如例如,将样品离心,过滤样品,或将样品用未官能化的珠粒的群体预先澄清,和/或耗竭任何丰富的蛋白。在一些实施方案中,起始材料是通过任何合适的分离方法(诸如例如超速离心(UC)、ExoQuick、exoEasy和超滤、大小排阻色谱法、超滤及其组合)分离的EV的群体。在一些实施方案中,所述起始材料源自任何类型的生物流体。在一些实施方案中,官能化的捕获表面(例如,与抗体偶联的珠粒)和生物样品(例如,生物流体)的孵育在约30分钟至最多达约24小时之间的范围中。在一些实施方案中,官能化的捕获表面(例如,与抗体偶联的珠粒)和生物样品(例如,生物流体)的孵育在有或没有旋转或搅拌的情况下进行。在一些实施方案中,官能化的捕获表面(例如,与抗体偶联的珠粒)和生物样品(例如,生物流体)的孵育在室温下进行。在一些实施方案中,官能化的捕获表面(例如,与抗体偶联的珠粒)和生物样品(例如,生物流体)的孵育在4℃下进行。在一些实施方案中,将抗体或抗体的组合直接添加至血浆或体液中,并且抗体-抗原相互作用在暴露于捕获表面之前发生。然后捕获表面从体液取回抗体-EV复合物。

[0095] 在耗竭过程的一些实施方案中,将转移的上清液进行进一步的分离或其他纯化。在一些实施方案中,所述上清液经历相同或其他靶标抗原的至少第二轮的耗竭。在一些实施方案中,将上清液用作用于任何目标抗原的富集过程的起始材料。在耗竭过程的一些实施方案中,上清液直接用作RNA、蛋白或脂质提取的来源。

[0096] 在富集过程的一些实施方案中,洗涤步骤的数量和模式取决于目标抗原和/或下游应用的灵敏度/特异性而变化。在一些实施方案中,TBST缓冲液的pH可以从约pH 6至约pH 9变化。在一些实施方案中,洗涤缓冲液的tween浓度在约0.1-5%之间的范围中。在一些实施方案中,洗涤缓冲液的NaCl浓度在约150-1000mM的范围中。在一些实施方案中,洗涤缓冲液的tween浓度在约0.1-5%之间的范围中,并且洗涤缓冲液的NaCl浓度在约150-1000mM的范围中。在一些实施方案中,洗涤在不切换管的情况下进行。

[0097] 在一些实施方案中,裂解缓冲液与或不与蛋白酶、磷酸酶或RNA酶抑制剂一起使用。在一些实施方案中,涡旋被超声处理、冻-融循环或任何物理扰动代替。

[0098] 在一些实施方案中,捕获表面用特异性结合或以其他方式靶向特定细胞表面标志物或细胞表面标志物的组合的试剂官能化,所述特定细胞表面标志物或细胞表面标志物的组合对于期望的细胞类型是特异性的或对于源自特定细胞类型的期望的EV的群体是特异性的。

[0099] 下表和图11提供了可以在本文所述的EDDE过程中使用的示例性细胞表面标志物的列表。本领域普通技术人员将理解,该列表不是穷举的,并且本领域已知的任何合适的细胞表面标志物均可用于本文所述的EDDE过程中。本领域普通技术人员还将理解,一些标志物还可用于鉴定与某些生物功能相关的细胞。例如,已知LAMP2是自噬/溶酶体活性的标志物。此类标志物也可用于本文所述的EDDE过程中。

[0100] 表1A.

起源细胞	可能的标志物
免疫细胞	CD138、CD38、CD45、CD70

T-细胞	CD28、CD3、CD4、CD8、CD215
B-细胞	CD19、CD20
NK细胞	CD56、CD10、CD335
单核细胞	CD11、CD123、CD14、CD163、CD33、CD303
内皮细胞	CD62E、CD146、CD71、CD144、CD90、CD309、CD31/PCAM、E-选择素、CD34、VEGFR、CD40L和CD154、VE-钙粘着蛋白、von Willebrand因子、KDR、FLT1
上皮细胞	EpCAM、CD326、CD113、CD118
血小板	CD62、CD61、CD41、CD42、CD140
红细胞	CD235、CD233、CD234、CD236、CD241
神经元细胞	L1CAM、NCAM、DRD5、DRD2、GRIA2、SNAP25、SYP、GluR2
癌细胞	CD44、CD184、PSMA、C-MET、EGFR、CTLA4、PDL1、磷脂酰肌醇聚糖1、EGFR v3、IDH1、PD1
胚胎细胞	SSEA-4、SSEA-3、PODXL、HSPA8、CD324、KSPG
星形胶质细胞	GLAST-1、AQP4、
少突胶质细胞	PLP、O4、MOG
各种细胞类型	GBM43、GBM6、LN18、GBM22、U118MG、GBM10、U128MG、LN229、T98G、LN2308、GBM20/3、Follitin 1、Follitin 2、整联蛋白1 整联蛋白2、LAMP1、FOLR1、EPHA2、TSG101、密蛋白3、HER2、MUC18、CA125、D2-40、CD9、HSP90、CA19-9、CD24

[0101] 表1B.

可用于富集或耗竭的其他标志物				
PECAM1	ALCAM	ICAM2	CD40	HSP70
RETN	C5AR1	IL12RB1	CD40LG	半乳凝素5
S100A8	CD160	IL1R2	CD5	半乳凝素9
SELP	CD163	IL2RA	CD6	热休克70kDa蛋白1-样
ST6GAL1	CD19	ITGA1	CD63	热休克70kDa蛋白4-样
EPCAM	CD1A	ITGA2	CD69	髓样相关分化标志物2
TEK	CD1C	ITGA3	CD7	水通道蛋白-1
TNFRSF4	CD1D	KLRB1	CD70	丝甘蛋白聚糖
TNFRSF8	CD2	KLRC1	CD72	水通道蛋白-4
TPSAB1,TPSB	CD209	KLRD1	CD74	Tweety家族成员1
VCAM1	CD22	KRT18	CD79A	血型糖蛋白A
VWF	CD24	KRT5	CD79B	肽基精氨酸脱亚氨酶, IV型
CD3G	CD244	KRT8	CD80	肽聚糖识别蛋白1
CD4	CD247	MS4A1	CD83	氯通道蛋白2
NOS3	CD28	MYH10	CD86	涎福林蛋白, CD43
NT5E	CD37	MYH9	CD8A	A-125 (MUC-16)或CA19-9
NCAM1	CD38	MYOCD	CD8B	HER2/neu
CD96	CD3D	A-125 (MUC-16)	CA19-9	N-CAM
CA125	ITGB1	ITGB2	多糖	任何CD标志物
直链淀粉 蛋白聚糖	支链淀粉 寡糖	纤维素 糖蛋白	脂多糖 糖脂	糖胺聚糖 凝集素

[0102] 在一些实施方案中,本公开提供了用于在耗竭过程之后从生物样品分离EV的方法,其中基于一种或多种细胞表面标志物的表达或其缺乏从生物样品耗竭不相关的EV。

[0103] 在一些实施方案中,本公开提供了用于使用耗竭过程从生物样品分离外排体的方法,其中基于一种或多种细胞表面标志物的表达或其缺乏从生物样品排除不相关的外排体。在一些实施方案中,一种或多种细胞表面标志物选自HSP70、半乳凝素5、半乳凝素9、热休克70kDa蛋白1-样、热休克70kDa蛋白4-样、髓样相关分化标志物2、水通道蛋白-1、丝甘蛋白聚糖、水通道蛋白-4、Tweety家族成员1、血型糖蛋白A、肽基精氨酸脱亚氨酶、IV型、肽聚糖识别蛋白1、氯通道蛋白2、涎福林蛋白、CD43及其任何组合。在一些实施方案中,排除策略使用两种或更多种细胞表面标志物,例如三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、六种或更多种、七种或更多种、八种或更多种、九种或更多种和/或十种或更多种细胞表面标志物。

[0104] 在一个实施方案中,本公开还提供了用于使用耗竭过程有效富集癌症特异性外排体特征的方法。在一些实施方案中,本公开还提供了用于有效富集GluR2生物标志物用于预测神经退行性疾病的风险、鉴定对于神经退行性疾病最有用的药物靶标或监测神经退行性疾病的进展和对其疗法的应答的方法。在一些实施方案中,用于富集GluR2生物标志物的方法不涉及耗竭过程。

[0105] 在一个实施方案中,提供了基于其表面抗原装饰来鉴定和分离或获得血浆样品中的神经元起源的细胞外囊泡且然后测定神经元来源的EV的蛋白和RNA货物用于神经退行性疾病、病症或病况的鉴定或预后的方法。所述方法可以包括早期检测受试者的神经退行性

病症的风险,患者分层用于临床登记或预测治疗应答。所述测定包括基于在外排体表面上的神经元标志物GluR2的存在来富集神经元来源的外排体(NDE),且然后测量由特定蛋白(包括 α -突触核蛋白、Tau、磷酸化的Tau、泛素化的蛋白和突触蛋白)以及不同疾病相关基因的mRNA组成的不同组的生物标志物。所述方法可以基于对与GluR2装饰的外排体相关的一种或多种生物标志物的水平的评价。在一些实施方案中,所有RNA的水平可以通过RNAseq或任何其他转录组方法测定。在其他实施方案中,可以通过不同的组学方法(包括质谱和抗体阵列)表征GluR2装饰的外排体的蛋白或脂质货物。

[0106] 在一些实施方案中,GluR2装饰的外排体可以从不同的生物流体(包括血清、血浆、尿液、间质液、腹膜液、宫颈拭子、泪液、唾液、颊拭子和脑脊液)富集。在还有其他实施方案中,总体、作为聚集体形式或作为聚集体:单体比率测量 α -突触核蛋白。可以在GluR2装饰的外排体中测量 α -突触核蛋白或其他疾病相关蛋白的翻译后修饰,包括但不限于磷酸化和泛素化。在进一步实施方案中,所述方法定量单独或与任何货物组合的作为生物标志物本身的分离的GluR2装饰的囊泡的数量。在其他实施方案中,GluR2装饰的囊泡从任何体液中存在的膜囊泡(包括但不限于外排体、微粒、微囊泡、纳米体、细胞外囊泡和核外颗粒)的一般群体富集。

[0107] 在一个实施方案中,本发明提供了用于从生物流体(诸如例如血浆、血清、尿液、唾液、精液和/或CSF)分离细胞外囊泡(包括例如外排体和微囊泡)的亚组以提供特定蛋白RNA、脂质、代谢物和碳水化合物(例如凝集素)的下游检测的方法。

[0108] 在一些实施方案中,本公开还提供了使用基于细胞表面标志物GluR2的表达的富集过程有效富集神经元来源的外排体(NDE)的一个或多个亚群的方法。

[0109] 在一些实施方案中,神经元外排体富集过程包括首先除去在试剂和来自非神经元生物样品的一种或多种表面标志物之间形成的复合物,并保留生物样品的未结合部分用于分析。

[0110] 在一些实施方案中,在耗竭过程之后,在足以将生物样品的未结合部分中的EV的至少一部分保留在捕获表面上或捕获表面中的条件下,使生物样品的未结合部分与捕获表面接触。

[0111] 在一些实施方案中,当初始进行耗竭过程时,在耗竭过程之后进行富集过程。在其他实施方案中,所述富集过程包括保留捕获的在试剂和来自生物样品的至少一种细胞表面标志物之间形成的复合物。

[0112] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括针对生物样品中的至少一种生物标志物,从EV提取一种或多种核酸、蛋白、脂质或代谢物。

[0113] 在一些实施方案中,本文公开的方法进一步包括从EV提取一种或多种核酸作为生物标志物的步骤。可以在大小范围为约10 nm直径至约10000 nm直径的较小囊泡中发现核酸。例如,“外排体”具有近似30至200 nm的直径,其中脱落的微囊泡和凋亡体经常被描述为较大。外排体、脱落的微囊泡、微粒、纳米囊泡、凋亡体、纳米颗粒和膜囊泡使用各种技术共同分离。使用本文所述的各种方法和技术,其他含有核酸的材料,诸如RNA-蛋白复合物,可以与细胞和微囊泡共同分离。

[0114] 在一些实施方案中,所述生物样品选自血液、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流体、泪液、唾液、母乳、来

自淋巴系统的流体、精液、脑脊液、器官内系统流体、腹水、肿瘤囊肿液、羊水及其组合。在一些实施方案中,所述体液是尿液、血液、血浆、血清或脑脊液。在一些实施方案中,生物样品是血浆或血清。

[0115] 在一些实施方案中,对于GluR2特异性的试剂对于选自以下的细胞类型是特异性的:细胞,诸如神经元细胞,周围神经细胞,中枢神经细胞,神经系统支持细胞,诸如内皮细胞,胶质细胞,免疫细胞,少突胶质细胞,结缔组织来源的细胞。

[0116] 在一些实施方案中,所述富集过程包括洗涤已经与生物样品接触的官能化的捕获表面。

[0117] 在一些实施方案中,提取的核酸是RNA或RNA种类。

[0118] 在一些实施方案中,将提取的核酸进行下游分析,例如,以测量表达水平和/或将表达水平与预定义阈值比较。例如,至少一种生物标志物(即 - 一种或多种),诸如一组基因,可以通过分析针对预期临床效用的严格纳入和排除标准而获得的临床样品而鉴定为特征。在每个样品的基础上,可以通过进行统计分类分析(包括但不限于随机森林、逻辑回归和神经网络)来推导连续或离散评分。在该评分上,定义阈值,所述阈值以可接受的临床特异性和灵敏度将用于临床效用的预期样品组分开。

[0119] 在一些实施方案中,官能化的捕获表面包括一个或多个膜、芯片、纳米颗粒或纳米颗粒的群体、纳米管或纳米管的群体、载片、色谱介质及其任何组合。

[0120] 在一些实施方案中,官能化的捕获表面包括珠粒的群体或珠粒的群体的混合物。在一些实施方案中,所述珠粒是磁性珠粒。在一些实施方案中,所述珠粒是琼脂糖珠粒。在一些实施方案中,所述珠粒是硅珠粒。

[0121] 在一些实施方案中,在EV的表面上存在至少一种细胞表面标志物,或从EV内提取至少一种生物标志物。在一些实施方案中,对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括抗体或抗体的混合物。在一些实施方案中,对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂包括肽或任何其他受体配体。

[0122] 在一个实施方案中,通过常规方法如生物素-链霉抗生物素蛋白相互作用或强共价相互作用将抗体与珠粒或其他刚性表面偶联。抗体-表面复合物暴露于血浆样品、其他生物燃料或从这些流体分离的外排体。然后,将珠粒-表面-外排体复合物基于物理分离或离心分离,并洗涤,直至获得期望的信噪比。

[0123] 在一些实施方案中,可以在EV分离和/或核酸提取之前将对照颗粒添加至样品中,以充当内部对照以评估EV纯化和/或蛋白和核酸提取的效率或质量。本文所述的方法提供有效的分离和对照颗粒连同EV级分。

[0124] 这些对照颗粒包括Q-β噬菌体、病毒颗粒或任何其他颗粒,其含有对照蛋白和核酸(例如,至少一种对照靶标基因或蛋白),其可以是天然存在的,或通过重组DNA技术或通过脂质体囊泡封装技术工程改造,诸如工程改造为至少一种表面蛋白和至少一种对照靶标核酸或至少一种对照靶标蛋白封装在脂质体囊泡内。在一些实施方案中,对照颗粒的量在添加至样品之前是已知的。对照靶标基因或对照靶标蛋白可以使用实时PCR、ELISA或Western印迹分析进行定量。

[0125] 对照靶标基因或对照靶标蛋白的定量可用于确定EV纯化、蛋白或核酸提取过程的效率或质量。

[0126] 在一些实施方案中,本文描述的方法和试剂盒包括一种或多种过程中对照。在一些实施方案中,过程中对照是检测和分析指示血浆质量(即血浆样品的质量的指标)的参考基因。在一些实施方案中,所述参考基因是血浆固有转录物。在一些实施方案中,所述参考基因通过额外的qPCR分析。在一些实施方案中,过程中对照是检测和分析细胞外囊泡蛋白。所述参考蛋白通过额外的ELISA或Western印迹分析。

[0127] 在一些实施方案中,对于至少一种细胞表面标志物特异性的试剂对于选自以下的细胞类型是特异性的:免疫细胞、T-细胞、B-细胞、NK细胞、单核细胞、内皮细胞、上皮细胞、血小板、红细胞、神经元细胞、癌细胞、胚胎细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞及其任何组合。

[0128] 在一些实施方案中,在使生物样品与官能化的捕获表面接触之前对生物样品进行预处理。

[0129] 在一些实施方案中,本文描述的核酸包括DNA或RNA。RNA的实例包括信使RNA、长非编码RNA、转移RNA、核糖体RNA、小RNA(非蛋白编码RNA、非信使RNA)、微RNA、piRNA、snRNA、snoRNA和Y-RNA。在一些实施方案中,核酸分离自或以其他方式衍生自EV或EV的一个或多个亚群。在一些实施方案中,所述核酸是无细胞核酸,在本文中也称为循环核酸。在一些实施方案中,所述无细胞核酸是DNA或RNA。

[0130] 如本文所用,术语“核酸”是指DNA和RNA,除非另有指定。核酸可以是单链的或双链的。在一些情况下,核酸是DNA。在一些情况下,核酸是RNA。RNA包括但不限于信使RNA、转移RNA、核糖体RNA、非编码RNA、微RNA和HERV元件。

[0131] 在一些实施方案中,所述捕获表面是带正电荷的。在另一个实施方案中,所述捕获表面是带负电荷的。在又一个实施方案中,所述捕获表面是中性的。在一些实施方案中,所述捕获表面用分子诸如肝素或硫酸肝素蛋白聚糖官能化。

[0132] *用于神经元外排体富集的GluR2细胞表面标志物*

在一个实施方案中,本公开提供了用于从生物样品分离EV的亚群的方法,其包括以下步骤:(a)提供来自人受试者的生物样品;(b)产生官能化的捕获表面,其中所述捕获表面用对于GluR2蛋白特异性的试剂进行官能化;(c)在足以在官能化的捕获表面和生物样品中的GluR2之间形成复合物的条件下,使来自人受试者的生物样品与官能化的捕获表面接触;(d)将在官能化的捕获表面和GluR2之间形成的复合物与生物样品的未结合部分分离以获得捕获的复合物,和保留捕获的复合物用于富集过程;(e)通过本文公开的富集过程从生物样品纯化EV的亚群;和任选地(f)从纯化的EV的亚群提取一种或多种生物标志物核酸、蛋白、碳水化合物或脂质。

[0133] 在一个实施方案中,用于富集外排体的方法基于细胞表面标志物诸如GluR2的存在。在一些实施方案中,从0.1-3 ml本文所述的血浆样品或其他体液分离外排体。

[0134] 在其他实施方案中,分离的神经元富集的外排体用于测量蛋白、蛋白聚集体、蛋白复合物和/或蛋白修饰。在其他实施方案中,分离的神经元富集的外排体用于RNA测量。在其他实施方案中,从健康或疾病样品直接分离神经元富集的外排体和/或分离它们的蛋白和RNA货物。在其他实施方案中,神经元富集的外排体直接和/或它们的蛋白和RNA货物用于鉴定神经退行性疾病/病症/病况风险、治疗应答或分层。

[0135] 在一些实施方案中,本公开还提供了使用EV RNA特征来监测治疗效力和/或预测

治疗效力的方法。在一些实施方案中,所述方法用于纵向监测治疗效力。

[0136] 如本文所用,术语“生物样品”是指含有生物材料诸如DNA、RNA、脂质、碳水化合物、代谢物和蛋白的样品。

[0137] 在任何EDDE过程中使用的体液的合适的样品体积例如在约0.1 ml至约30 ml流体的范围内。流体的体积可以取决于一些因素,例如,使用的流体的类型。例如,血清样品的体积可以是约0.1 ml至约4 ml,优选约0.2 ml至4 ml。血浆样品的体积可以是约0.1 ml至约4 ml,优选0.5ml至4 ml。尿液样品的体积可以是约2 ml至约30 ml,例如约10 ml至约30 ml,优选约20 ml。

[0138] 尽管本文提供的实例使用血浆样品,但技术人员将认识到这些方法适用于各种生物样品。其他合适的生物样品包括尿液、脑脊液,血液,包括血液组分,例如血浆和血清,痰液,胸膜液,乳头抽吸液,淋巴液,呼吸道、肠道和泌尿生殖道的流体,泪液,唾液,母乳,来自淋巴系统的流体,精液,器官内系统流体,腹水,肿瘤囊肿液,羊水,细胞培养上清液及其组合。

[0139] 本公开的方法和试剂盒适用于与源自人受试者的样品一起使用。本公开的方法和试剂盒适用于与源自人受试者的样品一起使用。此外,本公开的方法和试剂盒也适用于与源自人受试者的样品一起使用。本公开的方法和试剂盒适用于与源自非人受试者(诸如例如啮齿动物、非人灵长类动物、伴侣动物(例如猫、狗、马)和/或农场动物(例如鸡))的样品一起使用。

[0140] 术语“受试者”旨在包括被显示或预期具有含有核酸的颗粒的所有动物。在具体实施方案中,所述受试者是哺乳动物、人或非人灵长类动物、狗、猫、马、牛、其他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可观察到的异常(例如疾病)的正常人。人受试者可以是具有可观察到的异常(例如疾病)的人。可观察到的异常可以由人类本身或由医护人员观察到。术语“受试者”、“患者”和“个体”在本文可互换使用。

[0141] 方法

根据本文提供的方法,各种各样的表面能够捕获EV。尽管本文提供的工作实施例使用珠粒作为捕获表面,但应当理解,捕获表面的形式,例如板、管、膜或其他过滤器,不影响本文提供的方法从生物样品有效捕获EV的能力。

[0142] 在一些实施方案中,所述捕获表面是膜。在一些实施方案中,所述捕获表面是塑料或玻璃。例如,板或载片的底部。在一些实施方案中,所述捕获表面是管。在一些实施方案中,所述捕获表面是珠粒。例如,所述珠粒是磁性的。或者,所述珠粒是非磁性的。在又一个实施方案中,所述珠粒用亲和配体官能化。

[0143] 本公开还描述了使用一次性塑料部分和离心设备从生物或临床样品分离和浓缩EV的装置。例如,该装置包括包含捕获表面(即膜过滤器)的柱、将捕获表面固定在外玻璃料和内部管之间的夹具以及收集管。外部玻璃料包含允许液体通过的大型网状结构,且优选在柱的一端。内部管将捕获表面固定在适当位置,且优选是略微圆锥形的。收集管可以是市售的,即50ml Falcon管。所述柱优选适合于旋转,即,大小与标准离心机和微型离心机相容。

[0144] 在其中捕获表面为膜的实施方案中,用于从生物样品分离EV级分的装置含有至少一个膜。在一些实施方案中,该装置包括一、二、三、四、五或六个膜。在一些实施方案中,该

装置包括三个膜。在其中该装置包括多于一个膜的实施方案中,所述膜全部在柱的一端彼此直接相邻。在其中该装置包括多于一个膜的实施方案中,膜都是彼此相同的,即具有相同的电荷和/或具有相同的官能团。

[0145] 应当注意的是,通过比EV更小的孔径过滤捕获并不是通过本文提供的方法的主要捕获机制。然而,过滤器孔径不过是非常重要的,例如因为mRNA变得卡在20 nm过滤器上,并且无法被回收,而微RNA可以容易被洗脱掉,且例如因为过滤器孔径是可用表面捕获区域中的重要参数。

[0146] 本文提供的方法使用各种捕获表面中的任一种。在一些实施方案中,捕获表面是膜,本文中也称为过滤器或膜过滤器。在一些实施方案中,捕获表面是市售的膜。在一些实施方案中,捕获表面是带电荷的市售膜。在一些实施方案中,捕获表面是中性的。在一些实施方案中,捕获表面选自来自PALL Corporation的Mustang®离子交换膜;来自Sartorius AG的Vivapure® Q膜;Sartobind Q或Vivapure® Q Maxi H;来自Sartorius AG的Sartobind® D;来自Sartorius AG的Sartobind (S);来自Sartorius AG的Sartobind® Q;来自Sartorius AG的Sartobind® IDA;来自Sartorius AG的Sartobind® Aldehyde;来自Sigma的Whatman® DE81;来自EMD Millipore的快速捕获病毒纯化柱;Thermo Scientific* Pierce强阳离子和阴离子交换旋转柱。

[0147] 在其中捕获表面带电荷的实施方案中,捕获表面可以是选自以下的带电荷过滤器:0.65um带正电荷的Q PES真空过滤器(Millipore)、3-5um带正电荷的Q RC旋转柱过滤器(Sartorius)、0.8um带正电荷的Q PES自制旋转柱过滤器(Pall)、0.8um带正电荷的Q PES注射器过滤器(Pall)、0.8um带负电荷的S PES自制旋转柱过滤器(Pall)、0.8um带负电荷的S PES注射器过滤器(Pall)和50 nm带负电荷的尼龙注射器过滤器(Sterlitech)。优选地,带电荷的过滤器不容纳在注射过滤装置中,因为在这些实施方案中,QIAzol/RNA更难从过滤器除去。优选地,带电荷过滤器容纳于柱的一端。

[0148] 在其中捕获表面为膜的实施方案中,所述膜可以由各种合适的材料制成。在一些实施方案中,所述膜是聚醚砜(PES)(例如,来自Millipore或PALL Corp.)。在一些实施方案中,所述膜是再生纤维素(RC)(例如,来自Sartorius或Pierce)。

[0149] 在一些实施方案中,捕获表面是带正电荷的膜。在一些实施方案中,捕获表面是Q膜,其为带正电荷的膜,并且是具有季胺的阴离子交换器。例如,Q膜被季铵盐 $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$ 官能化。在一些实施方案中,捕获表面是带负电荷的膜。在一些实施方案中,捕获表面是S膜,其为带负电荷的膜,并且是具有磺酸基的阳离子交换器。例如,S膜被磺酸 $R-CH_2-SO_3^-$ 官能化。在一些实施方案中,捕获表面是D膜,其为具有二乙胺基 $R-CH_2-NH^+(C_2H_5)_2$ 的弱碱性阴离子交换器。在一些实施方案中,捕获表面是金属螯合膜。例如,该膜是用氨基二乙酸 $-N(CH_2COOH)_2$ 官能化的IDA膜。在一些实施方案中,捕获表面是用醛基 $-CHO$ 官能化的微孔膜。在其他实施方案中,该膜是具有二乙基氨基乙基(DEAE)纤维素的弱碱性阴离子交换器。并不是所有带电荷膜都适用于本文提供的方法,例如,使用Sartorius Vivapure S膜旋转柱分离的RNA显示RT-qPCR抑制作用,且因此不适合用于PCR相关的下游检测。另外,某些膜在用于蛋白检测的下游免疫测定中生成假阳性。

[0150] 在其中捕获表面带电荷的实施方案中,EV可以用带正电荷的过滤器分离。

[0151] 在其中捕获表面带电荷的实施方案中,EV捕获期间的pH为 $pH \leq 7$ 。在一些实施方案

中,pH大于4并且小于或等于8。

[0152] 根据膜材料,膜的孔径范围为3 μ m至20 nm。

[0153] 捕获表面的表面电荷可以是正的,负的,或中性的。在一些实施方案中,捕获表面是一个或多个带正电荷的珠粒。

[0154] 本文提供的方法包括裂解试剂。在一些实施方案中,用于膜上裂解的试剂是基于苯酚的试剂。在一些实施方案中,所述裂解试剂是基于胍的试剂。在一些实施方案中,所述裂解试剂是具有或不具有去污剂的基于高盐的缓冲液。在一些实施方案中,所述裂解试剂是去污剂。在一些实施方案中,所述裂解试剂是QIAzol。在一些实施方案中,所述裂解试剂是M-PER或RIPA缓冲液。

[0155] 在一些实施方案中,所述方法包括一个或多个洗涤步骤,例如,在将生物样品与捕获表面接触之后。在一些实施方案中,将去污剂添加至洗涤缓冲液中,以便于除去非特异性结合(即污染物、细胞碎片和循环蛋白复合物或核酸),以获得更纯的EV级分。适用于使用的去污剂包括但不限于十二烷基硫酸钠(SDS)、Tween-20、Tween-80、Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40)、Brij-35、Brij-58、辛基葡萄糖苷、辛基硫代葡萄糖苷、CHAP或CHAPSO。

[0156] 在一些实施方案中,捕获表面,例如膜,被容纳于用于离心的装置内,例如,旋转柱,或用于真空系统的装置中,例如真空过滤器夹具,或用于压力过滤的装置内,例如注射器过滤器。在一个优选实施方案中,捕获表面被容纳于旋转柱或真空系统中。

[0157] 在一些实施方案中,将捕获表面、例如珠粒置于不同大小的管中,并且该程序可以在旋转或不旋转的情况下进行。珠粒或捕获材料通过磁体或离心分离。

[0158] 由于以下原因,提取核酸前从生物样品分离EV是有利的:(1)从EV提取核酸提供了选择性分析通过从流体样品内的其他EV分离疾病或肿瘤特异性EV获得的疾病或肿瘤特异性核酸的机会;(2)与通过从流体样品直接提取核酸而不首先分离EV而获得的产率/完整性相比,含有核酸的EV以更高完整性产生显著更高的核酸种类的产率;(3)可扩展性,例如,为了检测以低水平表达的核酸,可以通过使用本文所述的方法从较大体积的样品浓缩EV来增加灵敏度;(4)提取的核酸的纯度更高或质量/完整性更高,因为在核酸提取步骤之前排除生物样品内天然发现的蛋白、脂质、细胞碎片、细胞和其他潜在污染物以及PCR抑制剂;和5)可以利用在核酸提取方法中的更多的选择,因为分离的EV级分的体积小于起始样品体积,使得可能使用小体积柱过滤器从这些级分或沉淀提取核酸。

[0159] 由于以下原因,在提取蛋白或代谢物之前从生物样品分离EV是有利的:1)从群体特异性EV提取蛋白或核酸可以揭示其起源细胞的变化并且代表癌症、神经退行性疾病和其他病况中发生的改变,使其成为准确和特异性的生物标志物。2)群体特异性的EV的分离将期望的生物标志物(核酸、脂质或蛋白)与体液中的最丰富的蛋白、核酸和脂质中的一些分离。具体地,这将EV特异性蛋白与血浆中的白蛋白以及尿液中的tamm-horsfall和白蛋白分离,改进下游免疫测定和RNA概况分析测定的灵敏度。3) EV的分离除去抗体-抗原相互作用的抑制剂,改进蛋白的检测。4) EV的分离允许增加起始样品体积。浓缩的EV相关蛋白增加罕见疾病相关蛋白的信号。

[0160] 由于以下原因,在提取蛋白、核酸或代谢物之前,基于其表面蛋白从生物样品分离EV的亚群是有利的:1)选择源自特定起源细胞或组织的EV更好地反映其细胞来源的mRNA和蛋白表达。例如,癌症EV的分离可以揭示癌症中特定发生的变化,神经元EV的分离为脑内发

生的变化打开窗户。2) EV的亚群的分离可以增加任何蛋白或核酸生物标志物的灵敏度,因为其除去来自从身体中所有组织和细胞分泌的与疾病信号有关的微囊泡、蛋白和RNA的信号。3) EV的亚群的选择也可以增加对某些细胞过程的特异性,例如,在其表面上含有LAMP2的EV的分离反映溶酶体功能,而含有VDAC的EV则反映线粒体功能。本领域中已描述了从生物样品分离EV的几种方法。例如,Raposo等人的论文(Raposo等人, 1996), Skog等人的论文(Skog等人, 2008)和Nilsson等人的论文(Nilsson等人, 2009)中描述了差速离心的方法。美国专利号6,899,863和6,812,023中描述了离子交换和/或凝胶渗透色谱的方法。美国专利号7,198,923中描述了蔗糖密度梯度或细胞器电泳的方法。Taylor和Gercel Taylor的论文(Taylor和Gercel-Taylor, 2008)中描述了磁性活化细胞分选(MACS)的方法。Cheruvanky等人的论文(Cheruvanky等人, 2007)中描述了纳米膜超滤浓缩的方法。Miranda等人的出版物(Miranda等人, 2010)中描述了Percoll梯度分离的方法。此外,EV可以通过微流体装置从受试者的体液鉴定和分离(Chen等人, 2010)。在核酸生物标志物的研究和开发以及商业应用中,期望以一致、可靠和实用的方式从生物样品提取高质量核酸。

[0161] 在一些实施方案中,在本文所述的富集或耗竭方法之前,对生物样品进行预处理。在一些实施方案中,在分离和提取本文公开的至少一种生物标志物之前,对样品进行预处理。在一些实施方案中,在分离和提取本文公开的至少一种生物标志物之前,没有对样品进行预处理。在一些实施方案中,在从生物样品分离和提取核酸(例如DNA和/或DNA和RNA)之前,没有对样品进行预处理。

[0162] 在一些实施方案中,在进行EV的分离、纯化、富集或耗竭之前,对样品进行预处理步骤,以除去生物样品中存在的大的不想要的颗粒、细胞和/或细胞碎片和其他污染物。预处理步骤可以通过一个或多个离心步骤(例如,差速离心)或一个或多个过滤步骤(例如,超滤)或其组合来实现。在进行多于一个离心预处理步骤的情况下,生物样品可以首先以较低的速度离心,且然后以较高的速度离心。如果期望,可以实施进一步合适的离心预处理步骤。或者,除了一个或多个离心预处理步骤之外,也可以过滤生物样品。例如,生物样品可以首先以20000g离心1小时,以除去大的不想要的颗粒;然后可以过滤样品,例如,通过0.8 μ m过滤器进行过滤。在一些实施方案中,对具有EDDE空白-耗竭的生物流体进行预澄清步骤。

[0163] 在一些实施方案中,将样品预过滤以排除大于0.8 μ m的颗粒。在一些实施方案中,样品包括添加剂诸如EDTA、柠檬酸钠和/或柠檬酸盐-磷酸盐-右旋糖。

[0164] 在一些实施方案中,在使生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个离心步骤,以分离EV并浓缩从生物级分分离的EV。例如,将样品在4 $^{\circ}$ C下以20,000 g离心1小时。为了除去大的不想要的颗粒、细胞和/或细胞碎片,可以将样品以约100-500g、优选约250-300g的低速离心。可替代地或另外,所述样品可以以更高速度离心。合适的离心速度最高达约200,000g;例如,约2,000g至小于约200,000g。高于约15,000g且小于约200,000g或高于约15,000g且小于约100,000g或高于约15,000g且小于约50,000g的速度是优选的。约18,000g至约40,000g或约30,000g;和约18,000g至约25,000g的速度是更优选的。特别优选的是约20,000g的离心速度。通常,离心的合适时间是约5分钟至约2小时,例如约10分钟至约1.5小时,或更优选约15分钟至约1小时。约0.5小时的时间可以是优选的。有时优选使生物样品进行以约20,000g离心约0.5小时。然而,上述速度和时间可以合适地以任何组合(例如,约18,000g至约25,000g,或约30,000g至约40,000g,持续约10分钟至约1.5小时,或约15

分钟至约1小时,或约0.5小时,等等)使用。一个或多个离心步骤可以在低于环境温度实施,例如在约0-10℃、优选约1-5℃、例如约3℃或约4℃实施。在一些实施方案中,这些超速离心步骤在EDDE之前进行。在其他实施方案中,这些步骤可以在EDDE耗竭之后进行。

[0165] 在一些实施方案中,在使生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个过滤步骤。例如,可以采用大小在约0.1至约1.0 μm 范围内(优选,约0.8 μm 或0.22 μm)的过滤器。还可以使用孔隙率渐降的过滤器用连续过滤进行。

[0166] 在一些实施方案中,在使生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个浓缩步骤,以减少待在色谱阶段期间处理的样品的体积。浓缩可通过以高速(例如10000至100000g)离心样品,以引起EV的沉降。这可以由一系列差速离心组成。所获得的沉淀中的EV可以用较小的体积且在合适的缓冲液中重构用于该过程的后续步骤。浓缩步骤也可以通过超滤进行。事实上,这种超滤既浓缩生物样品,又进行EV级分的额外纯化。在另一个实施方案中,过滤是超滤,优选切向流超滤。切向流超滤由以下组成:在由确定截止阈值的膜分隔的两个隔室(滤出液和保留液)之间浓缩和分级分离溶液。分离通过在保留液隔室中施加流动和在该隔室和滤出液隔室之间施加跨膜压力来实施。不同的系统可以用来进行超滤,诸如螺旋膜(Millipore, Amicon)、扁平膜或中空纤维(Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor)。在本发明的范围内,使用截止阈值低于1000 kDa、优选在100 kDa和1000 kDa之间或者甚至更优选在100 kDa和600 kDa之间的膜是有利的。在一些实施方案中,这些步骤在EDDE之前进行。在一些实施方案中,对EDDE耗竭上清液进行这些步骤。

[0167] 在一些实施方案中,在使生物样品与捕获表面接触之前或之后进行一个或多个大小排除色谱步骤或凝胶渗透色谱步骤。为了进行凝胶渗透色谱步骤,优选使用选自二氧化硅、丙烯酰胺、琼脂糖、葡聚糖、乙二醇-甲基丙烯酸酯共聚物或其混合物(例如琼脂糖-葡聚糖混合物)的支持物。例如,此类支持物包括但不限于: SUPERDEX[®] 200HR (Pharmacia)、TSK G6000 (TosoHaas) 或 SEPHACRYL[®] S (Pharmacia)。在一些实施方案中,这些步骤在EDDE之前进行。在一些实施方案中,对EDDE耗竭上清液进行这些步骤。

[0168] 任选地,在EV分离或核酸提取之前,可以将对照颗粒添加至样品中,以充当内部对照,以评估EV纯化和/或核酸提取的效率或质量。在一些实施方案中,对照颗粒是Q- β 噬菌体,本文中被称为“Q- β 颗粒”。本文描述的方法中使用的Q- β 颗粒可以是天然存在的病毒颗粒,或者可以是重组或工程改造的病毒,其中病毒颗粒的至少一种组分(例如,基因组或外壳蛋白的一部分)通过本领域已知的重组DNA或分子生物学技术合成。Q- β 是光滑病毒科的一个成员,其特征在于线性的单链RNA基因组,其由3种编码四种病毒蛋白的基因组成:外壳蛋白、成熟蛋白、裂解蛋白和RNA复制酶。由于Q- β 的大小类似于一般的EV,因此可以容易地使用如本文所述的用于分离EV的相同纯化方法从生物样品纯化Q- β 。此外,Q- β 病毒单链基因结构的低复杂度有利于其用作基于扩增的核酸测定中的对照。Q- β 颗粒含有对照靶标基因或对照靶标序列,其待检测或测量用于定量样品中的Q- β 颗粒的量。例如,对照靶标基因是Q- β 外壳蛋白基因。在向生物样品中添加Q- β 颗粒后,使用本文所述的提取方法,将来自Q- β 颗粒的核酸与来自生物样品的核酸一起提取。Q- β 对照靶标基因的检测可以通过RT-PCR分析测定,例如,与目标生物标志物同时测定。对照靶标基因的10倍稀释物的至少2、3或4种已知浓度的标准曲线可以用来测定拷贝数。可以比较检测到的拷贝数和添加的Q- β 颗粒的数量以检测分离和/或提取过程的质量。

[0169] 在一个优选实施方案中,在核酸提取之前,将Q-β颗粒添加至尿液样品中。例如,在超滤之前和/或预过滤步骤之后,将Q-β颗粒添加至尿液样品中。

[0170] 在一些实施方案中,将50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、1000或5000个拷贝的Q-β颗粒添加至体液样品中。在一个优选实施方案中,将100个拷贝的Q-β颗粒添加至体液样品中。可以基于Q-β噬菌体感染靶标细胞的能力来计算Q-β颗粒的拷贝数。因此,Q-β颗粒的拷贝数与Q-β噬菌体的菌落形成单位有关。

[0171] 核酸生物标志物的检测

在一些实施方案中,提取的核酸包括DNA和/或DNA和RNA。在其中提取的核酸包括DNA和RNA的实施方案中,在进一步扩增之前,RNA优选被逆转录成互补DNA(cDNA)。这种逆转录可以单独进行,或者可以与扩增步骤组合进行。组合逆转录和扩增步骤的方法的一个实例是逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR),其可以进一步改良为定量的,例如,如美国专利号5,639,606(其对于其教导通过引用并入本文)中所述的定量RT-PCR。该方法的另一个实例包括两个分开的步骤:第一步是逆转录以将RNA转化为cDNA,且第二步是使用定量PCR定量cDNA的量。如下面的实例中所示,使用本公开的方法从含有核酸的颗粒提取的RNA包括多种转录物,包括但不限于核糖体18S和28S rRNA、微RNA、转移RNA、与疾病或医学状况相关的转录物,以及对于医学状况的诊断、预后和监测重要的生物标志物。

[0172] 例如,RT-PCR分析测定每个反应的Ct(循环阈值)值。在RT-PCR中,通过累积荧光信号来检测阳性反应。Ct值被定义为荧光信号超越阈值(即超过背景水平)所需的循环数。Ct水平与样品中靶标核酸或对照核酸的量成反比(即Ct水平越低,样品中的对照核酸的量越大)。

[0173] 在另一个实施方案中,对照核酸的拷贝数可以使用各种本领域公认技术(包括但不限于RT-PCR)中的任一种来测量。可以使用本领域已知的方法,诸如通过产生和利用校准或标准曲线,来测定对照核酸的拷贝数。

[0174] 在一些实施方案中,一种或多种生物标志物可以是基因畸变之一或集合,其在本文中用于指含有核酸的颗粒内的核酸量以及核酸变体。具体地,基因畸变包括但不限于基因(例如癌基因)或一组基因的过表达、基因(例如肿瘤抑制基因,诸如p53或RB)或一组基因的表达不足、基因或一组基因的剪接变体的可选产生,基因或一组基因的的基因拷贝数变体(CNV)(例如,DNA双微体)(Hahn,1993)、核酸修饰(例如甲基化、乙酰化和磷酸化)、单核苷酸多态性(SNP)、染色体重排(例如倒置、缺失和重复)和突变(插入、缺失、重复、错义、无义、同义或任何其他核苷酸改变),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,或上述中任一种的组合。

[0175] 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,用本领域已知的方法(下文所述)测量分离的颗粒内的特定目标核酸的量(表达水平)(相对的或绝对的)。对于定性分析,用本领域已知的方法鉴定分离的EV内的特定目标核酸的种类(野生型或变体)。

[0176] 本发明还包括从生物样品分离EV以便从中提取高质量核酸的新方法的各种用途,其用于(i)辅助受试者的诊断,(ii)监测受试者中的疾病或其他医学状况的进展或复发,或(iii)辅助评估对于正经历或预期针对疾病或其他医学状况的治疗的受试者的治疗效果;其中,确定由本方法获得的核酸提取物中的一种或多种生物标志物的存在或不存在,并且

所述一种或多种生物标志物分别与疾病或其他医学状况的诊断、进展或复发或治疗效力相关。

[0177] 用于从生物样品分离EV的试剂盒

本发明的一个方面进一步涉及用于本文公开的方法中的试剂盒。该试剂盒包括足以将来自生物样品的EV与同样存在于生物样品中的不想要的颗粒、碎片和小分子分离的捕获表面设备。本发明还任选地包括用于在分离和任选随后的核酸提取过程中使用前述试剂的说明书。在另一个方面,所述试剂盒包含足以分离含有表面标志物G1uR2的EV的亚群的捕获表面设备,其用于将EV与生物样品中存在的不想要的颗粒、碎片和小分子分离。本发明还任选地包括用于在分离和任选随后的核酸提取过程中使用上述试剂的说明书。

[0178] 本发明通过以下实施例进一步举例说明,所述实施例不应被解释为限制性的。在整个本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图,出于所有目的以其整体通过引用并入本文。

实施例

[0179] 尽管本文提供的实施例使用用于离心和/或过滤目的的各种膜和装置,但应理解,这些方法可以与允许有效捕获EV和释放其中含有的核酸、特别是RNA的任何捕获表面和/或容纳装置一起使用。

[0180] 实施例1:EDDE过程及其用途

如通篇所述,本文提供的过程允许用户选择抗体的不同选择用于分离EV的特定亚群。该过程适用于测量蛋白、蛋白修饰、糖、脂质、RNA、DNA、RNA/DNA修饰和突变以及代谢物及其任何组合。

[0181] 本文公开的过程通常被称为“EDDE过程”或“EDDE”。如本文所用,术语“EDDE过程”或“EDDE”是指以下一般方法:i)将捕获表面用对于一般EV上的一种或多种细胞表面标志物特异性或对于EV的一个或多个亚群上的一种或多种细胞表面标志物特异性的试剂官能化,以从生物样品分离总EV群体或EV的一个或多个亚群;ii)使官能化的捕获表面与生物样品接触;iii)进行耗竭步骤,进行富集步骤,或其组合,以产生纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群;和iv)洗脱纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群,或进一步操纵纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群,诸如例如,通过裂解纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群内的EV。在一些实施方案中,然后对洗脱的纯化的总EV群体或EV的一个或多个亚群进行进一步的下游分析。

[0182] 对于耗竭过程,步骤iii)至少包括将来自步骤ii)的上清液转移至新管或其他容器中,和使用合适的捕获表面将EV与上清液分离。在一些实施方案中,来自上清液的EV从合适的分离捕获表面完整洗脱。在一些实施方案中,裂解来自上清液的EV,并提取来自裂解的EV的核酸。在一些实施方案中,然后对洗脱的完整EV或从其中提取的核酸进行进一步的下游分析。在一些实施方案中,从耗竭的体液直接分离核酸、蛋白或脂质。

[0183] 对于富集过程,步骤iii)包括洗涤已经与来自步骤ii)的生物样品接触的官能化的捕获表面,并将洗涤的捕获表面转移至新管或其他容器中。在一些实施方案中,从洗涤的捕获表面完整洗脱EV。在一些实施方案中,裂解EV,并提取来自裂解的EV的核酸。在一些实施方案中,然后对洗脱的完整EV或从其中提取的核酸进行进一步的下游分析。

[0184] 本文提供的图表明本文提供的EDDE分离和纯化过程的各种优点和其他方面。

[0185] 如图1中所示,本发明的一种示例性过程以生物流体如血清或血浆开始。通过任何生物亲和力分子从具体生物流体分离EV的亚群。可以通过电荷亲和力分离EV。也可以分离总样品EV。从捕获表面取回使用捕获表面分离的特定EV。

[0186] 使用下游测定法分析所有特定和总外排体的生物标志物或概况。图2A描绘HBD mRNA在本文被称为EDDE的分离过程之后显著降低81%,如通过定量PCR所测量。图2B描绘血浆EV中的HBB蛋白浓度显著降低55%,如通过特异性ELISA所测量。图2C描绘作为血浆中三种最丰富的mRNA的HBB、HBA1和HBA2的水平在EDDE过程后分别降低67%、63%和66%,如通过RNAseq所测定。

[0187] 图3A描绘PPBP mRNA如何在EDDE (SELP)后显著降低81%,如通过定量PCR所测量。图3B描绘血浆外排体中的SELP蛋白浓度如何显著降低80%,如通过特异性ELISA所测量。图3C表明作为血浆EV中三种最丰富的血小板mRNA的PPBP、PF4v1和PF4的水平在EDDE (SELP)后分别降低67%、63%和66%,如通过RNAseq所测定。

[0188] 下一组研究表明EDDE过程检测EV中的蛋白编码基因的优异、灵敏的能力。在EDDE过程前,在血浆样品中,存在一些外排体RNA,但由于也进行测序的不相关的背景基因的存在而通常无法检测到。当使用EDDE来除去背景EV时,检测到血浆中未检测到的基因,如图4A中所见。检测到这些蛋白编码基因中的几百种,并且图4B和4C呈现在EDDE后检测到的代表性的几种蛋白编码基因。

[0189] 图5描绘当将T47D细胞系条件培养基掺入健康血浆合并物中时,当分开或一起使用抗CD44抗体和/或抗CD184抗体靶向CD44和CD184时,各种乳腺癌特异性基因GATA3、KRT19、RAB13、SAMD4A、ARHGAP11a、ANP32B和TAF15的回收率水平比用非特异性抗体更高。

[0190] 图6表明EDDE过程改进丰富的生物标志物的特异性。像许多蛋白生物标志物一样,c-Met存在于大多数样品中,并且缺乏特异性。EDDE过程的使用揭示来自非相关背景的相关的癌症相关信号。

[0191] 如图7中所示,许多生物标志物的表达水平太低而无法在总血浆中有效检测到。可以在EDDE富集之后检测到这些生物标志物。作为实例,在总血浆中几乎未检测到图7A中的PD-1、图7C中的Tau和p-Tau蛋白(图7B),但在来自相同样品的EV的亚群的新型富集(EDDE过程)之后,稳健地检测到生物标志物。使用靶向标志物(诸如L1CAM)的特异性抗体富集神经元外排体之后,检测到Tau信号。在针对含有CD81和CD3的EV富集之后,检测到PD-1。

[0192] 图7A表明使用EDDE过程富集在其表面上含有CD81的EV显著地使得能够检测血浆样品中的PD-1,并且在未处理的血浆样品中未检测到PD-1。图7B和7C表明,富集在其表面上含有CD171的EV使得能够通过常规ELISA检测血浆样品中的总tau和p-tau。图7D表明富集在其表面上含有CD171的EV使得能够检测来自血浆样品和直接来自血浆的EV中的NEFL mRNA。使用EDDE过程进行富集的过程还使NRGN和ENO2的信号增加2-4倍。

[0193] 图8表明EDDE血浆RNA组准确地区分100%的在伊匹单抗使用仅2-4周后继续实现12个月的对免疫疗法(黄色条)的持久应答的患者(21例患者的研究)。相反,总血浆外排体RNA特征具有12.5%假阳性率。

[0194] 实施例2:人正常和癌症血浆中丰富基因的EDDE耗竭。

[0195] 将在基线(开始免疫疗法之前)抽取并在开始免疫疗法后第2/4周采集的转移性黑

色素瘤患者血浆进行使用过滤方法的预澄清。对血浆进行EDDE免疫捕获程序,以除去丰富的含有不相关RNA转录物的表达血型糖蛋白A (CD235A) 的网织红细胞和前红细胞EV。从剩余的未结合血浆分离外排体,清除CD235A EV,并分离外排体RNA。使用超过600种mRNA转录物的mRNA组来检查在基线采集相比于在免疫疗法后第2/4周采集的样品中的表达。鉴定在时间点之间具有最大表达变化的基因。如图8中所见,在EDDE耗竭后鉴定的前十种差异表达基因能够将来自对免疫疗法应答的个体的样品(黄色树状图)与对免疫疗法无应答的那些(绿色树状图)分离开。当在未使用EDDE CD235A耗竭处理的同一患者血浆样品中鉴定到差异表达的基因时,未看到这种分离。

[0196] 人血浆尽管被认为是用于分析循环肿瘤生物标志物的无细胞介质,但具有丰富的基因,其尤其对于实体瘤,在肿瘤学分析中通常是无用的,其中有人血红蛋白和血小板相关基因。此处公开的EDDE耗竭过程可以凭借靶向针对细胞表面标志物的EV耗竭来在显著程度上有效地耗竭这些不相关的丰富基因。如图9中所示,分别使用抗GYPA (CD235) 抗体和抗CD42(加上抗CD62) 抗体来耗竭红细胞/网织红细胞来源的EV和血小板来源的EV。耗竭网织红细胞/红细胞EV的结果是,血浆中一些最丰富的mRNA (HBB、HBA1、HBA2、MT-ND1、MT-ND4L和MT-CO1) 被除去超过50%用于下游分析,如通过RNASeq以每百万的转录物数所测量。

[0197] 如图12A和图12B中对于血小板来源的EV耗竭所示,通过经由qPCR (Ct) 分析的PPBP RNA水平表明EDDE的作用。显然,使用磁性珠粒(例如,来自Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) 和EDDE免疫下拉的耗竭导致血小板来源的EV信号主要在珠粒上,并且在EDDE耗竭过程后在血浆上清液中显著减少。血小板来源的EV的两种表面标志物的组合(CD42 + CD62) 在EDDE之后导致血浆上清液中的甚至更大的耗竭,进一步使得能够进行有用的下游RNA分析。

[0198] 在图17(左部分)中,在三次独立重复各自中使用2 mL人正常血浆,以经历使用CD235抗体缀合的磁性珠粒(Thermo Fisher, Waltham, MA) 的EDDE耗竭,其中使用含有去污剂的缓冲液洗涤珠粒多次。将除去在官能化的磁性珠粒和细胞表面标志物CD235之间形成的复合物后,人血浆的未结合部分使用基于QIAzol的方法进行RNA提取,用于通过定量PCR测量HBB基因拷贝数。作为对照,在EDDE过程中使用IgG代替235的特异性抗体,并且在血浆的未结合部分中也测量相同的HBB基因。提取总纯净血浆的RNA,以测量HBB基因拷贝数的起始量。观察到HBB耗竭超过4倍(对应于2.8 Ct的Ct变化)。

[0199] 实施例3:在条件癌细胞培养基和正常人血浆中的EDDE富集。

[0200] 如图10中所示,来自已知在细胞表面上表达野生型EGFR膜蛋白的人胶质母细胞瘤癌细胞系G1i36野生型的条件细胞培养基用于使用本文公开的标准EDDE富集程序用作为对照的IgG和分别针对CD63、CD81、EGFR1细胞表面标志物的抗体进行免疫下拉。使用这些抗体将特定EV下拉之后,从纯化的EV的亚群提取RNA,然后随后通过定量PCR分析GAPDH基因表达。清楚地表明,外排体特异性标志物(CD63,CD81) 或该癌细胞系独特的EGFR标志物可以有效地富集条件培养基中的EV的亚群。

[0201] 如图11中所示,使用EDDE平台以概述的置信水平,靶向外排体上的潜在表面蛋白的列表用于富集或人血浆中的耗竭。

[0202] 实施例3:正常人血浆 Vs. 癌症患者血浆中的EDDE富集。

[0203] 如图14中所示,人黑色素瘤患者血浆和健康受试者血浆用于使用本文公开的标准EDDE富集程序用作为对照的IgG和针对CD44细胞表面标志物的抗体进行免疫下拉。据表明,

相对于健康受试者,仅基于CD44细胞表面标志物的EDDE从黑色素瘤患者A和B的血浆特异性富集EV的亚群(在这种情况下,在表面上携带cMET蛋白的生物标志物),使得能够将黑色素瘤患者与健康受试者分开,可能用于黑色素瘤的早期检测。如果未进行EDDE富集,则在c-MET蛋白的纯净血浆检测中未看到分离。

[0204] 如图15A和15B中所示,人胶质母细胞瘤患者血浆和健康受试者血浆用于使用本文公开的标准EDDE富集程序用作为对照的IgG和分别针对CD44、EGFR和EGFRvIII细胞表面标志物的抗体进行免疫下拉。据表明,相对于健康人,在这些测试的标志物中仅EGFR细胞表面标志物显示来自GBM患者血浆的EV的亚群的EDDE富集的特异性。通过western印迹分析,富集的EV的亚群显示特征性外排体标志物,如FLOT1和CD81。

[0205] 实施例4:正常和神经退行性疾病患者血浆样品中的神经元蛋白生物标志物的EDDE富集。

[0206] 在神经元来源的EV的特异性富集之后,在血浆EV中检测到神经元相关蛋白。首先使用过滤方法预先澄清单独或合并的健康血浆。在图17B、图18和图20中,对血浆进行EDDE免疫下拉程序,其靶向在其表面上具有L1CAM或GluR2蛋白的EV。该EDDE程序由操作人员手动进行,或使用自动化珠粒/液体处理设备进行。将来自血浆的表达L1CAM或GluR2的EV免疫捕获在表面上,并与血浆的未结合部分分开。这些EV从其捕获表面移取和/或裂解以生成EV蛋白提取物。然后,通过针对神经元组织中表达的已知神经元相关蛋白(包括Tau、p-Tau、p-181 Tau、SCNA和ENOS2)的标准或改良的蛋白检测方法对这些EV提取物进行询问。只有来自靶向L1CAM或GluR2的富集过程的EV裂解物检测到神经元相关蛋白的存在和/或增加;EDDE对照IgG则不能。靶向L1CAM和GluR2的EDDE特异性捕获神经元相关的EV,并且不会无差别地取回血液中的EV,因为通过L1CAM和GluR2 EDDE过程并未富集HBB,血浆和血浆外排体中发现的丰富的血液蛋白。如图16和图21中所示,来自具有神经退行性疾病的患者或具有神经退行性疾病的风险的个体的血浆(来自年龄>60岁的患者的血浆)经历EDDE程序用于免疫捕获血浆中的表达L1CAM和GluR2的EV。在免疫捕获之后,将L1CAM或GluR2阳性EV与液体血浆物理分开并保留。这些神经元亚型EV从免疫捕获表面释放和/或裂解以生成神经元EV裂解物,其通过标准或改良的蛋白鉴定方法进行分析。如图21中所见,只有当在EDDE L1CAM或EDDE GluR2过程后测量神经元相关蛋白 α 突触核蛋白(SNCA)时,才可以将帕金森氏病(PD)样品与对照健康样品区分开。此处对于GluR2 EDDE富集,该EDDE富集测定中的 α -突触核蛋白的阈值被设置为9 pg/ML血浆,以在将帕金森氏病与正常健康受试者区分开中实现100%灵敏度和100%特异性。在未处理的血浆和未处理的CSF中,疾病和健康组之间的SNCA浓度没有差异。类似地,如图16中所见,当对年长血浆(年龄>60岁)和年轻血浆(年龄<50岁)进行EDDE L1CAM程序且对这些EV裂解物测量Tau浓度(与AD相关的神经元蛋白)时,Tau的浓度在年长样品中较高。在通过超速离心方法耗竭外排体的血浆中未检测到Tau。

[0207] 实施例5:正常和神经退行性疾病患者血浆样品中的神经元RNA生物标志物的EDDE富集

在实验中使用通常从10个受试者合并的最多达2 mL的人健康供体血浆,导致对从EDDE富集的具有靶标细胞表面标志物的EV提取的RNA进行qPCR分析。在图13中,当使用特异性抗体(生物素化)来将连接有链霉抗生物素蛋白的磁性珠粒中的接触表面官能化时,显示神经元特异性基因(诸如NRGN ENO2和NEFL)在EDDE富集后在人血浆中实现富集。洗涤在珠粒和

含有CD171 (L1CAM) 的表面标志物的EV之间形成的复合物,然后使用用于RNA提取的QIAzol试剂进行裂解。分别地,纯化RNA,并使用对于神经元基因特异性的引物和探针进行随后的qPCR分析。对于图19中的实验进行类似的过程,其中分析神经元基因NEFL、NRGN、ENO2、SNSR4和GRP139,作为对照,还分析HBB用于比较。分别使用CD171 (EDDE-neuro 1) 和GluR2 (EDDE-neuro 2) 进行EDDE富集过程。如图22和图23中所示,使用L1CAM和GluR2的神经元EDDE富集显著富集神经元特异性基因,但对于HBB没有富集,作为对照,非神经元DRD5 EDDE没有富集该组神经元基因。

[0208] 在图24中,使用L1CAM或GluR2抗体进行EDDE富集之后,对于神经元特异性基因并排分析十个帕金森氏患者的血浆和十个年龄匹配的正常人血浆。在这些候选基因中,未经归一化,GluR2 EDDE富集分别使用神经元基因PARK2和DLG4以预定义的阈值Ct将帕金森氏症患者与正常人分开。

[0209] 其他实施方案

尽管本发明已结合其详述进行描述,但上述描述意在举例说明而不是限制本发明的范围,该范围由所附权利要求的范围定义。其他方面、优点和修改都在以下的范围内。

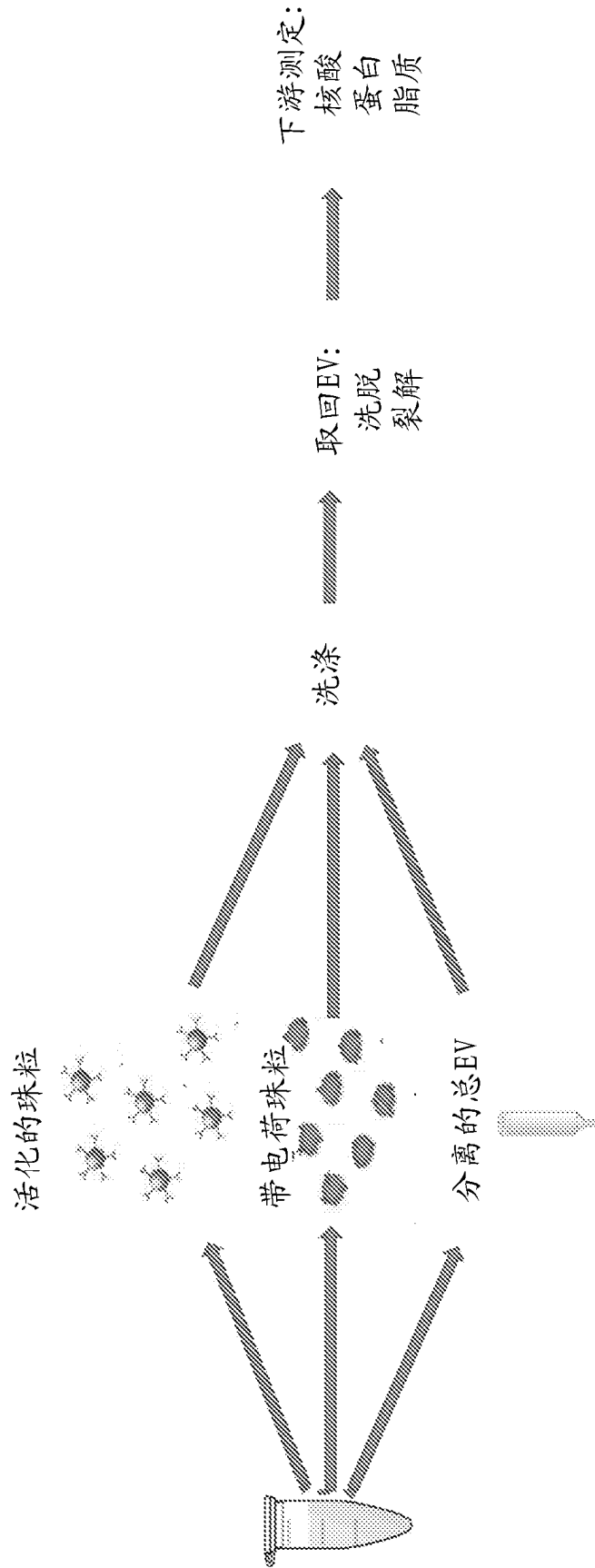


图 1

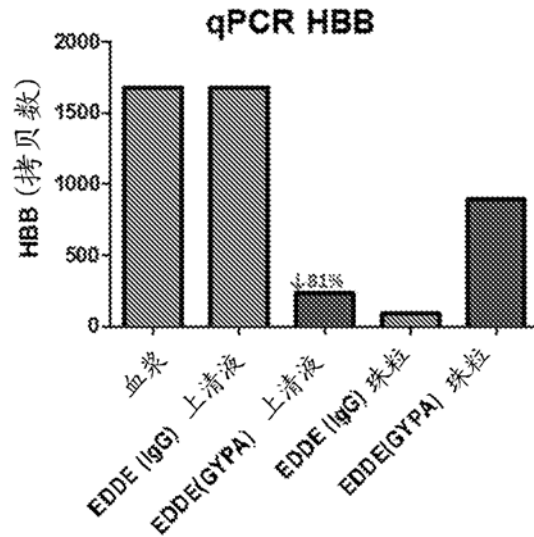


图 2A

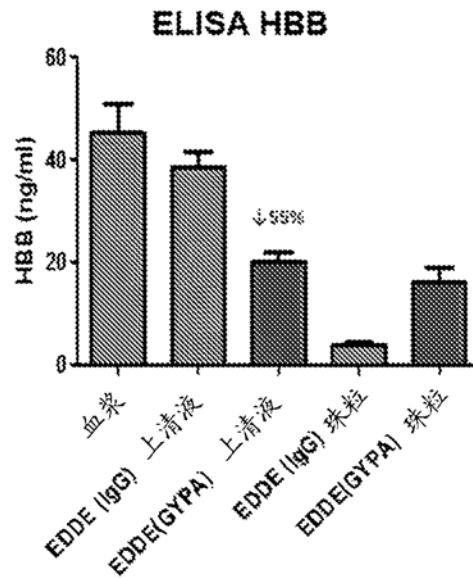


图 2B

基因符号	EDDE (GYPA) 上清液 (TPM)	EDDE (IgG) 上清液 (TPM)	血浆 (TPM)	降低
HBA1	3998.8	10895.7	13110.4	63.3%
HBB	3703.5	11382.8	10923.6	67.5%
HBA2	2858.3	8400.2	7877.3	66.0%

图 2C

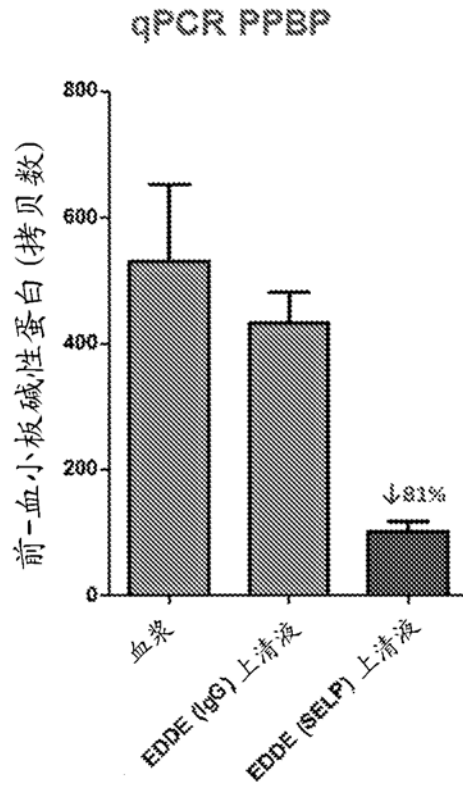


图 3A

蛋白 (ELISA) SELP

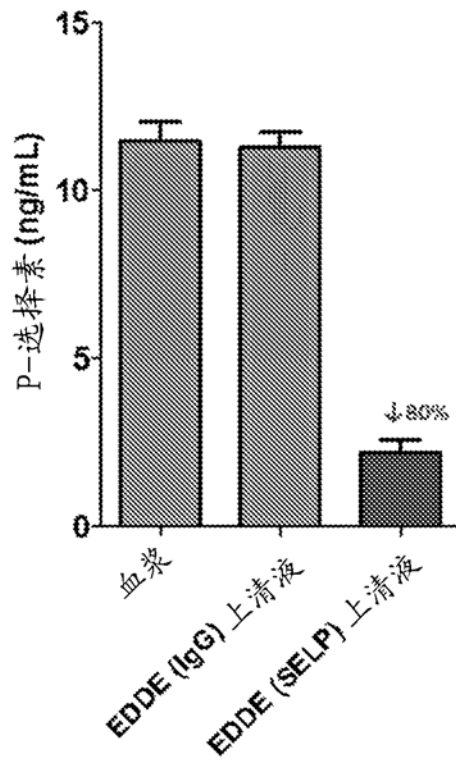


图 3B

基因符号	EDDE (SELP) 上清液 (TPM)	EDDE (IgG) 上清液 (TPM)	血浆 (TPM)	降低
PPBP	73.2	203.5	204.8	64.0%
PF4V1	0.2	30.7	32.2	99.3%
PF4	26.5	66.1	65.3	59.9%

图 3C

丰度2倍以上的基因数

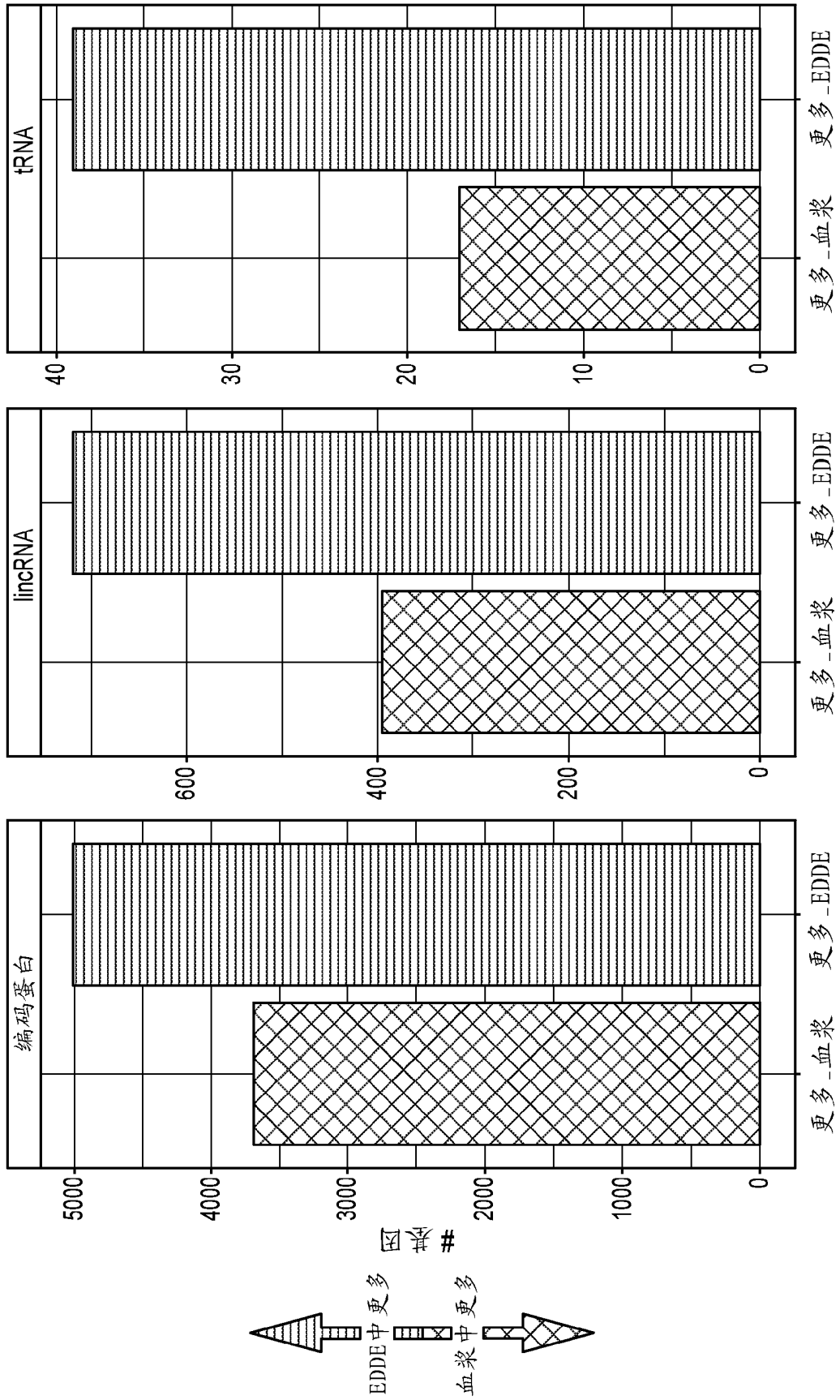


图 4A

基因符号	基因生物型	TPM: EDDE GYPA 上清液	TPM: 总 血浆	log2(倍数 变化)	adj. p值
DEFB112	编码蛋白	271.3	0	24.36	0.001274
SLC30A7	编码蛋白	66.8	0	11.2	0.000288
AKAP7	编码蛋白	58.7	0	10.76	0.008491
PHOSPHO2	编码蛋白	31.7	0	9.54	0.079961
IFI27L2	编码蛋白	31.7	0	8.95	0.068141
PLA2G4A	编码蛋白	24.1	0	11.4	0.000597
DNAL1	编码蛋白	22.1	0	9.42	0.049058
QDPR	编码蛋白	22	0	9.48	0.022431
CCNK	编码蛋白	22	0	11.4	0.000597
SAR1A	编码蛋白	21.8	0	9.23	0.031319
CTC-534A2.2	编码蛋白	19.5	0	10.19	0.0108
IMMP2L	编码蛋白	19.3	0	8.65	0.054552
SELENOM	编码蛋白	16.2	0	9.01	0.113729
IFT46	编码蛋白	15.7	0	9.56	0.038011
THTPA	编码蛋白	15.4	0	23.39	0
CCS	编码蛋白	14.4	0	8.77	0.118884
BDH2	编码蛋白	14.4	0	22.57	0.00398
OR4C12	编码蛋白	14.1	0	9.24	0.173609
KIFAP3	编码蛋白	13.7	0	8.89	0.05332
ARMC1	编码蛋白	12.9	0	8.41	0.045909
ZNF354C	编码蛋白	12.8	0	9.15	0.044273
RMND1	编码蛋白	12	0	8.97	0.043339
RNASE9	编码蛋白	11.6	0	10.01	0.016656
SDAD1	编码蛋白	10.7	0	8.24	0.044147
KRBOX1	编码蛋白	10	0	8.6	0.033846

图 4B

基因符号	基因生物型	TPM: EDDE CD235a ⁺ CD62 ⁺ 上清液	TPM: 血浆	log2 (倍数 变化)	adj. p值
DEFA1B	编码蛋白	51.7		0	10.3 0.002324
PPP1R14A	编码蛋白	8.9		0	8.3 0.080002
MTUS2	编码蛋白	6.2		0	9.57 0.014737
SUOX	编码蛋白	6.1		0	9.61 0.021261
ZNF670	编码蛋白	5.7		0	8.13 0.085675
ZWINT	编码蛋白	4.8		0	8.87 0.062269
IL1R2	编码蛋白	4.7		0	8.69 0.112943
THAP3	编码蛋白	4.6		0	8.02 0.070735
ASAH2B	编码蛋白	3.8		0	7.37 0.08019
PRUNE2	编码蛋白	3.4		0	8.09 0.002953
IFT22	编码蛋白	3.4		0	6.98 0.204447
ZNF674	编码蛋白	2.9		0	9.14 0.027943
NUPR1	编码蛋白	2.5		0	6.49 0.148668
SULF1	编码蛋白	2.4		0	6.38 0.014146
SLC35G1	编码蛋白	2.1		0	7.3 0.174377
MFSD9	编码蛋白	2.1		0	6.27 0.146481
AMT	编码蛋白	2.1		0	6.72 0.259998
NR2C1	编码蛋白	2		0	8.81 0.024947

图 4C

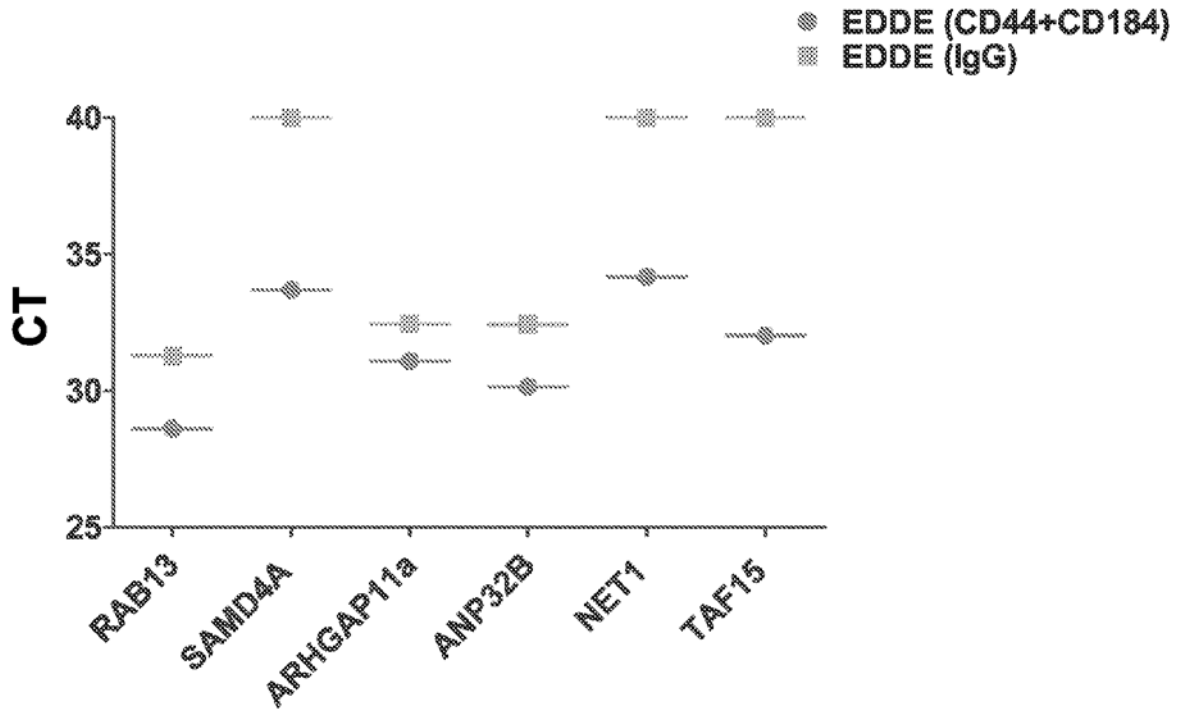


图 5

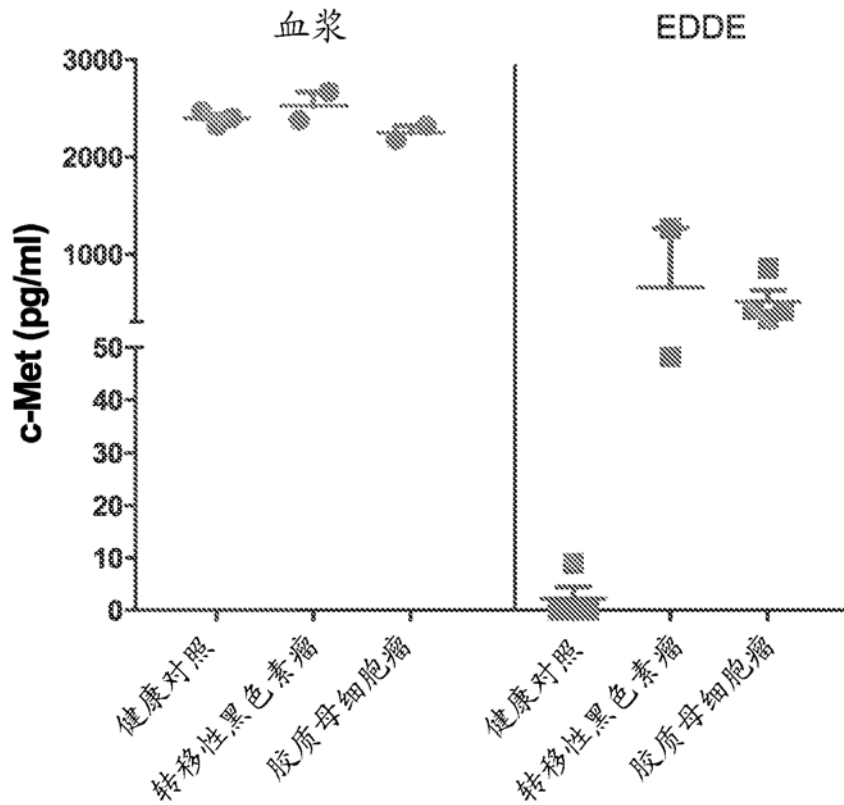


图 6

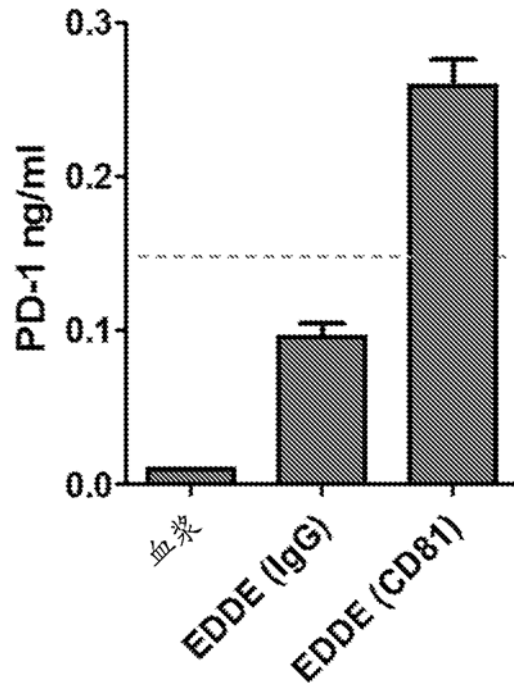


图 7A

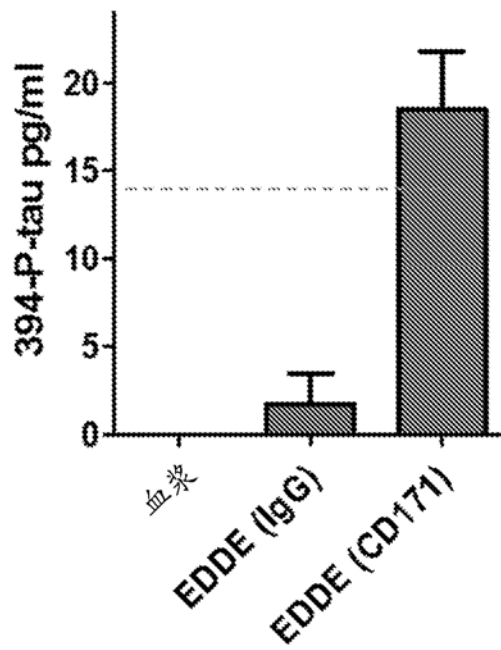


图 7B

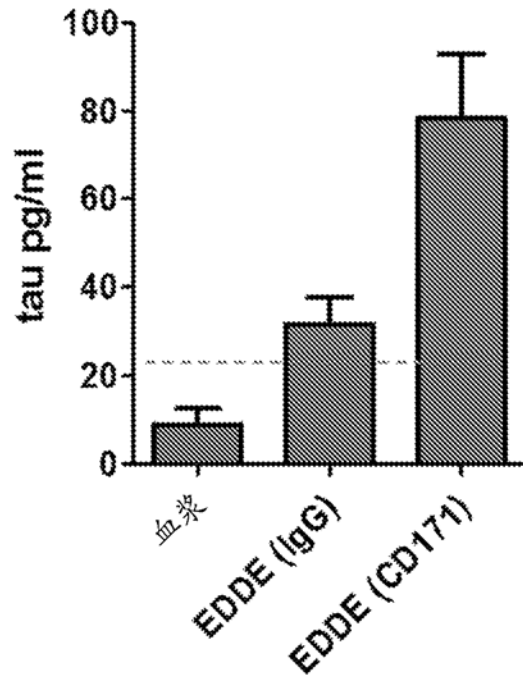


图 7C

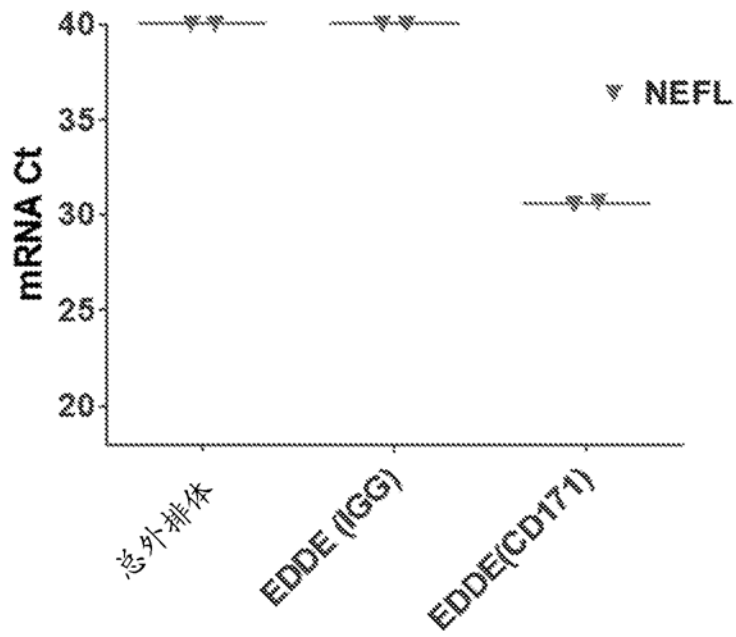


图 7D

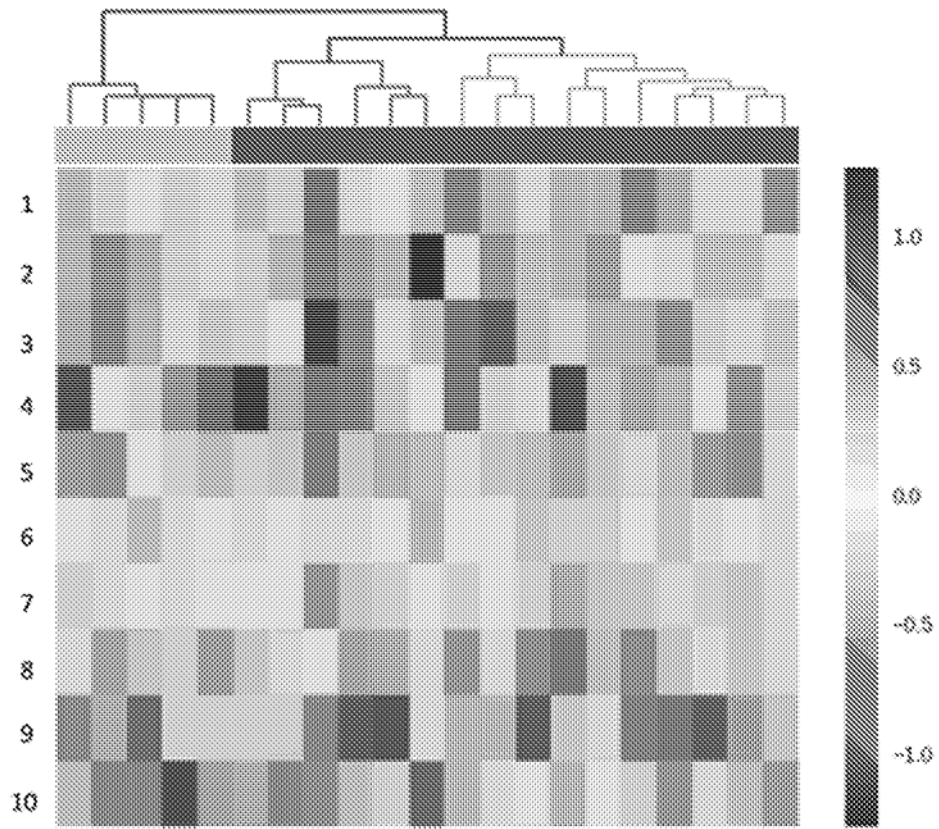


图 8

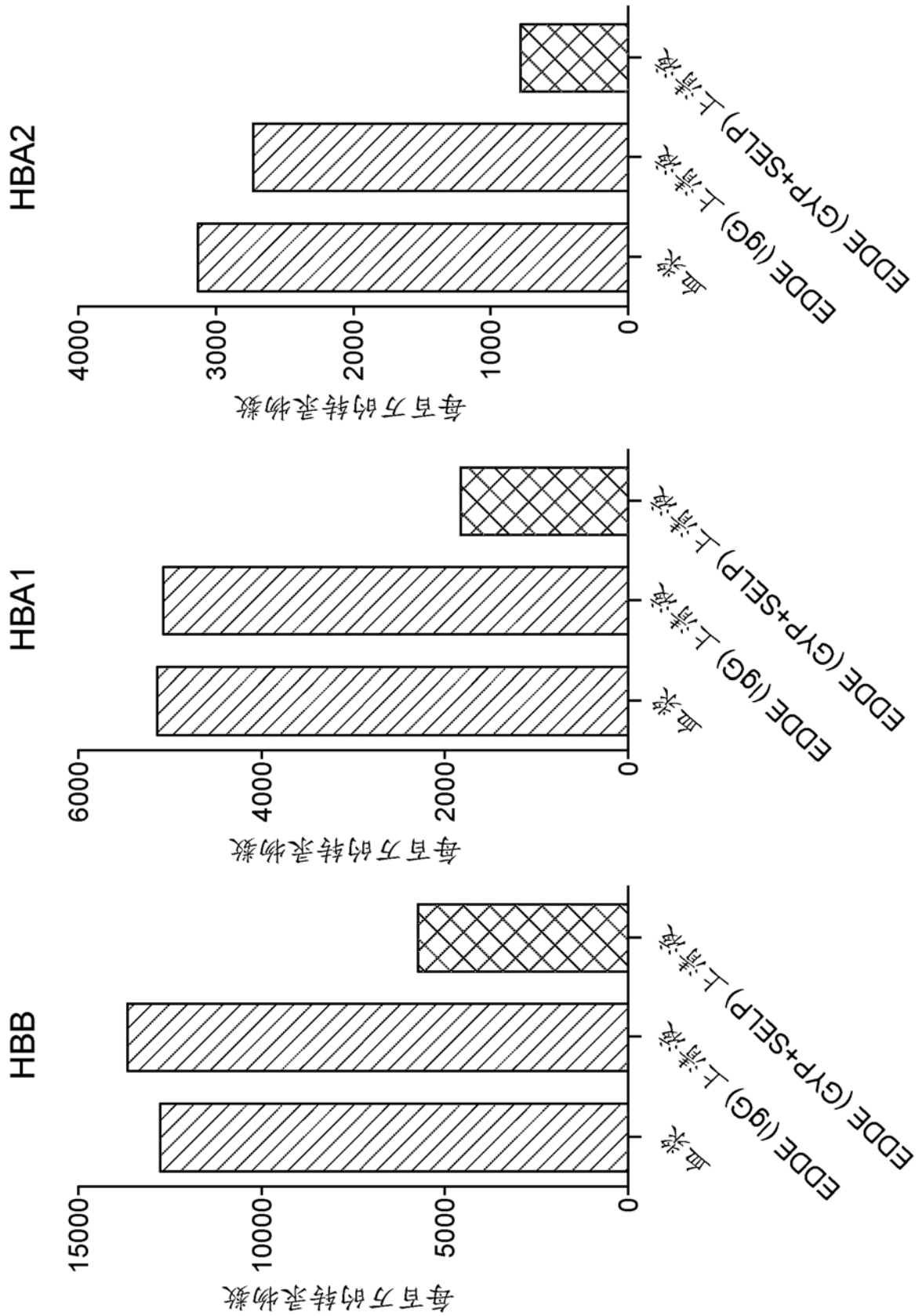


图 9

10种丰度最高的基因中的 6种被EDDE降低>50%				
排序	基因	TPM EDDE (GYPA+SELP)	TPM EDDE (IgG)	通过EDDE 耗竭的%
1	HBB	5704.6	13602	58.06
2	HBA1	1811	5051.9	64.15
3	HBA2	773.4	2718.1	71.55
4	TMSB4X	1794.6	2044.6	12.23
5	EEF1A1	1339.4	1611	16.86
6	FTL	1094	1500.9	27.11
7	MT-ND1	494.4	1467.5	66.31
8	MT-ND4L	476.7	1216.4	60.81
9	RPS27	1193.5	1154	0.00
10	MT-CO1	441.3	999	55.83

图 9续

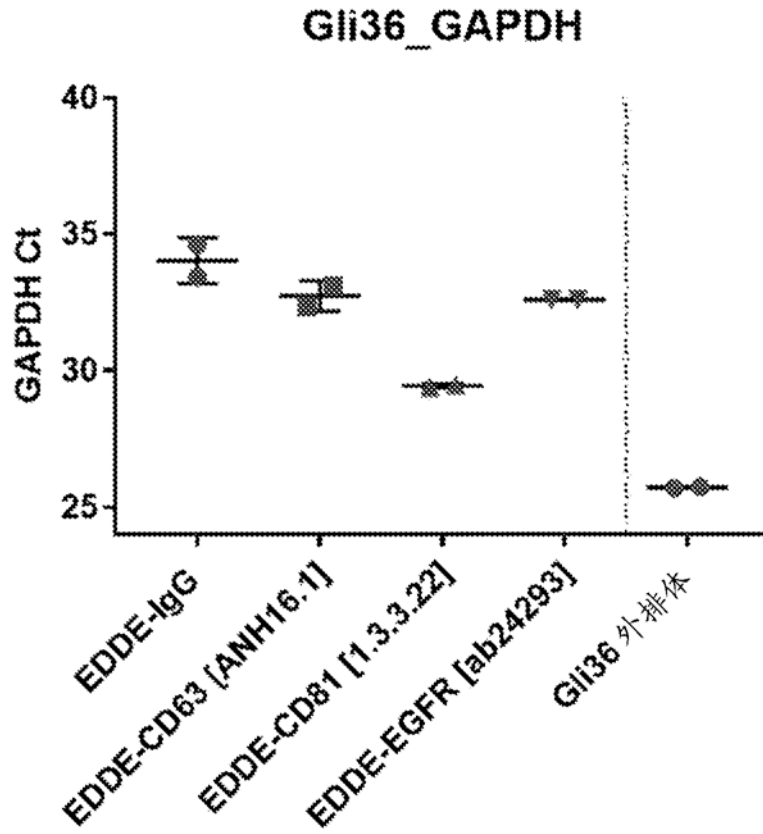


图 10

表面蛋白 靶标	细胞靶标	差异mRNA 水平	差异蛋白 水平	置信水平 N
CD235 (血型糖蛋白 A)	红细胞	HBB		20
CD62 (P-选择素)	血小板	PPBP	CD62	20
CD171 (L1cam)	神经元	NRGN	P-tau, tau, a- syn	3
CD44	癌干细胞	GATA3, KRT19	MET	4
CD184	乳腺癌	GATA3, KRT19		4
CD42, 糖蛋白Ib 和 CD140, PDGFR	血小板	PPBP	CD62	4
CD233, SLC4A1 和 CD240, RH	红细胞	HBB		4

图 11

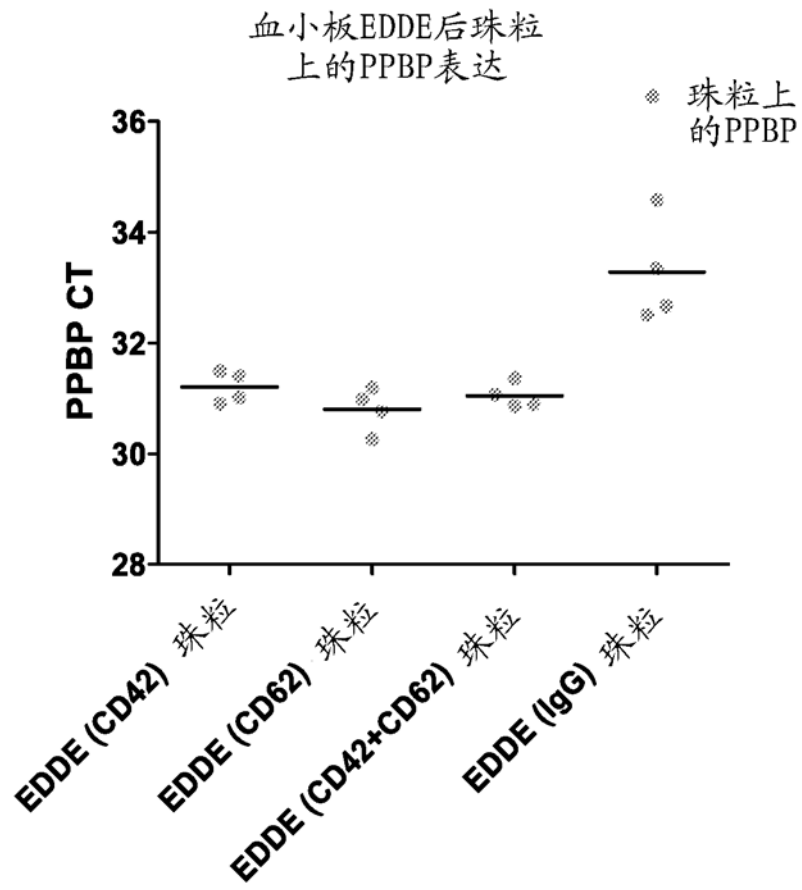


图 12A

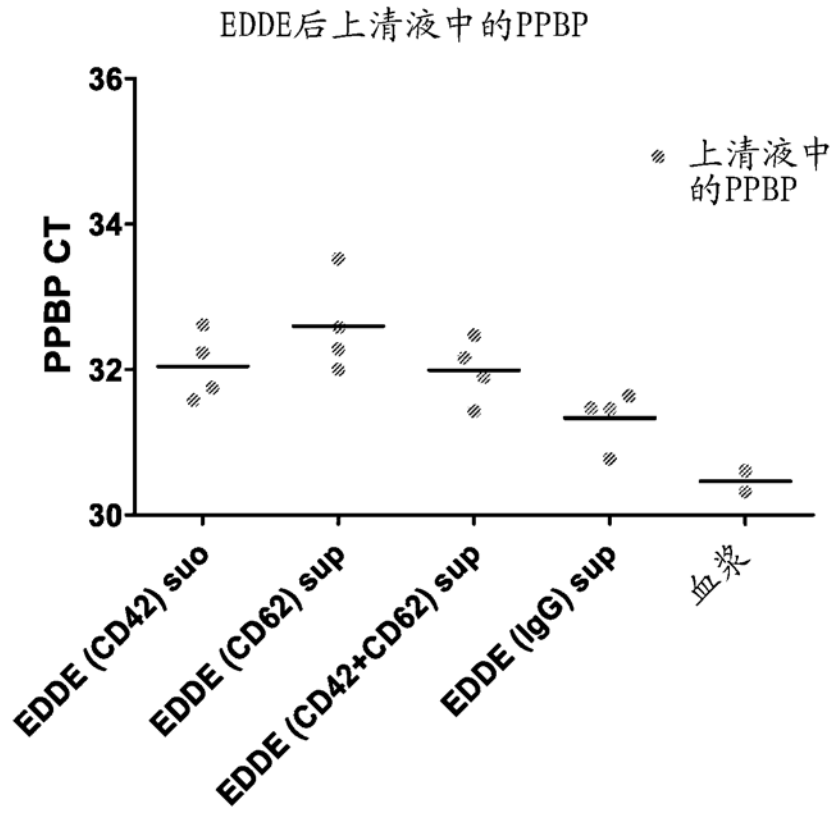


图 12B

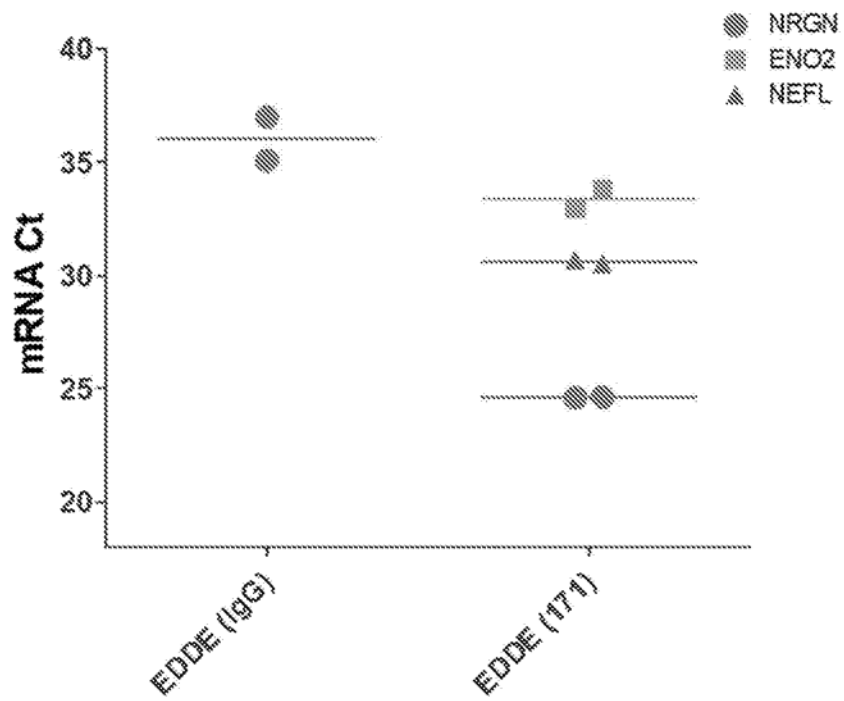


图 13

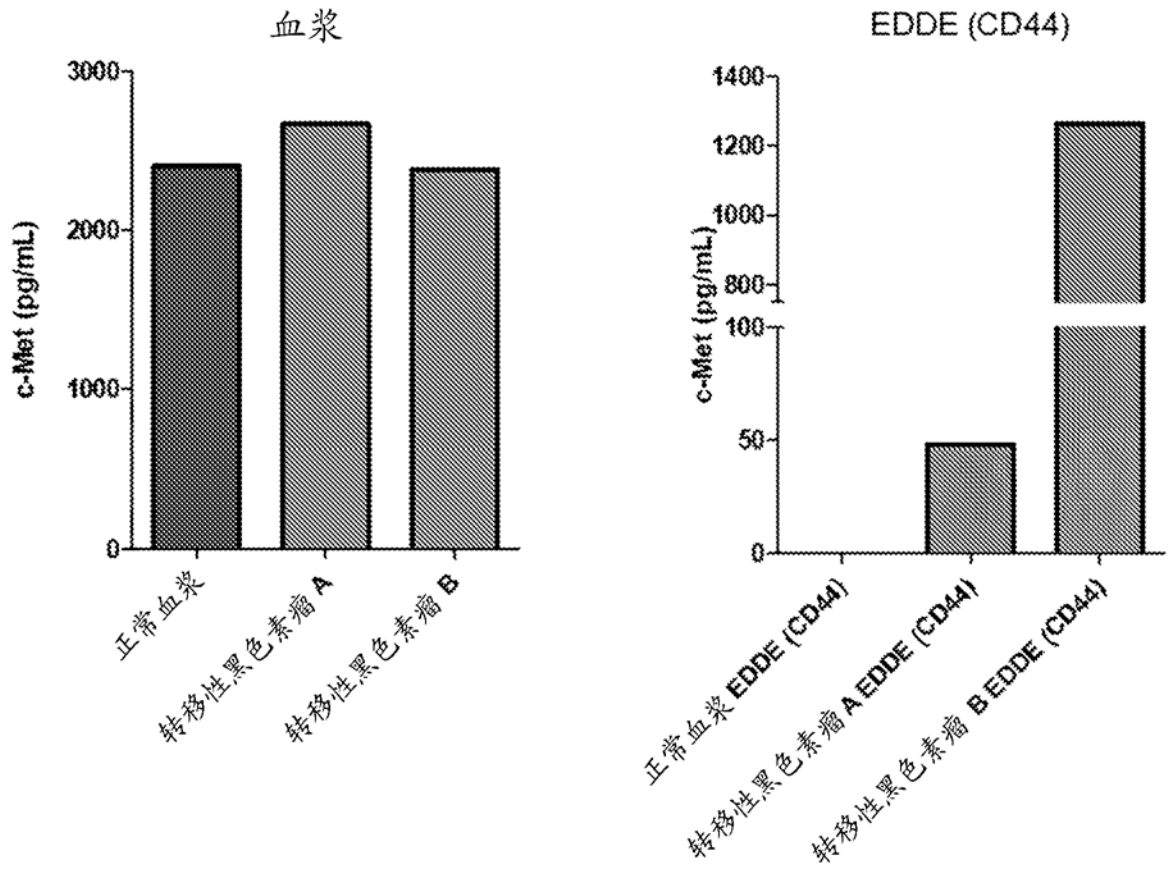


图 14

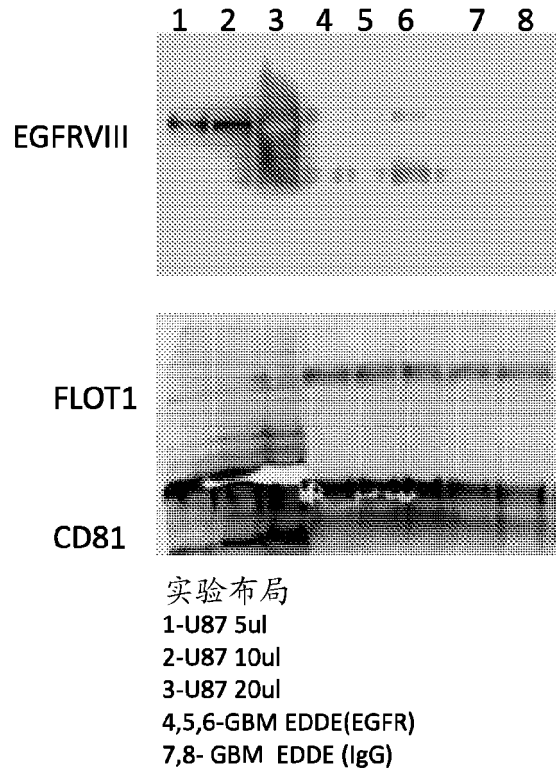


图 15A

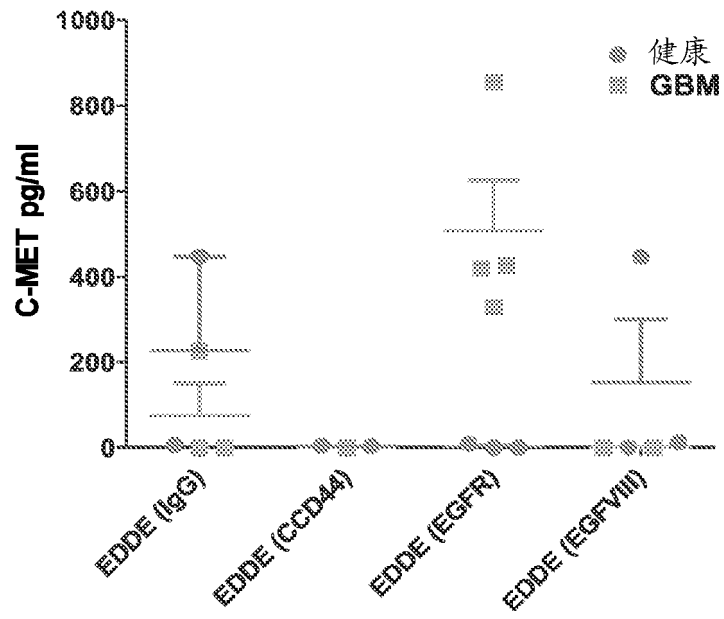


图 15B

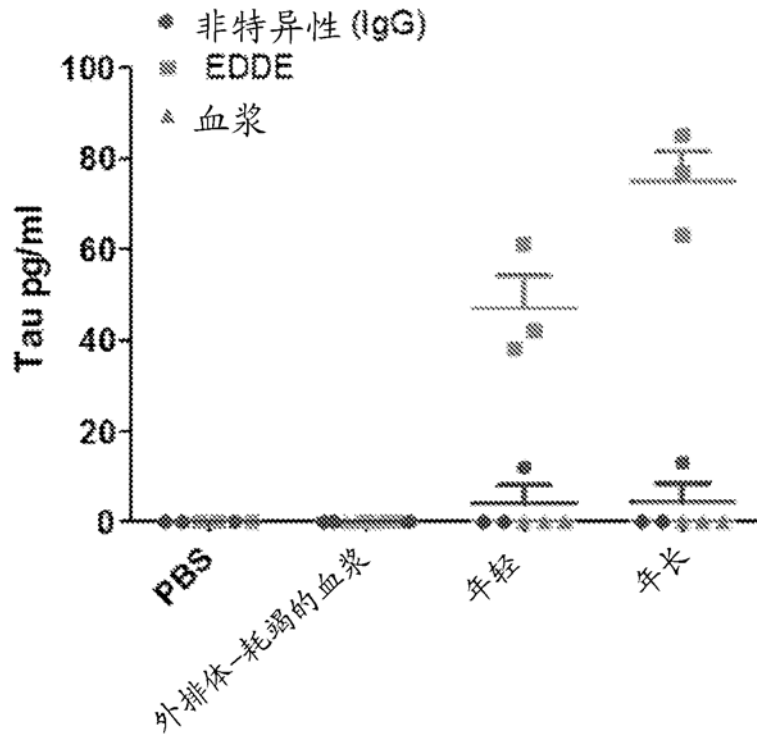


图 16

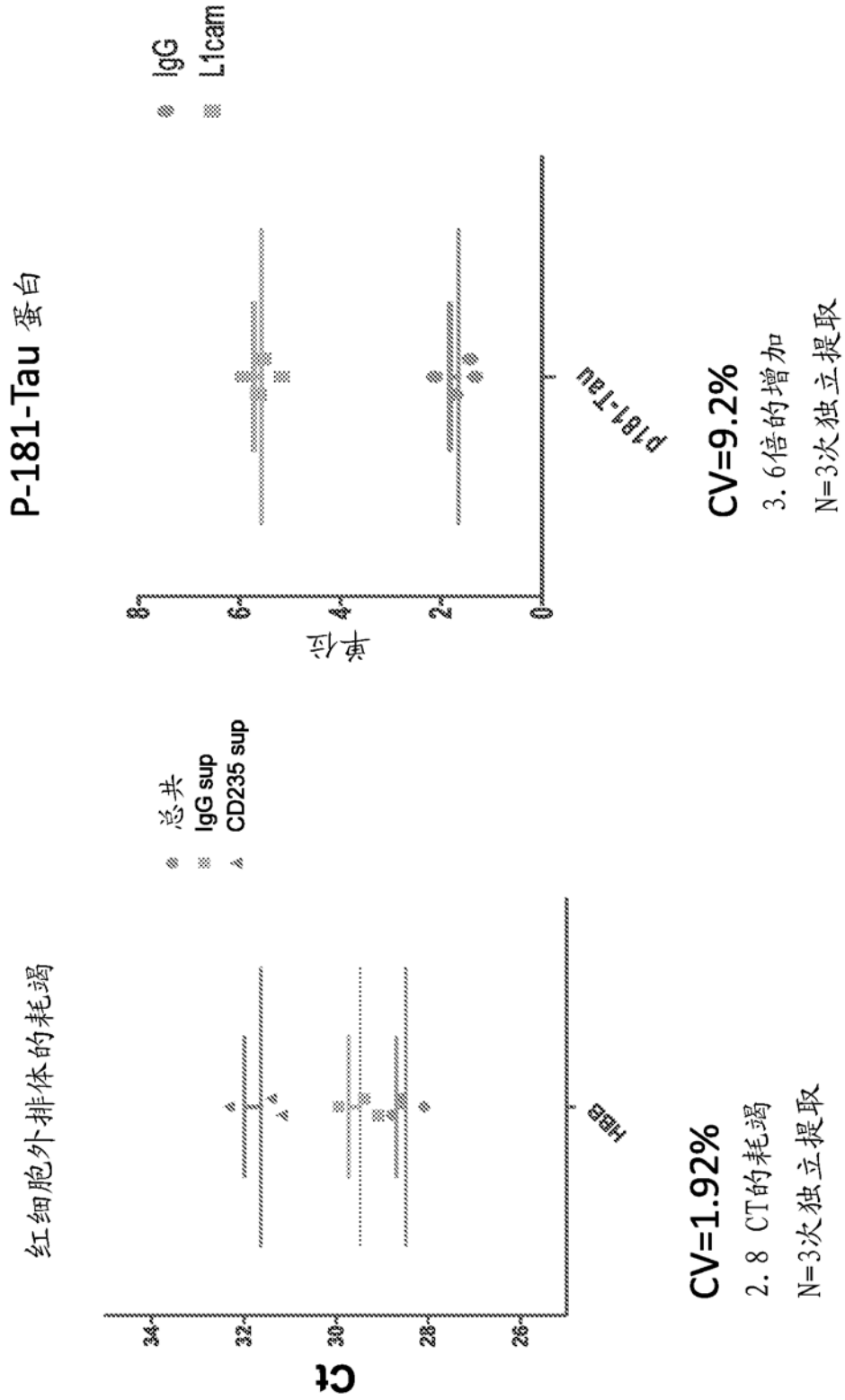


图 17

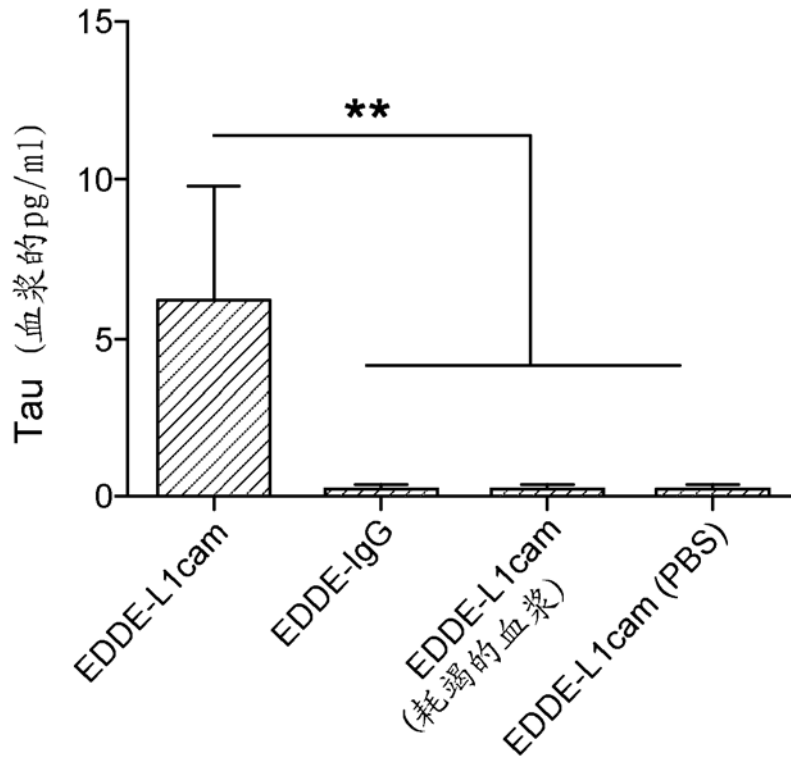


图 18A

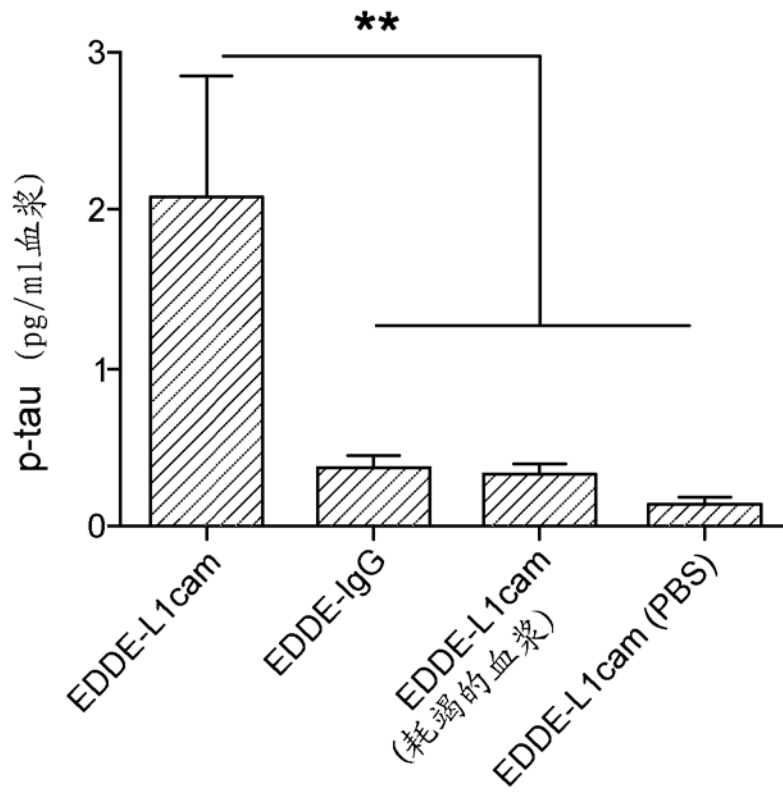


图 18B

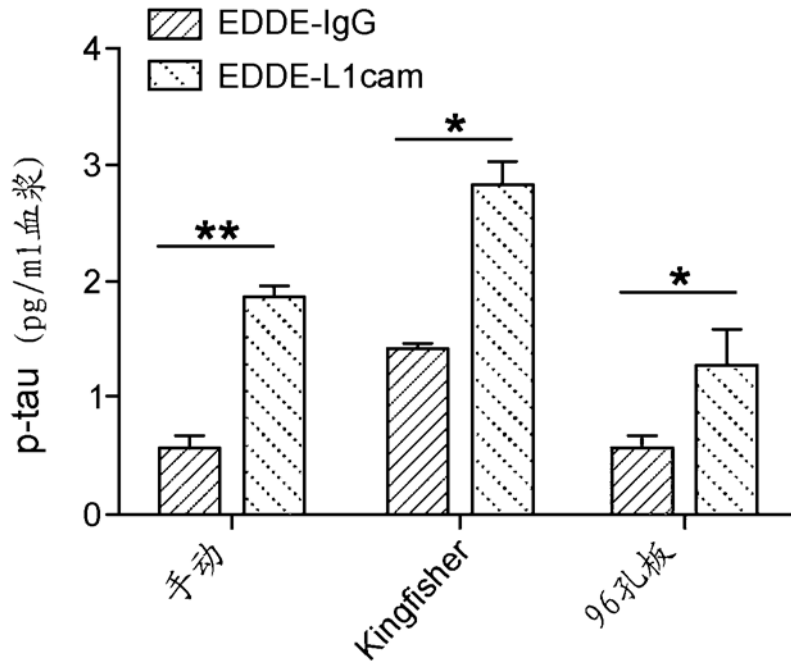


图 18C

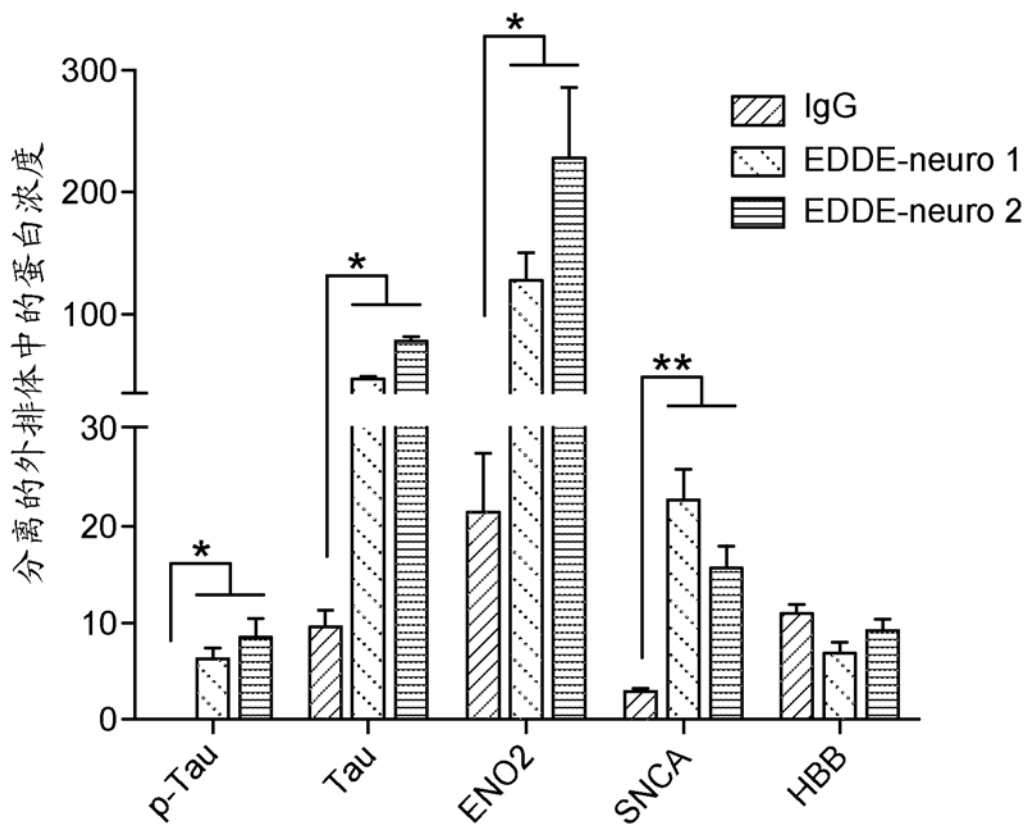


图 18D

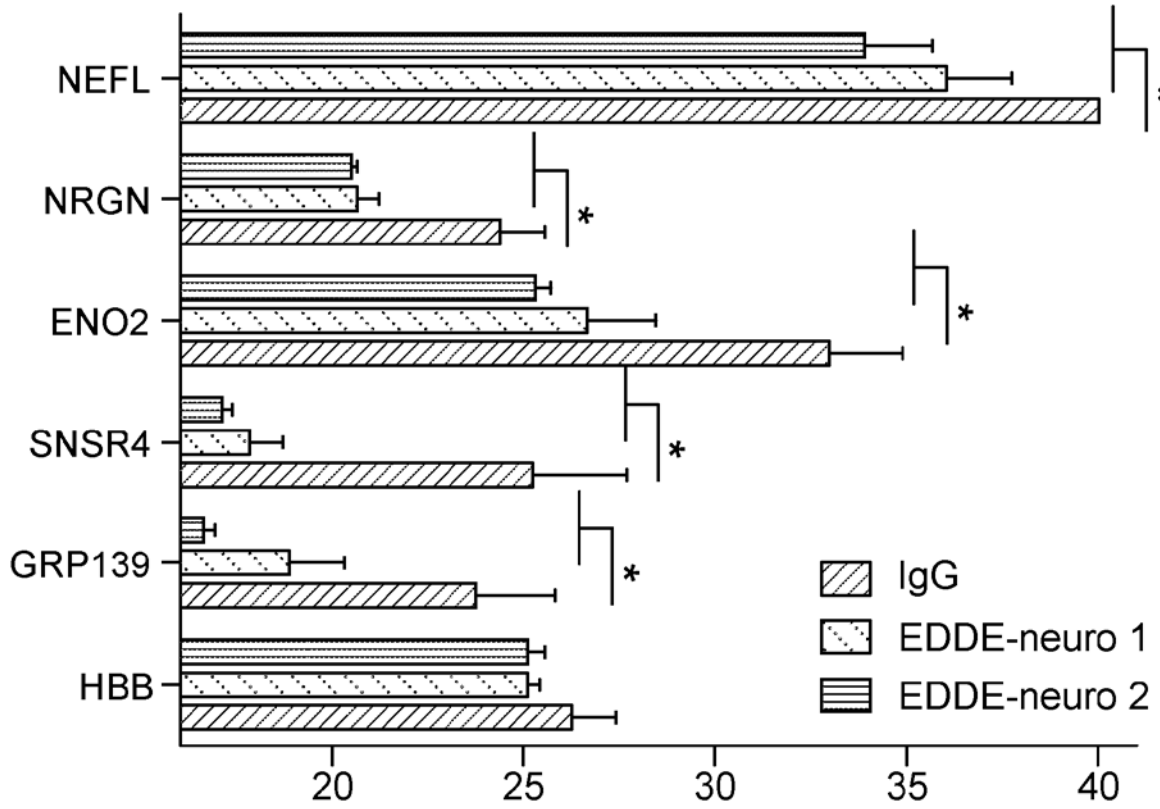


图 19A

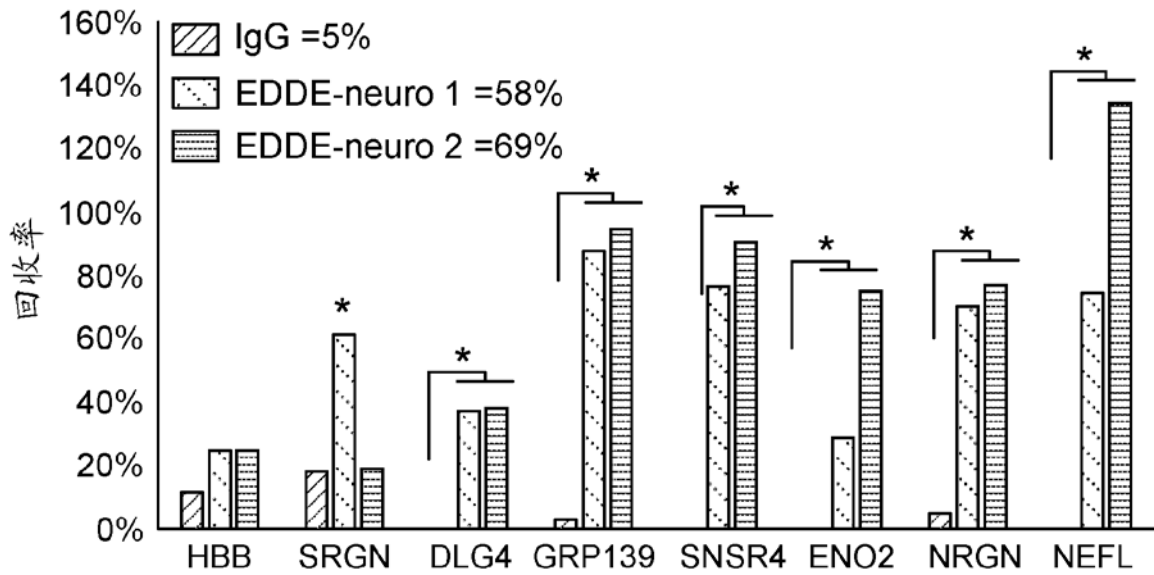


图 19B

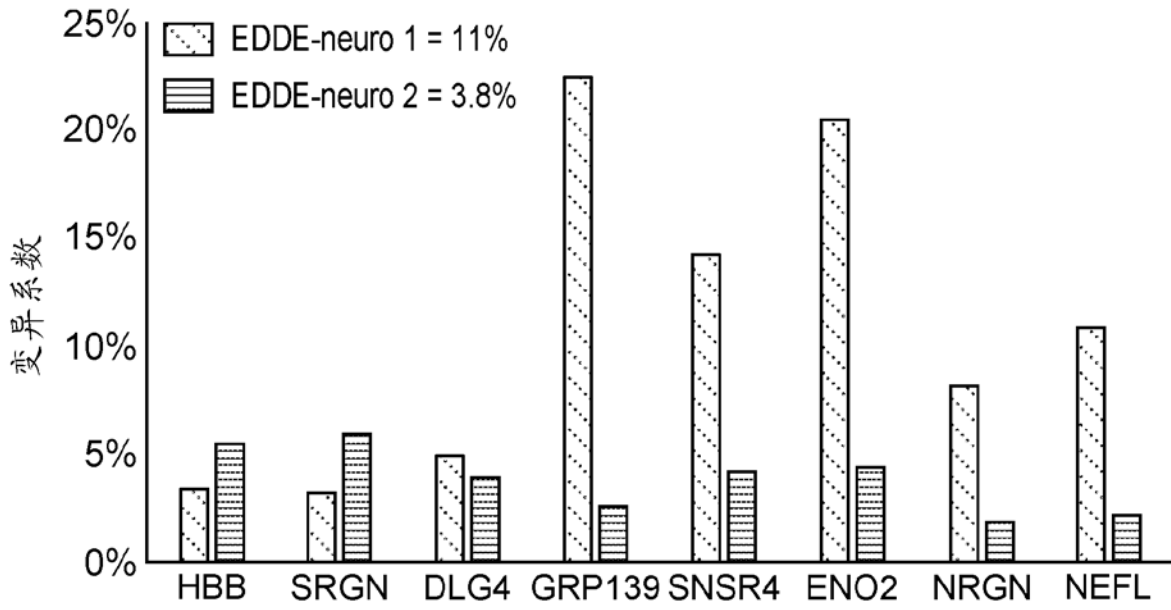


图 19C

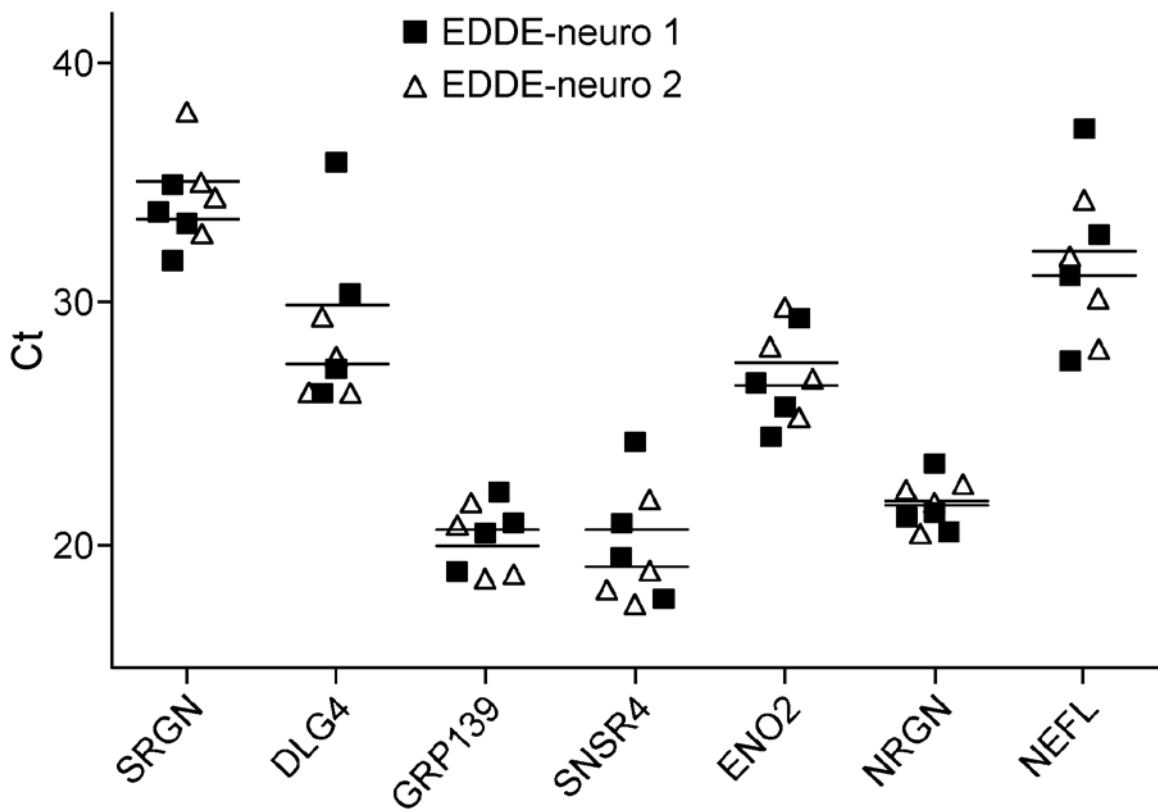


图 19D

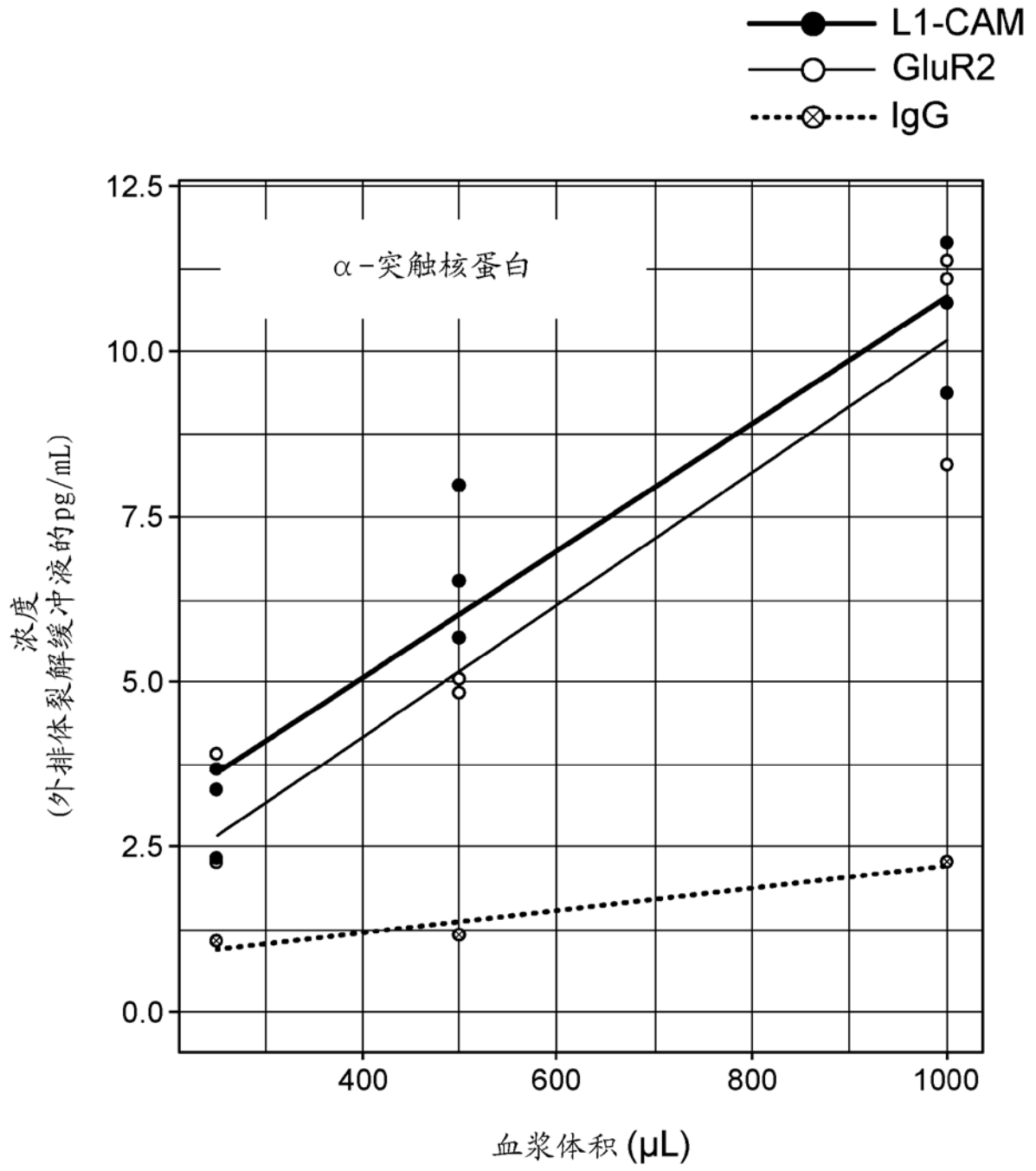
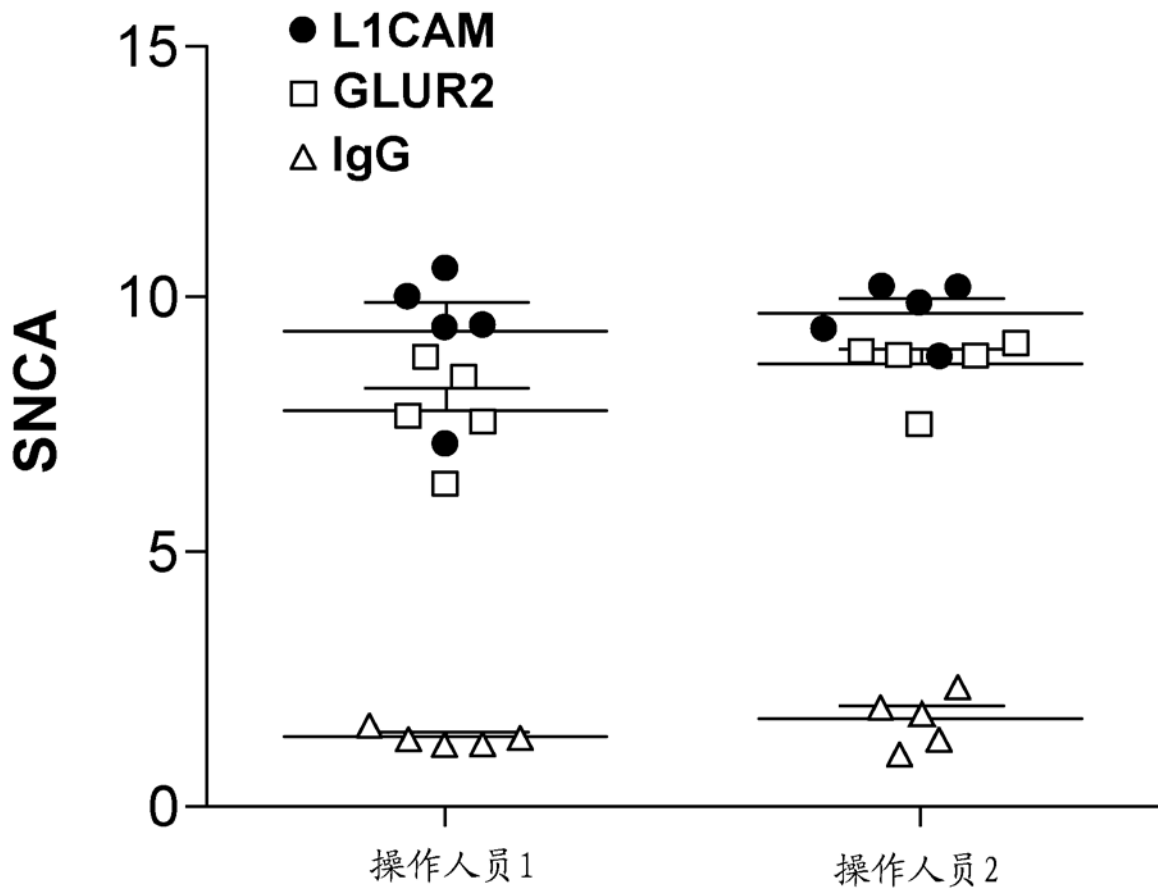


图 20A



	平均值	STDEV	CV
操作人员1	9.29	1.3	14.03%
操作人员2	9.69	0.59	6.15%

图 20B

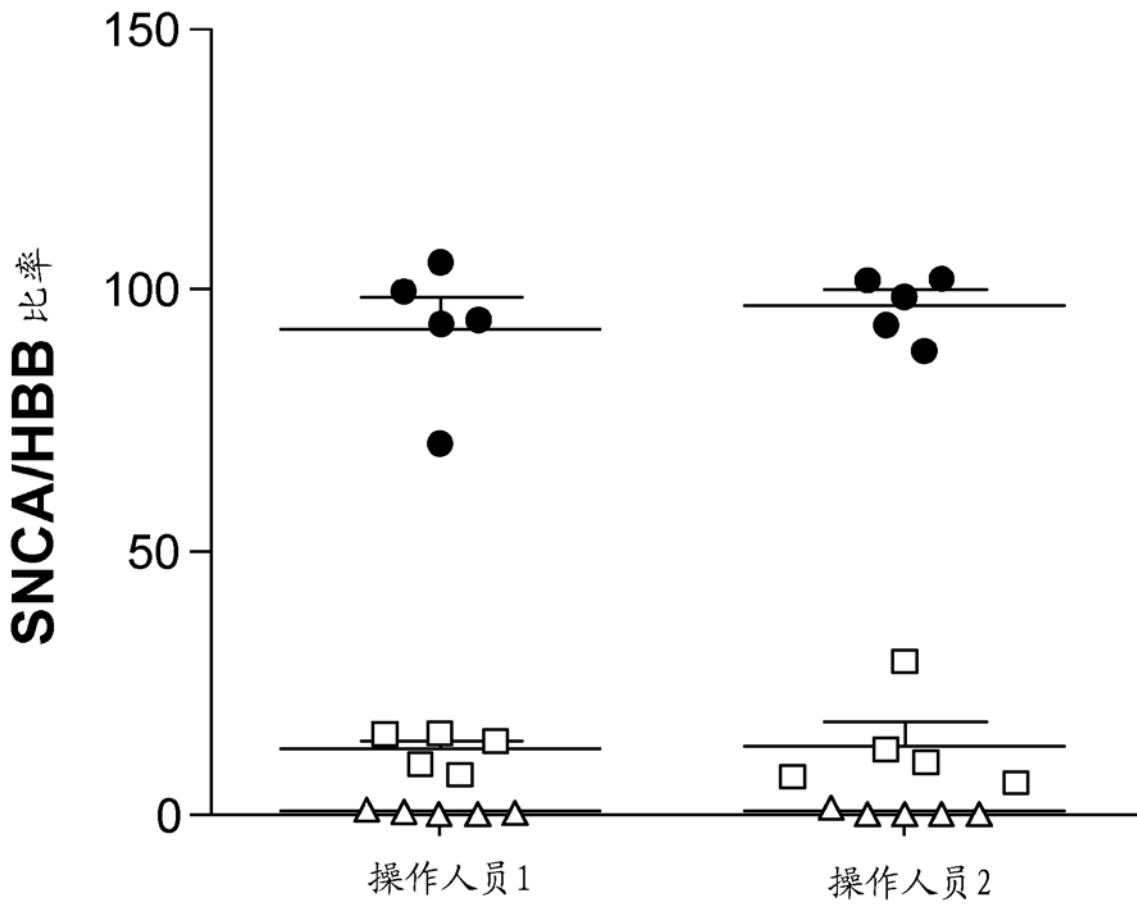


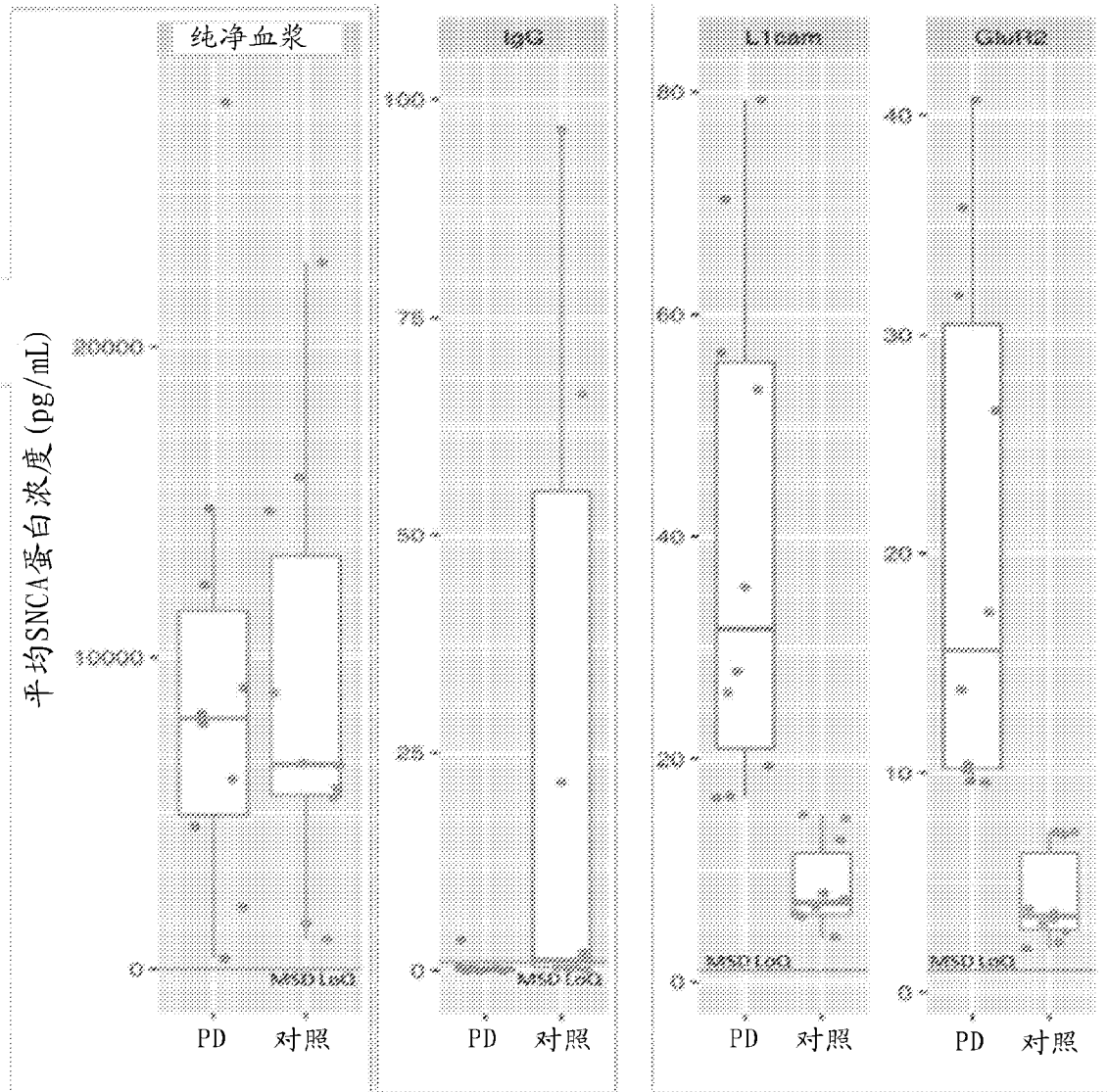
图 20C

图21A

图21B

图21C

图21D



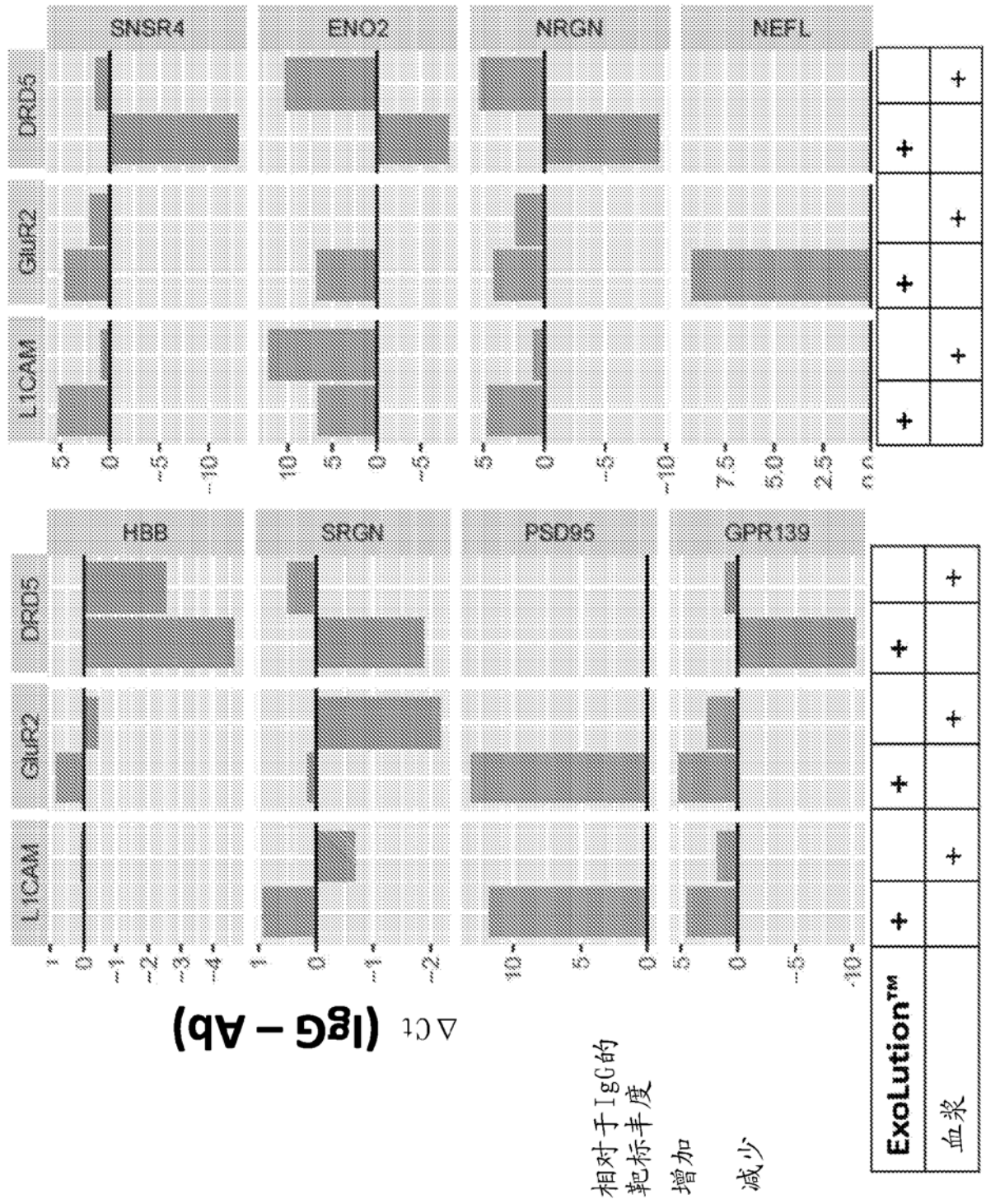


图 22A

	PSD95	NEFL
分离		
IgG	1/10	1/10
L1cam	5/9	4/9
GLUR2	7/8	5/8
ExoLution	3/4	3/4

图 22B

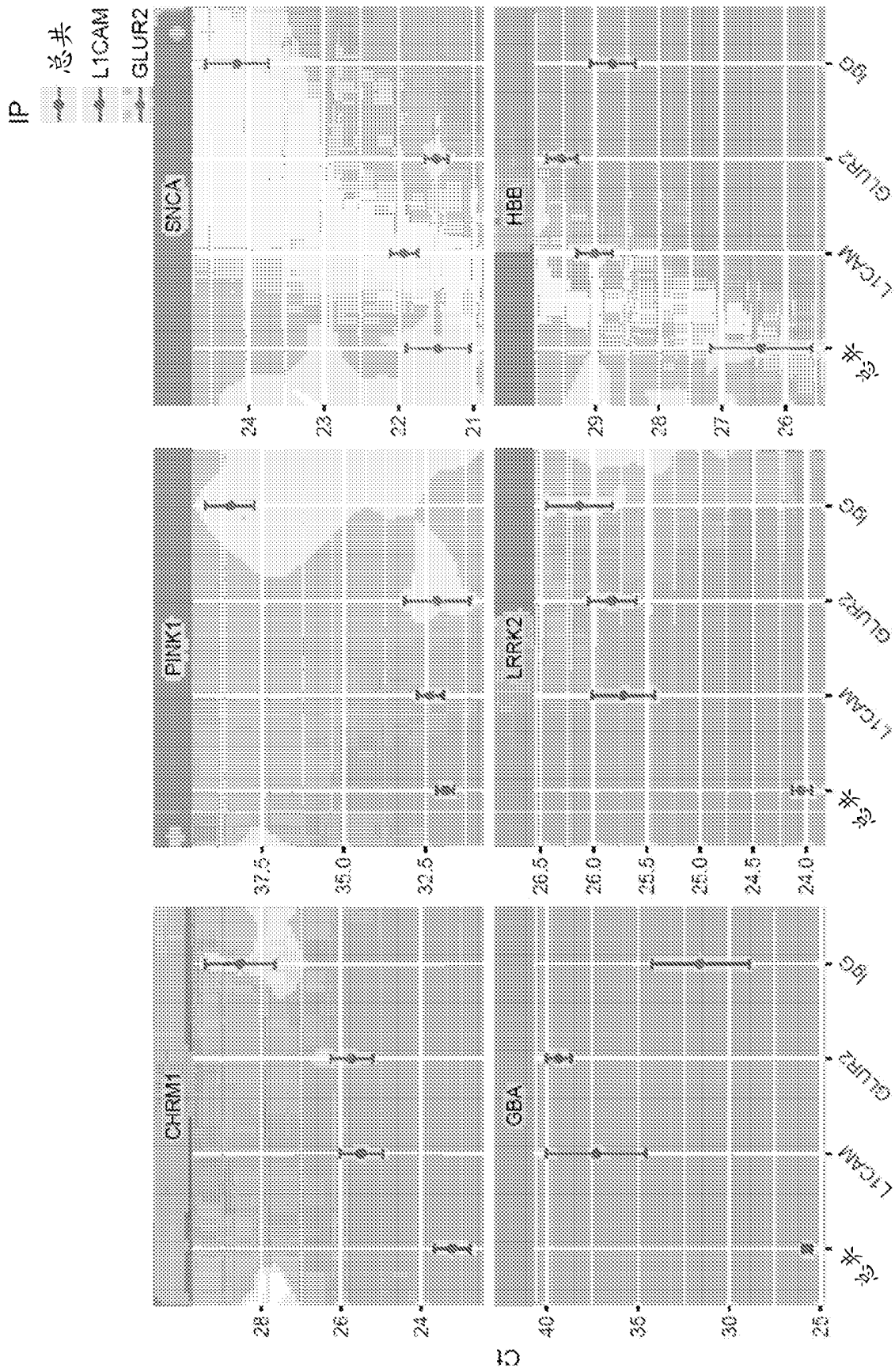


图 23

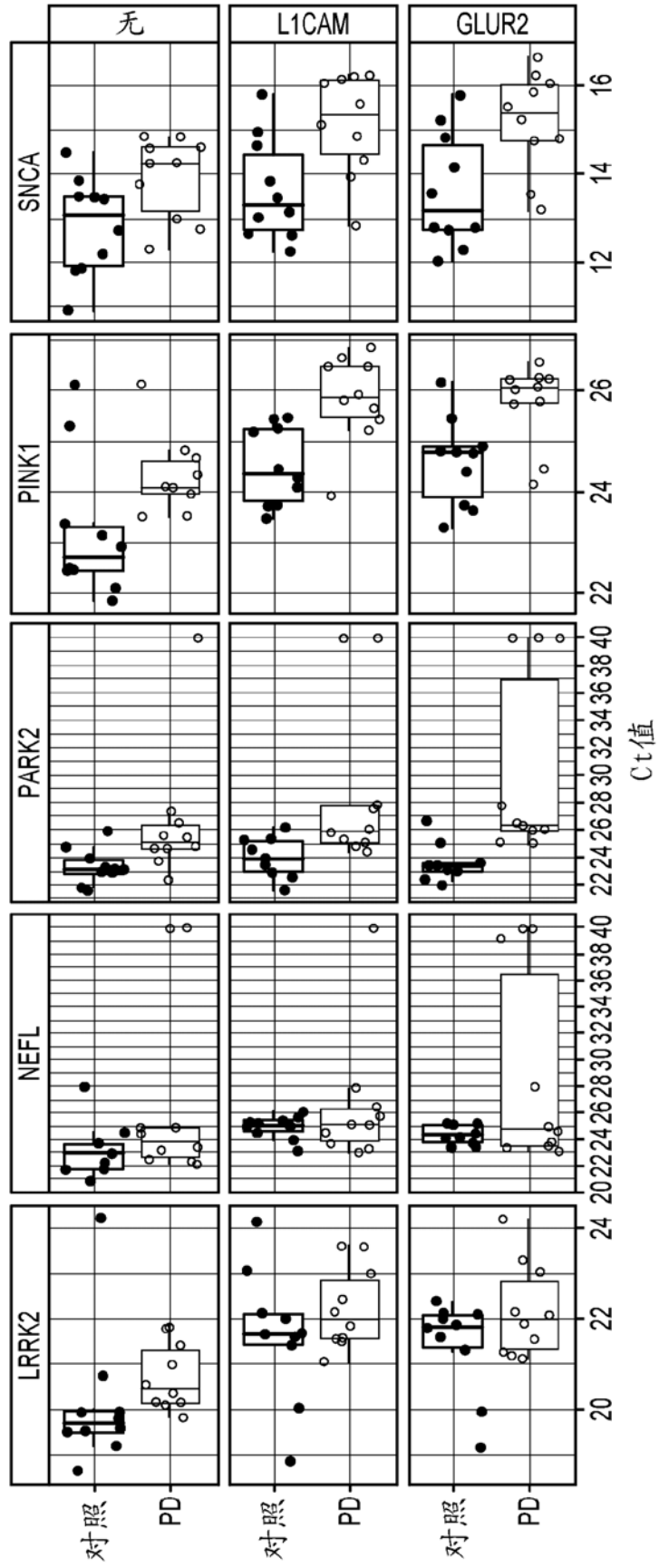


图 24A

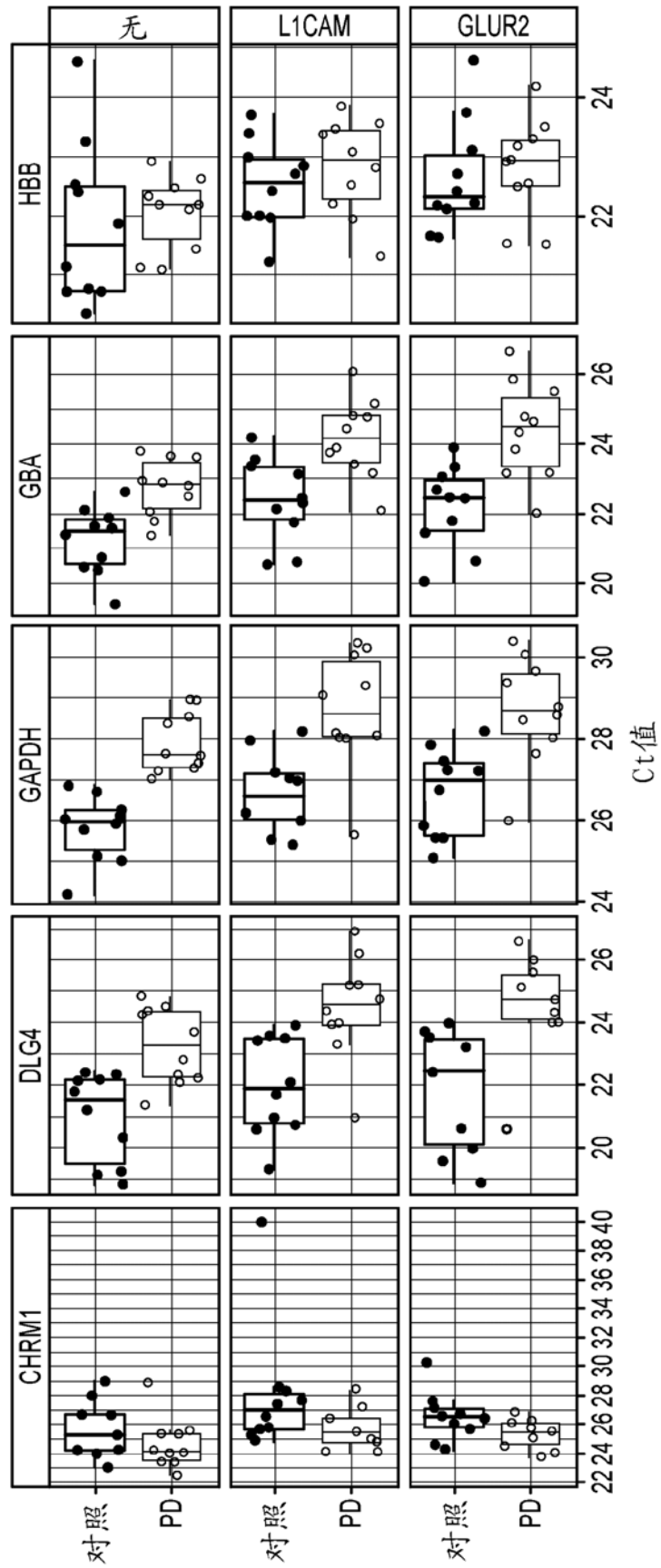


图 24B

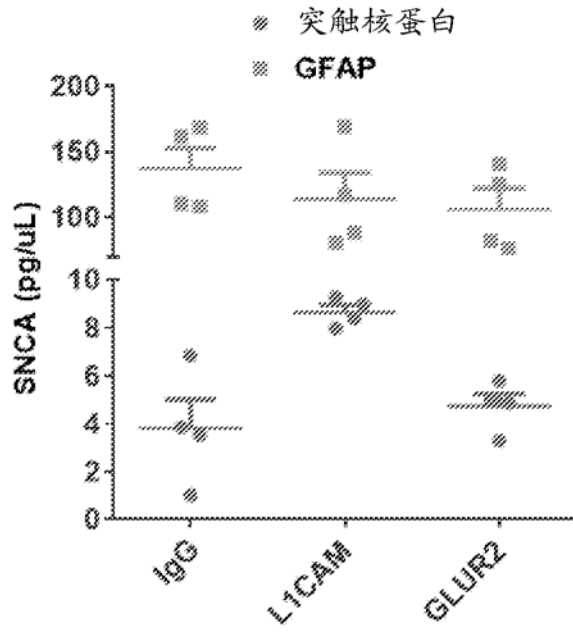


图 25