



(21) 申请号 202310590593.0

(22) 申请日 2022.10.24

(30) 优先权数据

63/270720 2021.10.22 US

(62) 分案原申请数据

202280006640.6 2022.10.24

(71) 申请人 塞弗德公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 E·索德斯滕

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 初明明 杨思捷

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6883 (2018.01)

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书1页 说明书59页
序列表(电子公布) 附图22页

(54) 发明名称

诊断和治疗结核病的组合物和方法

(57) 摘要

提供了用于检测疑似被结核分枝杆菌(MTB)感染的患者中的MTB感染以及用于将活动性结核病(ATB)、初始结核病(ITB)或亚临床结核病(STB)与潜伏性结核病和其它肺部和感染性疾病区分开的组合物和方法。所述方法还可以用于监测MTB感染的患者的治疗应答。基因表达水平的变化被用于辅助结核病的诊断、预后和治疗。

1. 用于测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平的试剂在制备用于基于测量的表达水平测试i) 活动性结核病、ii) 活动性结核病的高风险、iii) 活动性结核病的低风险或iv) 无结核病的试剂盒中的用途。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述测量表达水平包括进行聚合酶链式反应(PCR)。

3. 一种试剂盒,其包含用于测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平的试剂。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒,进一步包含筒。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其中所述筒包含与GBP5多核苷酸杂交的寡核苷酸、与DUSP3多核苷酸杂交的寡核苷酸以及与TBP多核苷酸杂交的寡核苷酸。

6. 根据权利要求3所述的试剂盒,进一步包含呈电子或印刷形式的信息,所述信息包含用于进行所述测量的使用说明。

诊断和治疗结核病的组合物和方法

[0001] 对相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2021年10月22日提交的美国临时申请号63/270,720的优先权,其公开内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 与本申请相关联的序列表XML以XML格式通过电子方式提供,且特此通过引用并入说明书中。含有序列表XML的XML文件的名称为“CEPH-002_001W0_SeqList”。该XML文件大小是17,758字节,创建于2022年10月24日,并且正在通过USPTO专利中心以电子方式提交。

[0005] 本公开内容的领域

[0006] 提供了用于辅助结核病(TB)的诊断、预后和治疗的组合物和方法。具体地,本公开内容涉及可用于检测具有结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)的活动性感染的患者并且还将活动性结核病(ATB)与潜伏性结核病和其它肺部和感染性疾病区分开的标志物和标志物组,其用于监测对抗-TB治疗的应答并预测从初始TB向ATB的进展。

[0007] 背景

[0008] 结核病(TB)是一个全球性的公共卫生问题,在2018年有900万例新感染和150万例死亡(Global Tuberculosis Programme, World Health Organization. Global tuberculosis report. 瑞士日内瓦: World Health Organization; 2019)。检测患者特异性的转录应答的宿主应答型聚合酶链式反应(PCR)试验有望用于检测活动性结核病感染。基因表达数据作为生物标志物来改善疾病的诊断和预后的用途取决于许多因素。例如,当多个靶基因的表达水平被以确定的方式组合以提供生物标志物的表达特征或表达评分时,通过RT-PCR的准确测量依赖于每个靶基因的转录物稳定性的一致水平。如果一个或多个靶基因相对于其它靶基因表现不同,则得到的特征或评分将受到影响。由预分析因子引起的实验条件的变化可以实质上独立地影响基因的转录物稳定性并从而影响基因表达数据。这在临床场合中尤其值得注意,因为在不同临床中心中的样品收集、样品处理和测定性能的差异先前已被证实会影响基因表达评分的准确性。但是,通常不进行多个基因的转录物稳定性在样品之间充分一致以生成特征的验证。

[0009] 需要利用生物标志物的诊断试验方法和试剂盒,所述生物标志物是稳定的并可以用于基因表达研究中。具体地,需要用于检测结核病感染的具有提高的准确性和可靠性的诊断试验方法和试剂盒。本公开内容解决了这些和其它需求。

[0010] 概述

[0011] 公开了用于在个体中鉴定结核病(TB)的存在或不存在并进一步确定被TB感染的那些个体的疾病阶段的组合物和方法。所公开的组合物和方法利用随时间和各种样品条件表现出表达水平的低(或类似)变异性的生物标志物的组合。所述组合物和方法在样品收集中存在高变异性的地方或需要运输和/或储存样品的地方是特别有用的。本文特别公开了生物标志物,其用于检测活动性结核病(ATB)、初始结核病(ITB)、亚临床结核病(STB)、潜伏性结核病(LTB)或TB阴性;将ATB与LTB和其它肺部和感染性疾病区分开;监测对结核病治疗的应答;预测从ITB向ATB的进展;和预测发生ATB的低风险或高风险。还公开了用于治疗患

者的方法,所述患者被鉴定为具有ATB、被鉴定为具有ITB、被鉴定为具有LTB、被鉴定为处于进展或发生ATB的风险中、或正在被监测使用本文描述的方法的治疗。本文中生物标志物的组合在室温、在升高的温度(诸如45°C或更高、40°C或更高、35°C或更高、30°C或更高或27°C或更高)或在较低温度(诸如23°C或更低、20°C或更低、15°C或更低、10°C或更低或5°C或更低)惊人地具有类似的转录物稳定性。所述生物标志物在上述温度随着时间的推移(诸如在1小时或更长,直到2小时或更长,直到5小时或更长,直到8小时或更长,直到12小时或更长,直到18小时或更长,或直到24小时或更长的时间内)也惊人地表现出类似的转录物稳定性。

[0012] 在某些方面,本公开内容提供了用于治疗患者的结核病的方法,其包含:(a)基于生物样品中生物标志物GBP5、DUSP3和TBP的表达水平,将所述患者鉴定为具有活动性结核病;和(b)给所述患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0013] 在某些其它方面,本公开内容提供了用于诊断和治疗患者中结核病感染的不同阶段的方法,其包含:(a)从所述患者获得第一生物样品;(b)测量所述第一生物样品中生物标志物DUSP3、GBP5和TBP的表达水平;(c)将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或与对照进行比较;(d)通过结合每种生物标志物的相应参考值范围来分析每种生物标志物的表达水平,将所述患者诊断为具有活动性结核病或初始结核病;和(e)给所述患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0014] 在某些其它方面,本公开内容提供了一种诊断患者中结核病感染的不同阶段的方法,其包含:(a)在从所述受试者得到的生物样品中测量生物标志物DUSP3、GBP5和TBP的表达水平;(c)将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或与对照进行比较;(d)通过结合每种生物标志物的相应参考值范围来分析每种生物标志物的表达水平,将所述患者诊断为具有活动性结核病或初始结核病。

[0015] 在某些其它方面,本公开内容提供了一种治疗患者中结核病感染的不同阶段的方法,其包含:(a)在从所述受试者得到的生物样品中测量生物标志物DUSP3、GBP5和TBP的表达水平;(c)将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或与对照进行比较;(d)通过结合每种生物标志物的相应参考值范围来分析每种生物标志物的表达水平,将所述患者诊断为具有活动性结核病或初始结核病;和(e)给所述患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0016] 在其它方面,本公开内容提供了用于监测受试者中的结核病感染(特别是在结核病治疗以后)的方法,其包含:(a)在从所述患者得到的第一生物样品中测量生物标志物DUSP3、GBP5和TBP的表达水平;(b)在从所述患者得到的第二生物样品中测量生物标志物GBP5、DUSP3和TBP的表达水平,其中所述第二生物样品在结核病治疗以后的第二时间点从所述患者得到;(c)将所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平与所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平进行比较,或基于所述第一生物样品和所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平来计算TB评分,以确定所述患者中的结核病感染是否改善或恶化;和(d)任选地施用第二治疗方案,其导致改善的患者健康情况。

[0017] 本文描述的患者可能(i)疑似被TB感染,(ii)疑似具有ATB、初始TB或亚临床TB,(iii)处于具有ATB的风险中(例如HIV共感染、ATB患者的家庭接触),(iv)积极接受对ATB的治疗并接受试验以监测治疗应答,或(v)正在接受TPT治疗并接受试验以监测治疗应答。如本文描述的,常规TB试验需要从下呼吸道咳出粘液(痰样品),这对卫生保健工作者的收集

和操作来说是不安全的。从儿童收集痰也很困难且具有侵入性,并且许多HIV+患者不会产生痰。在某些实例中,本文描述的患者可以是疑似不产生痰或难以从例如儿童、HIV+收集足够的痰样品和/或具有肺外TB的患者。

[0018] 从患者收集的生物样品可以是全血、痰、唾液、鼻拭子、外周血单核细胞(PBMC)、单核细胞或巨噬细胞。优选地,所述样品不是痰样品。在某些情况下,所述生物样品是通过毛细管(例如,从手指针刺)从患者收集的全血或抽取的静脉血。当样品是全血时,血液不需要加工/离心,但可以补充抗凝血剂(例如,EDTA)或RNA稳定缓冲剂。在诸如通过PCR分析所选择的生物标志物(DUSP3、GBP5和TBP)之前,可以将生物样品在室温、在升高的温度(诸如45°C或更高、40°C或更高、35°C或更高、30°C或更高或27°C或更高)或较低温度(诸如23°C或更低、20°C或更低、15°C或更低、10°C或更低或5°C或更低)运输和/或储存,并且仍然提供准确且可靠的基因表达数据。在某些情况下,可以将所述生物样品在所述温度保持1小时或更长、2小时或更长、5小时或更长、8小时或更长、12小时或更长、18小时或更长或24小时或更长的时间。因此,与用于本文方法的生物标志物的其它已知组合相比,生物标志物的靶组合(DUSP3、GBP5和TBP)能够使生物样品在室温或升高的温度保持更长的时间。

[0019] 生物标志物DUSP3和GBP5显示出响应于活动性结核病感染的表达变化,并且重要的是与感染阶段有关。表达的变化可以是过表达或低表达,并且可以随基因不同而异。在某些实施方案中,GBP5和DUSP3在具有结核病感染的患者中过表达。在某些实施方案中,GBP5和DUSP3在具有活动性结核病感染的患者中过表达。在某些实施方案中,GBP5和DUSP3在具有初始结核病感染的患者中过表达。在某些实施方案中,GBP5和DUSP3在具有亚临床结核病感染的患者中过表达。在具有活动性或初始结核病感染的患者中,TBP可能低表达或具有恒定表达水平。在某些实施方案中,TBP在不同的温度条件下和随着时间的推移表现出组成型表达,并且其表达水平相对于DUSP3和GBP5的表达水平是类似的。具体地,TBP相对于DUSP3和GBP5的表达稳定性在低温、室温或升高的温度下随着时间的推移是类似的,并因此产生的来自举例说明的3-基因方程式的表达评分不会受到影响。

[0020] 可以使用PCR来测量生物标志物的表达水平。例如,所述方法可以包含定量PCR或实时RT-PCR,其中RNA被反转录以产生cDNA,并且将cDNA通过PCR进行扩增。RT-PCR反应从初始变性步骤到最终延伸步骤需要小于2小时。在某些实施方案中,从初始变性到最后的延伸,反应需要小于2小时、小于1小时、小于45分钟、小于40分钟、小于35分钟、小于30分钟或小于25分钟。

[0021] 所述方法可以包含使来自样品的核酸与用于检测每种生物标志物的引物对接触。在某些实施方案中,所述引物对包含第一引物和第二引物,其中所述第一引物包含与每种生物标志物的至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的序列,且其中所述第二引物包含与每种生物标志物的至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的序列。

[0022] 所述方法可以包含当所述引物对的靶标存在时,从每个引物对形成扩增子。在某些实施方案中,每个引物对产生50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长或50-150个核苷酸长的扩增子。所述扩增子可以与至少一种探针接

触。在某些实施方案中,所述探针包含与所述生物标志物的至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或互补性的序列。在某些实施方案中,所述方法包含使所述扩增子与要分析的每种生物标志物的探针接触。

[0023] 每种探针可以包含可检测标记。在某些实施方案中,每种探针包含荧光染料和猝灭剂分子。在某些情况下,所述探针包含可检测地不同的可检测标记。在其它情况下,所述探针包含并非可检测地不同的可检测标记。在某些实施方案中,每种探针由13-30个核苷酸组成。

[0024] 本文中公开的方法可以包含形成外源对照扩增子。在某些实施方案中,所述方法包含使所述外源对照扩增子与对照探针接触,所述对照探针能够与外源对照扩增子选择性地杂交。

[0025] 如上所述,所述患者可以被诊断为具有ATB、ITB、LTB,或不具有ATB,从ITB进展成ATB的风险,发生ATB的低风险或高风险,或被监测以确定用于治疗向ATB的结核病进展的疗法的效力。在做出诊断以后,如果患者被诊断出具有ATB或ITB结核病,可以将有效量的至少一种抗生素施用给患者。抗生素的选择和治疗持续时间可以基于诊断进行选择。在某些情况下,可以给所述患者施用至少一种抗生素,其选自由以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。可以给具有活动性结核病的患者进一步施用有效量的皮质类固醇。对于正在监测结核病治疗的效力的患者,如果所述患者中的结核病感染正在恶化,则可以对所述患者施用第二治疗方案,其导致改善的患者健康情况。如果所述患者中的结核病感染正在改善,则所述患者可以继续其当前的结核病治疗。在某些情况下,本文描述的方法可以用作结核病分诊试验的一部分。TB分诊试验应当对个体进行分级,以进行确认性TB诊断试验(对于分诊试验阳性的患者)或进一步研究可能的非-TB病因(对于分诊试验阴性的患者)。

[0026] 本文还提供了试剂盒。所述试剂盒可以包含用于检测和/或测量生物标志物GBP5、DUSP3和TBP的表达水平的引物和探针,其中所述引物包含用于检测生物标志物GBP5的第一PCR引物对、用于检测生物标志物DUSP3的第二PCR引物对和用于检测生物标志物TBP的第三PCR引物对;并且其中所述探针包含用于检测生物标志物GBP5的至少一种PCR探针、用于检测生物标志物DUSP3的至少一种PCR探针和用于检测生物标志物TBP的至少一种PCR探针。每种探针可以包含可检测标记。例如,每种探针包含荧光染料和猝灭剂分子。在某些实施方案中,所述探针是荧光共振能量转移(FRET)探针。

[0027] 所述试剂盒可以包含外源对照。在某些实施方案中,所述外源对照是RNA对照。在某些实施方案中,所述RNA对照被包装在噬菌体保护壳中(例如,ARMORED®RNA)。在某些实施方案中,所述试剂盒包含dNTP和/或热稳定的聚合酶。在某些实施方案中,所述试剂盒包含反转录酶。在某些实施方案中,所述试剂盒含有用于检测内源对照RNA的引物和探针。

[0028] 本文中公开的方法、组合物和试剂盒提供了基于血液的、快速护理点宿主应答试验,其用于活动性、初始和亚临床结核病;用于将活动性结核病(ATB)与潜伏性结核病和其它肺部和感染性疾病区分开;用于监测对结核病治疗的应答和预测向ATB的进展。所述方法、组合物和试剂盒适用于将更多患者与偏远地区以及对于关键患者群体的适当护理联系

起来。

[0029] 附图简要描述

[0030] 图1A显示了在血液取样以后在室温 (RT) 时KLF2、DUSP3和GBP5生物标志物的稳定性变化和对应的 Δ TB-评分的图。

[0031] 图1B显示了在血液取样以后在室温 (RT) 时从TBP、DUSP3和GBP5的稳定性评分计算出的 Δ TBP-评分随着时间的推移的图。

[0032] 图2A显示了在血液取样以后在35°C时KLF2、DUSP3和GBP5生物标志物的稳定性变化和对应的 Δ TB-评分的图。

[0033] 图2B显示了在血液取样以后在35°C时从TBP、DUSP3和GBP5的稳定性评分计算出的 Δ TBP-评分随着时间的推移的图。

[0034] 图3A、图3B和图3C的图显示了对于不同的评分方程式使用接受者操作特征 (ROC) 分析针对Mtb培养物评价的XPert TB宿主应答RU0原型筒的性能： Δ TB-评分 = (GBP5+DUSP3)/2-KLF2, Δ TBP-评分 = (GBP5+DUSP3)/2-TBP或 Δ TBP/KLF2评分 = (GBP5+DUSP3)/2-(TBP+KLF2)/2。

[0035] 图3D、图3E和图3F的图显示了对于不同的评分方程式使用接受者操作特征 (ROC) 分析针对XPert MTB/RIF筒测定评价的XPert TB宿主应答RU0原型筒的性能： Δ TB-评分 = (GBP5+DUSP3)/2-KLF2, Δ TBP-评分 = (GBP5+DUSP3)/2-TBP或 Δ TBP/KLF2评分 = (GBP5+DUSP3)/2-(TBP+KLF2)/2。

[0036] 图4A、图4B和图4C的图显示了 Δ TB-评分 (图4A)、 Δ TBP-评分 (图4B) 和 Δ TBP/KLF2-评分 (图4C) 随着时间的推移的变化。图4D的图显示了使用合并的冷冻供体血液在不同的温度在加速试剂盒稳定性研究过程中 Δ TB-评分和 Δ TBP-评分的变化。在35°C在13个月以后没有观察到评分漂移。图4E的图显示了使用合并的冷冻供体血液在不同的温度在加速试剂盒稳定性研究过程中 Δ TBP-评分的变化。在35°C直到8周、在50°C直到6周和在55°C直到4周没有观察到评分漂移。

[0037] 图5的图显示了在GeneXpert上的半定量TB手指针刺测定的结果。

[0038] 图6描绘了包含外显子3和4的TBP的寡核苷酸序列 (SEQ ID NO:4)。

[0039] 图7显示了在抽血后0、1、3、5和7小时以及在21°C、25°C、28°C和35°C在原型筒上分析的6个供体的静脉血液样品中的 Δ TB-评分和TBP-评分的图。数据显示了从t=0每位供体的平均 (在t=0时8个技术重复, 在其它时间点时6个技术重复) Δ TB-评分和TBP-评分。 Δ TBP评分显示在所有温度和时间点从t=0的较低变异。

[0040] 图8A和图8B描绘了GBP5的寡核苷酸序列。

[0041] 图9A和图9B描绘了DUSP3的寡核苷酸序列。

[0042] 详细描述

[0043] 除非另有定义, 否则在本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开内容所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在本说明书中, 单数形式也包括复数形式, 除非上下文另外清楚地指明; 例如, 术语“一种”、“一个”和“所述”应理解为单数或复数, 并且术语“或”应理解为包括性的。作为实例, “一种感染”是指一种或多种感染。贯穿本说明书, 词语“包含 (comprising)”或变体诸如“包含 (comprises)”或“包含 (comprising)”应当理解为暗示包括所述要素、整数或步骤, 或者要素、整数或步骤的集合, 但不排除任何其它要素、

整数或步骤,或者要素、整数或步骤的集合。约可以被理解为在所述值的10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.05%或0.01%内。除非从上下文另外清楚,否则本文提供的所有数值均由术语“约”修饰。除非特别说明或者从上下文显而易见,否则本文中使用的术语“或”应理解为包括性的,并且覆盖“或”和“和”二者。

[0044] 定义

[0045] 为了促进本公开内容的理解,下面定义了许多术语和短语:

[0046] 本文中使用的术语“检测(detect、detecting或detection)”可以描述发现或辨别的一般行为或可检测地标记的组合物的具体观察。

[0047] 本文中使用的术语“可检测地不同”表示一组可以同时检测和区分的标记(诸如染料)。

[0048] 本文中使用的术语“患者”和“受试者”可互换使用以表示人。在某些实施方案中,本文描述的方法可以用在来自非人动物的样品上。

[0049] 本文中使用的术语“潜伏性结核病”、“潜伏性TB”、“LTB”或“LTBI”表示活的结核分枝杆菌感染,在没有任何重大免疫损害存在下,预计在不久的将来不会发生其向TB疾病的进展。这与当前的WHO定义在概念上较为相似,后者认为LTBI“有TB感染的证据,并且没有活动性TB疾病的临床、放射学或微生物学证据”。

[0050] 本文中使用的术语“初始结核病”或“初始TB”或“ITB”表示活的结核分枝杆菌感染,其在没有进一步干预存在下可能发展为活动性疾病,但尚未引起与活动性TB疾病一致的临床症状、放射摄影异常或微生物学证据。

[0051] 本文中使用的术语“亚临床结核病”或“亚临床TB”或“STB”表示由活的结核分枝杆菌引起的疾病,其不会造成临床TB相关症状,但会造成可以使用现有的放射学或微生物学测定检测到的其它异常。

[0052] 本文中使用的术语“活动性结核病”或“ATB”表示由活的结核分枝杆菌引起的疾病,其造成具有与活动性TB疾病一致的放射摄影异常或微生物学证据的临床症状。这将与当前的WHO定义保持一致,后者将活动性TB疾病视为“具有结核分枝杆菌的放射学或微生物学证据的有症状患者”。

[0053] 本文中使用的术语“寡核苷酸”、“多核苷酸”、“核酸分子”等表示含有核酸的分子,包括但不限于DNA或RNA。该术语涵盖包括DNA和RNA的任何已知碱基类似物的序列,所述碱基类似物包括但不限于4-乙酰基胞嘧啶、8-羟基-N6-甲基腺苷、氮杂环丙基胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-(羧基羟基甲基)尿嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代脲嘧啶、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假-尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基-鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基-胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基-氨基-甲基-2-硫代脲嘧啶、 β -D-甘露糖基Q核苷、5'-甲氧基羰基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、oxybutoxosine、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫代胞嘧啶、5-甲基-2-硫代脲嘧啶、2-硫代脲嘧啶、4-硫代脲嘧啶、5-甲基尿嘧啶、N-尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、尿嘧啶-5-氧基乙酸、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫代胞嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。

[0054] 本文中使用的术语“寡核苷酸”表示具有少于500个核苷酸的单链多核苷酸。在某

些实施方案中,寡核苷酸是8-200、8-100、12-200、12-100、12-75或12-50个核苷酸长。寡核苷酸可以用其长度来表示,例如,24-残基寡核苷酸可以被称作“24-聚体”。

[0055] 本文中使用的术语与靶RNA(或其靶区域)“互补”,和探针序列与靶RNA序列的“互补性”百分比,是与靶RNA的序列或与靶RNA的序列的反向互补物的“同一性”百分比。在确定本文所述组合中使用的探针(或其区域)与靶RNA(诸如本文所公开的那些)之间的“互补性”的程度时,将“互补性”的程度表示为探针(或其区域)的序列和与之最佳对齐的靶RNA的序列或靶RNA的序列的反向互补物之间的同一性百分比。如下计算百分比:计数2个序列之间相同的对齐碱基的数目,除以探针中邻接核苷酸的总数,并乘以100。当使用术语“互补”时,除非另外指出,否则对象寡核苷酸与靶分子具有至少90%互补性。在某些实施方案中,对象寡核苷酸与靶分子具有至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补性。

[0056] 本文中使用的“引物”或“探针”表示寡核苷酸,其包含与靶核酸分子,诸如DNA(例如,靶基因)或mRNA(或从mRNA反转录的DNA)的至少8个邻接核苷酸的序列互补的区域。在某些实施方案中,引物或探针包含与靶分子的至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个邻接核苷酸的序列互补的区域。当引物或探针包含“与靶分子的至少x个邻接核苷酸互补”的区域时,所述引物或探针与靶分子的至少x个邻接核苷酸具有至少95%互补性。在某些实施方案中,所述引物或探针与靶分子具有至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%互补性。

[0057] 术语“引物对”表示一组引物,其包括与待扩增的DNA序列的5'末端的互补物杂交的5'“上游引物”或“正向引物”、以及与待扩增的序列的3'末端杂交的3'“下游引物”或“反向引物”。如本领域技术人员将认识到的,术语“上游”和“下游”或“正向”和“反向”无意是限制性的,而是在某些实施方案中提供示例性取向。

[0058] 术语“核酸扩增”涵盖通常以模板依赖性的方式复制至少一种靶核酸的至少一部分的任何手段,包括但不限于用于以线性方式或以指数方式扩增核酸序列的广泛技术。用于进行扩增步骤的示例性手段包括聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)、连接酶检测反应(LDR)、多路连接依赖性的探针扩增(MLPA)、连接后Q复制酶扩增、引物延伸、链置换扩增(SDA)、超支化链置换扩增、多重置换扩增(MDA)、基于核酸链的扩增(NASBA)、两步多路扩增、滚环扩增(RCA)、重组酶聚合酶扩增等,包括多路版本及其组合,例如但不限于OLA/PCR、PCR/OLA、LDR/PCR、PCR/PCR/LDR、PCR/LDR、LCR/PCR、PCR/LCR(也被称作组合链式反应--CCR)、数字扩增等。除了其它来源以外,这样的技术的描述可以参见:Ausbel等人;PCR Primer:A Laboratory Manual,Diffenbach编,Cold Spring Harbor Press(1995);The Electronic Protocol Book,Chang Bioscience(2002);Msuih等人,J.Clin.Micro.34:501-07(1996);The Nucleic Acid Protocols Handbook,R.Rapley编,Humana Press, Totowa,N.J.(2002);Abramson等人,Curr Opin Biotechnol.1993年2月;4(1):41-7,美国专利号6,027,998;美国专利号6,605,451,Barany等人,PCT公开号W0 97/31256;Wenz等人,PCT公开号W0 01/92579;Day等人,Genomics,29(1):152-162(1995),Ehrlich等人,Science 252:1643-50(1991);Innis等人,PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Academic Press(1990);Favis等人,Nature Biotechnology 18:561-64

(2000);和Rabenau等人, *Infection* 28:97-102 (2000);Belgrader,Barany和Lubin, Development of a Multiplex Ligation Detection Reaction DNA Typing Assay, Sixth International Symposium on Human Identification, 1995 (可在万维网上得到: promega.com/geneticidproc/ussymp6proc/blegrad.html); LCR Kit Instruction Manual, Cat.#200520, Rev.#050002, Stratagene, 2002; Barany, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:188-93 (1991); Bi和Sambrook, *Nucl. Acids Res.* 25:2924-2951 (1997); Zirvi等人, *Nucl. Acid Res.* 27:e40i-viii (1999); Dean等人, Proc Natl Acad Sci USA 99:5261-66 (2002); Barany和Gelfand, *Gene* 109:1-11 (1991); Walker等人, *Nucl. Acid Res.* 20:1691-96 (1992); Polstra等人, *BMC Inf. Dis.* 2:18- (2002); Lage等人, *Genome Res.* 2003年2月; 13 (2):294-307, 和Landegren等人, *Science* 241:1077-80 (1988), Demidov, V., *Expert Rev Mol Diagn.* 2002年11月; 2 (6):542-8., Cook等人, *J Microbiol Methods.* 2003年5月; 53 (2):165-74, Schweitzer等人, *Curr Opin Biotechnol.* 2001年2月; 12 (1):21-7, 美国专利号5,830,711, 美国专利号6,027,889, 美国专利号5,686,243, PCT公开号W00056927A3和PCT公开号W09803673A1。

[0059] 在某些实施方案中, 扩增包含以下相继程序的至少一个循环: 使至少一种引物与至少一种靶核酸中的互补或基本上互补的序列一起退火; 使用聚合酶以模板依赖性的方式合成至少一条核苷酸链; 和使新形成的核酸双链体变性以分离链。可以重复或可以不重复该循环。扩增可以包含热循环, 或可以等温进行。

[0060] 除非另外指出, 否则术语“杂交”在本文中用于表示“特异性杂交”, 其是核酸分子优先与特定核苷酸序列, 在某些实施方案中在严格条件下的结合、双链体形成或杂交。术语“严格条件”表示探针将优先与其靶序列杂交, 并在较小程度上或根本不与其它序列杂交的条件。在核酸杂交 (例如, 阵列、DNA印迹或RNA印迹杂交) 的背景中的“严格杂交”和“严格杂交洗涤条件”是序列依赖性的, 并且在不同的环境参数下是不同的。关于核酸杂交的广泛指导参见, 例如, Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Acid Probes* 第I部分, 第2章, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays,” Elsevier, NY (“Tijssen”)。通常, 用于滤膜杂交的高度严格杂交和洗涤条件被选择为比特定序列在确定的离子强度和pH下的热熔点 (T_m) 低约5°C。 T_m 是使50%的靶序列与完美匹配的探针杂交时的温度 (在确定的离子强度和pH下)。非常严格的条件被选择为等于特定探针的 T_m 。杂交严格性对缓冲液组成、温度和探针长度的依赖性是本领域技术人员众所周知的 (参见, 例如, Sambrook和Russell (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第3版) 第1-3卷, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY)。

[0061] 本文中使用的“样品”或“生物样品”包括从受试者分离的组织、细胞或流体的各种样品, 包括但不限于例如全血、血沉棕黄层、血浆、血清、免疫细胞 (例如, 单核细胞或巨噬细胞) 和痰。在某些实施方案中, 所述样品包含缓冲剂, 例如抗凝血剂和/或防腐剂。在某些实施方案中, 将全血与肝素在肝素锂血液收集管中混合。所述样品可以来自含有表达的生物标志物的任何体液、组织或细胞。可以通过常规技术从受试者获得生物样品。例如, 可以通过静脉穿刺术或手指针刺毛细管获得血液, 并可以根据本领域众所周知的方法通过外科技术获得固体组织样品。在某些方面, 将血液样品放入为测定特别设计的管中。

[0062] 本文中使用的“内源对照”表示在要用于检测的样品中天然存在的部分。在某些实施方案中,内源对照是“样品足够性对照”(SAC),其可以用于确定在测定中是否使用了足够的样品,或者样品是否包含足够的生物材料,诸如细胞。在某些实施方案中,内源对照是RNA(诸如mRNA、tRNA、核糖体RNA等),诸如人RNA。非限制性的示例性内源对照包括CD3E、TBP、CD4、CD8B、B2M、ABL mRNA、GUSB mRNA、GAPDH mRNA、TUBB mRNA和UPK1a mRNA。在某些实施方案中,选择这样的内源对照,诸如SAC,其可以以与检测靶RNA相同的方式进行检测,并且在某些实施方案中,与靶RNA同时检测。对照可以用于相对定量,例如归一化标志物的基因表达水平,和用于为样品稳定性建立Ct截止值。

[0063] 本文中使用的“外源对照”表示添加到样品或测定中的部分,诸如“样品处理对照”(SPC)。在某些实施方案中,外源对照与测定试剂一起被包括。通常选择这样的外源对照,其预期不存在于要用于检测的样品中,或以非常低的水平存在于样品中,使得在样品中天然存在的部分的量不可检测或以比作为外源对照添加到样品中的量低得多的水平检测到。在某些实施方案中,外源对照包含预期不存在于用于检测靶RNA的样品类型中的核苷酸序列。在某些实施方案中,外源对照包含已知不存在于从其获取样品的物种中的核苷酸序列。在某些实施方案中,外源对照包含来自与从其获取样品的受试者不同的物种的核苷酸序列。在某些实施方案中,外源对照包含未知存在于任何物种中的核苷酸序列。在某些实施方案中,选择这样的外源对照,其可以以与检测靶RNA相同的方式检测,并且在某些实施方案中,与靶RNA同时检测。在某些实施方案中,所述外源对照是RNA。在某些这样的实施方案中,所述外源对照是ARMORED[®] RNA,其包含被包装在噬菌体保护壳中的RNA。参见,例如,WalkerPeach等人,Clin.Chem.45:12:2079-2085(1999)。

[0064] 在本公开内容中,术语“靶RNA”和“靶基因”可互换使用以表示本文描述的任何生物标志物基因,以及外源和/或内源对照。因此,应当理解,当以靶基因的方式呈现讨论时,该讨论特别意图涵盖生物标志物基因、任何内源对照(例如,SAC)和任何外源对照(例如,SPC)。

[0065] 在本文的序列中,“U”和“T”可互换使用,使得这两个字母都表示在该位置的尿嘧啶或胸腺嘧啶。本领域技术人员将从上下文和/或预期用途理解尿嘧啶或胸腺嘧啶是否是预期的和/或应该在序列中的该位置使用。例如,本领域技术人员将理解,天然RNA分子通常包括尿嘧啶,而天然DNA分子通常包括胸腺嘧啶。因此,在RNA序列包括“T”的情况下,本领域技术人员将理解,在天然RNA中的该位置可能是尿嘧啶。

[0066] 在本公开内容中,“选自……的序列”涵盖“选自……的一个序列”和“选自……的一个或多个序列”。因此,当使用“选自……的序列”时,应当理解,可以选择所列出的序列中的一个或者超过一个。

[0067] 在本公开内容中,短语“表达的水平”、“表达水平”和“量”可互换使用以表示存在于给定的生物样品中或来自从生物样品提取的生物材料的特定分子(例如,特定RNA转录物)的量。“表达的水平”或“表达水平”可以表示定量地测量其丰度的mRNA或蛋白的表达。

[0068] 短语“差异地表达”表示与对照受试者或未感染的受试者相比,从具有例如结核病的患者取出的样品中存在的生物标志物的数量和/或频率的差异。例如,生物标志物可以是多核苷酸,其与对照受试者的样品相比,在具有MTB、ATB、初始TB、亚临床TB或LTBI的患者的样品中以升高的水平或降低的水平存在。可替换地,生物标志物可以是多核苷酸,其与对照

受试者的样品相比,在结核病患者样品中以更高的频率或以更低的频率检测到。生物标志物可以在数量、频率或两者方面差异地存在。

[0069] 如果一个样品中的多核苷酸的量与另一个样品中的该多核苷酸的量在统计学上显著不同,则所述多核苷酸在两个样品之间差异地表达。例如,如果多核苷酸的存在量是它在另一个样品中的存在量的至少约120%、至少约130%、至少约150%、至少约180%、至少约200%、至少约300%、至少约500%、至少约700%、至少约900%或至少约1000%,或者如果它在一个样品中可检测到而在另一个样品不可检测到,则所述多核苷酸在两个样品中差异地表达。

[0070] 可替换地或额外地,如果多核苷酸在被MTB感染的患者的样品中检测到的频率在统计学上显著高于或低于对照样品,或者如果具有ATB的患者在统计学上显著高于或低于具有初始TB、亚临床TB或LTBI的样品,则所述多核苷酸在两组样品中差异地表达。例如,如果多核苷酸在一组样品观察到的检测频率比在另一组样品中高到或低到至少约120%、至少约130%、至少约150%、至少约180%、至少约200%、至少约300%、至少约500%、至少约700%、至少约900%或至少约1000%,则所述多核苷酸在两组样品中差异地表达。

[0071] “生物标志物”在本公开内容的上下文中表示生物化合物,诸如多核苷酸或多肽,其与从对照受试者(例如,具有潜伏性结核病或其它肺部和感染性疾病的患者或未感染的受试者)取出的可比较样品相比,在从具有ATB、ITB或STB的患者取出的样品中差异地表达。所述生物标志物可以是可检测和/或定量的核酸、核酸片段、多核苷酸或寡核苷酸。结核病生物标志物包括包含来自基因或基因的RNA转录物的核苷酸序列的多核苷酸,包括但不限于DUSP3、GBP5、TBP,及其表达产物。

[0072] 术语“诊断”和“诊断学”还分别涵盖术语“预后”和“预后学”,以及在两个或更多个时间点应用这样的程序随着时间的推移而监测诊断和/或预后,以及基于此的统计建模。此外,术语诊断包括:a. 预测(确定患者是否可能发展成侵袭性疾病),b. 预后(预测患者在未来预选的时间是否可能有更好或更坏的结果),c. 疗法选择,d. 治疗药物监测,以及e. 复发监测。

[0073] 本文中使用的术语“治疗(treating)”或“治疗(treat)”描述了为了对抗疾病、病症或障碍的目的而对患者的管理和护理,并且包括本文描述的任何结核病治疗或本领域已知的任何其它结核病治疗的施用,以减轻疾病、病症或障碍的症状或并发症,或消除疾病、病症或障碍。术语“治疗”还可以包括体外细胞或动物模型的处理。应当明白,对“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”的提及包括病症的既有症状的减轻。因此,状态、障碍或病症的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括:(1) 预防在人中发生的状态的临床症状的出现或延迟在人中发生的状态、障碍或病症的临床症状的出现,所述人可能患有或易患所述状态、障碍或病症,但尚未经历或显示所述状态、障碍或病症的临床或亚临床症状,(2) 抑制所述状态、障碍或病症,即,阻止、减少或延迟疾病的发展或其复发(在维持治疗的情况下)或其至少一种临床或亚临床症状,或(3) 缓解或减轻疾病,即,引起所述状态、障碍或病症或其临床或亚临床症状中的至少一种的消退。

[0074] 本文中使用的术语“预防(preventing)”、“预防(prevent)”或“保护免于”描述了减少或消除这样的疾病、病症或障碍的症状或并发症的发作。

[0075] 术语药剂或化合物的“有效量”和“治疗有效量”在最宽的含义上使用以表示无毒

的、但足够量的活性剂或化合物以提供期望的作用或益处。

[0076] 术语“益处”在最宽的含义上使用,并且表示任何期望的效果并具体地包括如本文定义的临床益处。临床益处可以通过评估各种终点来衡量,例如,疾病进展在某种程度上的抑制,包括减慢和完全阻止;疾病发作和/或症状的数目的减少;病灶尺寸的减小;疾病细胞向邻近周围器官和/或组织中的浸润的抑制(即减少、减慢或完全停止);疾病传播的抑制(即减少、减慢或完全停止);受试者中感染的传播的抑制(即减少、减慢或完全停止);自身免疫应答的减少,这可能、但不一定导致疾病病灶的消退或消融;与障碍相关的一种或多种症状在某种程度上的缓解;在治疗后无疾病呈现的持续时间(例如无进展存活期)的增加;增加的总体存活率;更高的应答率;和/或在治疗后给定时间点降低的死亡率。

[0077] 熟练的技术人员将理解,术语“GBP5”表示鸟苷酸结合蛋白5及其任何同种型。GBP5的核苷酸序列的一个实例在登录号CH471097或AC099063下公开在NCBI数据库中。

[0078] 熟练的技术人员将理解,术语“DUSP3”表示双重特异性磷酸酶3及其任何同种型。DUSP3的核苷酸序列的一个实例在登录号CH471178.2或AC003098下公开在NCBI数据库中。

[0079] 熟练的技术人员将理解,术语“TBP”表示TATA盒结合蛋白及其任何同种型。TBP是真核生物转录起始机器的关键组分。它在几种参与核心启动子识别和起始前复合物的组装的复合物中发挥作用。通过基因复制,真核生物扩大了其TATA结合蛋白的库,从而导致转录机器的可变组成。TBP的核苷酸序列的一个实例在登录号AL031259.1或AY368204.1下公开在NCBI数据库中。

[0080] 鉴定活动性结核病感染

[0081] PCR试验已成为用于检测活动性TB感染的一种广泛应用的诊断技术。但是,为了得出生物学上有意义的且值得信赖的结论,需要考虑工作流程中的许多关键组成部分。具体地,非常确定的是,由不一致的样本收集操作、处理和提取引起的分析前条件的差异(包括生物样品的类型和大小、使用的容器、至处理的延迟的持续时间和温度、保存方法、储存的温度和持续时间、冻融循环的次数和归一化)在任何实验室试验中都会引入显著的偏差来源。当用于下游分析的所需核酸包括有时可能容易被内源性或外源性核酸酶活性降解的核糖核酸(RNA)时,这会进一步加剧与希望从中获得核酸的生物样品的收集和操作相关的问题。鉴定并最小化由分析前变异性引入的影响是困难的,因为这样的影响经常在性质上不是总体性的,而是可能对所使用的生物样品的类型、受影响的基因或转录物具有特异性。为了避免在PCR诊断试验中生物标志物的数据分析和解释中的陷阱,生物标志物和内部对照的选择是至关重要的。

[0082] 本文公开了检测患者的特异性转录应答的宿主应答型PCR试验,其用于检测活动性、亚临床或初始结核病(ATB、ITB或STB)感染,将活动性结核病(ATB)与潜伏性结核病和其它肺部和感染性疾病区分开,预测发生ATB的低风险或高风险,监测对结核病治疗的应答,和预测从ITB向ATB的进展。

[0083] 本发明人已经开发了用于准确地检测被ATB、ITB或STB感染的个体和将活动性结核病感染与其它疾病区分开的方法。本文中公开的方法利用在室温、在升高的温度或在较低温度随着时间的推移惊人地具有类似的转录物稳定性的生物标志物的组合。所述方法包含测量一组生物标志物DUSP3(双重特异性磷酸酶3)、GBP5(鸟苷酸结合蛋白5)和TBP(TATA盒结合蛋白)的表达水平,并分析该组生物标志物以产生第一特征以诊断结核病感染的存

在或不存在。GBP5、DUSP3和TBP是一种自我归一化宿主应答特征。因此,在所研究的条件下基因特征的稳定表达在qRT-PCR分析中是至关重要的。对于需要长稳定时间的试验条件,如果所有靶标都受到同等影响,则容忍酶活性的降低;并且如果所有靶标以类似的动力学衰变,则容忍样品降解。DUSP3、GBP5和TBP在不同的温度条件下随时间表现出表达稳定性的低变异性,这在提供准确且可靠的基因表达数据中是重要的。每个基因的表达稳定性可以确定为归一化至持家基因的来自RT-qPCR的 ΔCt 值。3个基因(DUSP3、GBP5和TBP)的表达稳定性可以根据方程式 $(GBP5+DUSP3)/2-TBP$ 并如在实施例所述确定为 ΔTBP 评分(术语“ ΔTBP 评分”和“TBP评分”在本文中可互换地使用)。正TB-评分漂移指示降低的敏感性(和增加的特异性),而负TB-评分漂移指示降低的特异性(和增加的敏感性)。表达的低变异性对应于作为时间和/或温度的函数的恒定或漂移小于 ± 0.5 (小于 ± 0.4 、小于 ± 0.3 或小于 ± 0.2)的 ΔTBP -评分。

[0084] 在维持在室温、在升高的温度(诸如 45°C 或更高、 40°C 或更高、 35°C 或更高、 30°C 或更高或 27°C 或更高)或较低温度(诸如 23°C 或更低、 20°C 或更低、 15°C 或更低、 10°C 或更低或 5°C 或更低)的样品中,DUSP3、GBP5和TBP表现出低表达变异性(恒定或漂移小于 ± 0.5 的 ΔTBP -评分)。在维持在所述温度1小时或更长、2小时或更长、5小时或更长、8小时或更长、12小时或更长、18小时或更长或24小时或更长的时间的样品中,DUSP3、GBP5和TBP也表现出低表达变异性。本文描述的每种生物标志物的表达水平相对于对照受试者的生物标志物的参考值范围的变化指示结核病。例如,与对照受试者的生物标志物的参考值范围相比,GBP5或DUSP3的表达水平增加指示所述患者具有活动性结核病。与对照受试者的生物标志物的参考值范围相比,TBP的表达水平在具有结核病的患者中可能是恒定或降低的。与其它生物标志物相比,TBP在时间和温度上已经令人惊讶地表现出与GBP5和DUSP3类似的表达变异性(或类似的降解速率)。GBP5、DUSP3和KLF2的组合是一种自我归一化特征,因为KLF2可以作为持家基因。因此,在所研究的条件下持家基因的稳定表达在qRT-PCR分析中是至关重要的。对于需要长稳定时间的试验条件,如果所有靶标都受到同等影响,则容忍酶活性的降低;并且如果所有靶标以类似的动力学衰变,则容忍样品降解。例如,图1和图2显示了 ΔTBP -评分 $((GBP5+DUSP3)/2-KLF2)$ 在室温和 35°C 随时间显著变化,而 ΔTBP -评分 $((GBP5+DUSP3)/2-TBP)$ 在相同温度随时间更稳定。在GBP5、DUSP3和TBP基因特征中的所有靶标都以相同的动力学衰变。相反,在GBP5、DUSP3和KLF2基因特征中的靶标不会以相同的动力学衰变。相对于GBP5和DUSP3,KLF2和其它生物标志物(其它标志物的数据未显示)表现出表达的变异性,这可能是由于当将样品在室温或升高的温度保存一段时间时降解速率的差异。总体而言,随时间或温度,与TBP mRNA相比,KLF2 mRNA相对于GBP5和DUSP3以不同的动力学衰变,所述TBP mRNA相对于GBP5和DUSP3以类似的动力学衰变。降解的变异性显著影响所得到的分析的敏感性和/或特异性。

[0085] 如本文描述的,所述方法包含测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的mRNA表达水平,并分析所述表达水平以产生第一特征以诊断结核病感染的存在或不存在。所述生物标志物可以是检测可和/或定量的核酸、核酸片段、多核苷酸或寡核苷酸。可以用于本公开内容的实践中的生物标志物包括包含来自基因或基因的RNA转录物的核苷酸序列的多核苷酸,包括但不限于DUSP3、GBP5和TBP,及其表达产物。这些生物标志物的差异表达与结核病相关,并因此这些生物标志物的表达谱对于诊断结核病感染和确定被结核病感染的那些个体

的疾病阶段是有用的。

[0086] 可以如下测量差异表达:将生物标志物的Ct与对照或参考标志物的Ct进行比较,以得到 ΔCt 值。当分析生物样品中的生物标志物水平时,用于比较的参考值范围可以代表在一个或多个没有活动性结核病的受试者(例如,健康的受试者、未感染的受试者或具有潜伏性结核病的受试者)的一个或多个样品中发现的一种或多种生物标志物的水平。可替换地,参考值范围可以代表在一个或多个具有活动性结核病的受试者的一个或多个样品中发现的一种或多种生物标志物的水平。在某些实施方案中,将来自受试者的生物样品中的生物标志物水平与具有活动性结核病、初始结核病或亚临床结核病的受试者的参考值进行比较。

[0087] 除了生物标志物GBB5、DUSP3和TBP之外,结核病的诊断进一步包含测量和分析至少1种另外的生物标志物且直到共30种生物标志物,包括其间的任何数目的生物标志物,诸如2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30种生物标志物的表达。在某些实施方案中,本公开内容包括生物标志物组,其包含至少2、至少3、或至少4、或至少5、或至少6、或至少7、或至少8、或至少9、或至少10、或至少11种或更多种生物标志物。尽管较小的生物标志物组通常更经济,但较大的生物标志物组(即,大于30种生物标志物)具有提供更详细信息的优点,并且也可以用于本公开内容的实践中。

[0088] 在某些实施方案中,分析第一组生物标志物中的每一种的表达水平以将患者诊断为具有活动性结核病或未被感染,并且任选地,可以分析第二组生物标志物中的每一种的表达水平以将患者诊断为具有活动性结核病、初始结核病或亚临床结核病。第一组和第二组可以共享一种或多种共同的生物标志物,或者在组之间可以不重叠。例如,GBP5、DUSP3和/或TBP可以被包括在两个组中。对于两个特征共有的生物标志物,它们在第一特征和第二特征中的权重可能不同。为了提供特征,所述方法可以包括将生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或对照进行比较。

[0089] 在某些实施方案中,被测量和分析表达水平的生物标志物的组合集合包括DUSP3、GBP5和TBP。可以被分析的另外生物标志物(在第一特征或第二特征中)可以选自ACTB、ANKRD22、B2M、CDC37、CISH、CCL7、DECRI、DUSP3、EEF1A1、FAM48A、FLT1、FoxP3、GAPDH、GBP1P1、GBP5、HPRT1、IFNg、IP10、IL2、IL10、IL2RA、IL8、IL12B、KLF2、LINC01093、MIG、PLAU、PRDX1、PTGS2、RAB8B、RPLP0、SERPING1、SIRT5、SLPI、TBP、TNFA、TGFA、TRAP1、UBC、UBE2D2、VEGFA或YWHAZ。在某些实施方案中,仅测量和分析第一组生物标志物,以将患者诊断为具有活动性结核病、初始结核病、亚临床结核病,区分活动性结核病感染与其它疾病,监测结核病的进展,或监测结核病治疗,并且生物标志物包括DUSP3、GBP5和TBP。任选地,可以测量和分析第二组生物标志物以提供第二特征,其中所述生物标志物可以选自DUSP3、GBP5、TBP、IFNg、MIG、IP10、IL2、FoxP3、PLAU、SLPI、VEGFA、GBP1P1、ANKRD22、SERPING1、PTGS2、IL10、TNFA、TGFA、IL2RA、IL8、IL12B、CISH、FLT1、LINC01093、KLF2、PRDX1或CCL7中的一种或多种。

[0090] 在某些实施方案中,进行单个测定以测量每种生物标志物的表达水平,并且将数据用于生成基因特征的值。来自特征的截止值或“评分”可以用于将患者诊断为具有ATB或未被感染,第二截止值可以用于将患者诊断为具有ITB或没有,和/或第三截止值可以用于将患者诊断为具有STB或没有。在特征内的标志物可以被赋予不同的权重来计算“评分”。另外的临床数据诸如风险评估、放射摄影术和其它临床和实验室发现也可以纳入评分的确定

中。在某些方面,可以根据临床场合以不同的方式报告评分。在某些方面,可以根据从其收集样品的临床场合对评分进行差异加权。例如,所述分析可能根据是否使用临床医师或自我收集的样品以及基于诊所提供的治疗和随访的可用性而变化。

[0091] 可以根据需要修改截止值。例如,如果目的是排除ATB进行TB预防性治疗或纳入ATB进行全程TB治疗,则可以选择不同的截止值。在某些实施方案中,所述方法用于监测治疗应答。特征分析的结果从ATB组向非ATB组的转移可以用作患者改善的指示。

[0092] 在某些方面,本文描述的方法可以用于确定患者是否应接受ATB的全程治疗或适合患者感染状态的另一种治疗。例如,如果患者基于如本文描述的生物标志物表达谱具有ATB的诊断,则选择该患者进行结核病治疗。本文描述的方法可以用于监测进展并预测被鉴定为具有ITB或STB的患者进展为ATB的可能性,或预测/监测治疗应答以确定感染何时已经消除/静止或者ATB何时已经恢复至稳定的LTBI或已经消除/静止。具有ITB的患者可以通过增加的疾病负担进展到STB并然后进展到ATB。

[0093] 因此,本公开内容包括一种治疗具有TB(ATB、STB或ITB)的受试者的方法,所述方法包含:根据本文描述的方法诊断具有TB的受试者;和如果受试者具有阳性结核病诊断,则向所述受试者施用治疗有效量的至少一种结核病治疗。在另一个实施方案中,本公开内容包括一种治疗疑似具有ATB感染的受试者的方法,所述方法包含:根据本文描述的方法接收关于受试者的诊断的信息;和如果患者具有阳性ATB感染,则向所述受试者施用治疗有效量的至少一种结核病治疗。

[0094] 在某些方面,所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合。

[0095] 因此,本公开内容包括一种治疗具有TB(ATB、STB或ITB)的受试者的方法,所述方法包含:根据本文描述的方法诊断具有TB的受试者;和如果受试者具有阳性结核病诊断,则向所述受试者施用治疗有效量的至少一种抗生素。在另一个实施方案中,本公开内容包括一种治疗疑似具有ATB感染的受试者的方法,所述方法包含:根据本文描述的方法接收关于受试者的诊断的信息;和如果患者具有阳性ATB感染,则向所述受试者施用治疗有效量的至少一种抗生素。

[0096] 可以用于治疗结核病的抗生素包括但不限于乙胺丁醇、异烟肼、吡嗪酰胺、利福布汀、利福平、利福喷汀、阿米卡星、卷曲霉素、环丝氨酸、乙硫异烟胺、左氧氟沙星、莫西沙星、对氨基水杨酸和链霉素。通常,同时施用几种抗生素来治疗活动性结核病,而通常施用单一抗生素来治疗潜伏性结核病。治疗可以持续至少一个月或几个月,直到一年或两年或更长时间,取决于结核病感染是活动性、亚临床、初始、还是潜伏的。重度结核病感染通常需要更长的治疗,尤其是在感染对抗生素产生耐药性的情况下。可以筛查其感染具有抗生素耐药性的受试者以确定抗生素敏感性,从而鉴定将根除结核病感染的抗生素。此外,还可以施用皮质类固醇药物来减轻由活动性结核病引起的炎症。

[0097] 一种推荐的治疗ITB的方法可以包括LTBI的常规方案,其包括6-12个月的异烟肼、3个月的利福霉素和异烟肼的组合,或假设相对低的疾病负担,3-4个月的单独利福霉素可能对ITB有效。无论HIV状况如何,其它治疗ITB的方法提供6-9个月的每日异烟肼,或3个月的每周利福喷汀+异烟肼的方案,或3个月的每日异烟肼+利福平的方案。也可以提供1个月的每日利福喷汀+异烟肼的方案或4个月的每日单独利福平的方案作为替代方案。在高TB传

播的场合中,例如在具有未知或阳性ITB试验、但未被诊断出ATB疾病的与HIV共存的成年人 and 青少年中,患者可以接受至少36个月的每日异烟肼治疗。更新的、现有的和重新调整用途的药物(贝达喹啉、delamanid、利奈唑胺、未来可能的sutezolid和氟喹诺酮类)目前正在临床实践中用于治疗药物抗性的TB。另一种治疗选择是提供高剂量的利福霉素,该药物有可能缩短活动性TB的常规治疗的持续时间,并且耐受性良好。临床试验正在进行中以评估不同药物(包括delamanid和氟喹诺酮类)用于治疗多药物抗性的LTBI的效用。如果成功,那么它们也可能适用于治疗ITB。用于治疗ITB的其它替代方案可能包括宿主导向疗法或联合免疫抑制剂和抗-TB药物。

[0098] STB的治疗可以包括同时进行HIV试验,并在可能的情况下,获取生物样品进行药物敏感性试验。HIV共感染的存在将影响抗反转录病毒疗法的选择,并引起与免疫重构炎症综合征相关的考虑,而药物抗性TB的治疗方案将取决于结核分枝杆菌分离株的敏感性谱。但是,一般而言,STB的治疗可以与常规活动性TB疾病的治疗相同,同时考虑并存病、潜在的药物-药物相互作用和上述其它考虑因素。具有ITB或STB的人可以开始于异烟肼预防疗法(IPT)。

[0099] 如本文描述的本公开内容的方法还可以用于确定受试者的预后并用于监测具有结核病的受试者的治疗。医学从业人员可以通过测量来自患者的生物样品中生物标志物的水平来监测疾病的进展。

[0100] 本文描述的方法可以用作结核病分诊试验的一部分。TB分诊试验旨在用于被鉴定为具有与TB相容的症状或具有对于任何形式的活动性TB(或至少对于肺TB)的风险因素的成人和儿童。分诊试验应当对个体进行分级,以进行确认性TB诊断试验(对于分诊试验阳性的患者)或进一步研究可能的非-TB病因(对于分诊试验阴性的患者)。例如,可以对分诊试验阳性的患者进行确认性TB诊断试验,并包括GENEXPERT[®]系统或其它WHO认可的确认性试验,诸如分枝杆菌培养。可以在等待确认性TB试验的结果的同时开始治疗。对于分诊试验阴性的患者,可以进行其它呼吸系统疾病的进一步试验。在WHO于2014年为新的TB诊断试验制定目标产品简介(TPP)的共识会议上,为TB分诊试验定义的关键特征是,它应当:不以痰为基础;易于使用;快速;准确(与确认性试验相比,对任何形式的活动性TB最佳具有95%敏感度和80%特异性;或与确认性试验相比,对肺TB最低具有90%敏感度和70%特异性);买得起;和只需极少的基础设施和培训需求即可使用。本文公开的组合物、试剂盒、装置和方法提供了一种经优化的针对TB的分诊试验。

[0101] 本文描述的方法可以用于诊断肺外结核病。Mtb感染经常是肺部感染。但是,结核病在肺外的传播可以导致许多具有特征性模式的罕见发现的出现,所述特征性模式包括骨骼结核病、生殖道结核病、泌尿道结核病、中枢神经系统(CNS)结核病、胃肠结核病、肾上腺结核病、淋巴结核和心脏结核病。因此,Mtb感染也可以是肺外的。肺外感染部位通常包括淋巴结、胸膜和骨关节区,尽管任何器官都可以涉及。肺外结核病的诊断经常是难以捉摸的。通常,免疫抑制的儿童和受试者容易受到肺外Mtb感染。

[0102] 淋巴腺炎是肺外结核病的最常见形式。宫颈腺病是最常见的,但腹股沟、腋窝、肠系膜、纵隔和乳房内累及都已被描述。胸膜结核病经常是一种急性疾病,伴有咳嗽、胸膜炎性胸痛、发热或呼吸困难。骨和关节结核病可能占肺外结核病病例的多达35%。骨骼结核病最常累及脊柱,其次是负重关节中的结核性关节炎和脊柱外结核性骨髓炎。中枢神经系统

结核病包括结核性脑膜炎(最常见的表现)、颅内结核瘤和脊柱结核性蛛网膜炎。腹部结核病可能累及胃肠道、腹膜、肠系膜淋巴结或生殖泌尿道。粟粒性结核病、结核性心包炎和与肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 抑制剂相关的结核病是肺外结核病的另外形式。

[0103] 建议将六到九个月的方案(两个月的异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇,然后四到七个月的异烟肼和利福平)作为所有形式的肺外结核病的初始疗法,除非已知或强烈怀疑生物体对一线药物具有抗性。

[0104] 本文描述的用于具有结核病的受试者的预后或诊断的方法可以用在这样的个体中:其尚未被诊断(例如,预防性筛查),或其已被诊断,或其疑似具有结核病(例如,表现出一种或多种特征性症状),或其处于发生结核病的风险中(例如,具有遗传素质或存在一种或多种发育的、环境的或行为的风险因素)。例如,可以通过本文描述的方法筛查具有一种或多种风险因素的患者,包括但不限于免疫抑制的患者、免疫缺陷的患者、老年患者、疑似已经暴露于感染结核病的受试者的患者或具有肺病症状的患者。所述方法也可以用于评价疾病的严重程度。所述方法还可以用于检测结核病对患者的治疗性治疗或其它干预的应答(例如,恶化、现状、部分恢复或完全恢复),以及适当的行动过程,其导致进一步治疗或观察,或导致患者从医疗护理中心出院。

[0105] 在一个实施方案中,本公开内容包括用于诊断和治疗疑似被TB感染的患者的方法。所述方法可以包含从所述患者得到生物样品和测量所述生物样品中生物标志物DUSP3、GBP5和TBP的表达水平。可以结合每种生物标志物的相应参考值范围来分析每种生物标志物的表达水平。所述生物标志物的表达水平与具有活动性结核病的受试者的参考值范围的相似性指示所述患者具有活动性结核病,所述生物标志物的表达水平与具有亚临床结核病的受试者的参考值范围的相似性指示所述患者具有亚临床结核病,并且所述生物标志物的表达水平与具有初始结核病的受试者的参考值范围的相似性指示所述患者具有初始结核病。

[0106] 所述方法可以包括测量生物样品中另外生物标志物的表达水平,所述另外生物标志物选自ACTB、ANKRD22、B2M、CDC37、CISH、CCL7、DECR1、DUSP3、EEF1A1、FAM48A、FLT1、FoxP3、GAPDH、GBP1P1、GBP5、HPRT1、IFNg、IP10、IL2、IL10、IL2RA、IL8、IL12B、KLF2、LINC01093、MIG、PLAU、PRDX1、PTGS2、RAB8B、RPLP0、SERPING1、SIRT5、SLPI、TBP、TNFA、TGFA、TRAP1、UBC、UBE2D2、VEGFA或YWHAZ生物标志物。根据期望的测定可以分析生物标志物的不同组合。

[0107] 在一个实施方案中,将DUSP3、GBP5和TBP用在特征中以将ATB、ITB和STB与其它疾病区分开。在一个实施方案中,将DUSP3和GBP5用在特征中以将ATB、ITB和STB与其它疾病区分开。

[0108] 在一个实施方案中,将DUSP3、GBP5和TBP用在特征中以监测ATB患者的治疗应答。在一个实施方案中,将DUSP3和GBP5用在特征中以监测ATB患者的治疗应答。

[0109] 本公开内容提供了用于诊断患者中的结核病的方法,所述方法包含:a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;b) 基于DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平来确定评分,其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0110] \quad \text{评分} = \frac{(\text{GBP5} + \text{DUSP3})}{2} - \text{TBP}$$

[0111] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平,DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平,且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平;和c)基于所述评分鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病。在某些方面,所述方法可以进一步包含给被鉴定为具有结核病的患者施用有效量的至少一种结核病治疗,其中所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合。

[0112] 本公开内容提供了用于治疗患者中的结核病的方法,所述方法包含:a)测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;b)基于DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平来确定评分,其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0113] \quad \text{评分} = \frac{(GBP5 + DUSP3)}{2} - TBP$$

[0114] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平,DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平,且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平;和c)基于所述评分鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病;和d)给被鉴定为具有结核病的患者施用有效量的至少一种结核病治疗,其中所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合。

[0115] 在前述方法的某些方面,所述至少一种抗生素选自由以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0116] 在前述方法的某些方面,步骤(c)可以包含将所述评分与预定的截止值进行比较。在某些方面,当所述评分大于或等于预定的截止值时,将所述患者鉴定为具有结核病;且当所述评分小于预定的截止值时,将所述患者鉴定为不具有结核病。在某些方面,当所述评分小于或等于预定的截止值时,将所述患者鉴定为具有结核病;且当所述评分大于预定的截止值时,将所述患者鉴定为不具有结核病。

[0117] 在某些方面,预定的截止值可以区分活动性结核病、初始结核病和亚临床结核病感染的患者、高结核病风险、低结核病风险和TB阴性。

[0118] 在某些方面,预定的截止值可以具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的特异性。

[0119] 在某些方面,预定的截止值可以具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的敏感性。

[0120] 在某些方面,预定的截止值可以具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阳性预测值。

[0121] 在某些方面,预定的截止值可以具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阴性预测值。

[0122] 示例性的预定的截止值可以在从约-6至约2的范围内,包括但不限于约-6、约-5.5、约-5、约-4.5、约-4、约-3.5、约-3、约-2.5、约-2、约-1.5、约-1、约-0.5、约0、约0.5、约1、约1.5或约2。

[0123] 可以通过多种方法来分析生物标志物数据以鉴定生物标志物并确定在试验和参考表达谱之间观察到的生物标志物表达水平的差异的统计显著性,从而将具有ATB、ITB或STB的患者与具有其它疾病的患者区分开。

[0124] 在某些实施方案中,通过一种或多种方法来分析患者数据,所述方法包括但不限

于多变量线性辨别分析 (LDA)、接受者操作特征 (ROC) 分析、主组分分析 (PCA)、随机森林、支持向量机、弹性网方法、集合数据挖掘方法、微阵列的显著性分析 (SAM)、微阵列的细胞特异性显著性分析 (csSAM)、密度归一化事件的生成树进展分析 (SPADE) 和多维蛋白鉴定技术 (MUDPIT) 分析。(参见,例如,Hilbe(2009) Logistic Regression Models, Chapman&Hall/CRC Press; McLachlan(2004) Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition. Wiley Interscience; Zweig等人(1993) Clin.Chem.39:561-577; Breiman(2001) Random forests, Machine Learning 45:5032; Pepe(2003) The statistical evaluation of medical tests for classification and prediction, New York, N.Y.: Oxford; Sing等人(2005) Bioinformatics 21:3940-3941; Tusher等人(2001) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:5116-5121; Oza(2006) Ensemble data mining, NASA Ames Research Center, Moffett Field, Calif., USA; English等人(2009) J.Biomed.Inform.42(2):287-295; Zhang(2007) Bioinformatics 8:230; Shen-Orr等人(2010) Journal of Immunology 184:144-130; Qiu等人(2011) Nat.Biotechnol.29(10):886-891; Ru等人(2006) J.Chromatogr.A.1111(2):166-174, Jolliffe Principal Component Analysis(Springer Series in Statistics, 2.sup.nd edition, Springer, NY, 2002), Koren等人(2004) IEEE Trans Vis Comput Graph 10:459-470;通过引用整体并入本文)。

[0125] 本测定依赖于聚合酶链式反应 (PCR), 并且可以使用商购可得核酸扩增系统以基本上自动化的方式进行。可以用于实施本公开内容的方法的示例性的非限制性的核酸扩增系统包括 **GENEXPERT[®]** 系统、**GENEXPERT[®]** Infinity 系统和 **GENEXPERT[®]** Xpress 系统 (Cepheid, Sunnyvale, CA)。所述扩增系统可以在与待测个体相同的位置使用, 诸如卫生保健提供者的办公室、诊所或社区医院, 因此处理不会因为需要将样品运送到另一个设施而延迟。使用自动化的系统, 例如, **GENEXPERT[®]** 系统, 本测定可以在3小时以下, 在某些实施方案中, 在2小时以下, 在某些实施方案中, 在1小时以下, 在某些实施方案中, 在45分钟以下, 在某些实施方案中, 在35分钟以下, 且在某些实施方案中, 在30分钟以下完成。

[0126] 一般方法

[0127] 在本公开内容的方法的某些方面, 确定生物标志物 (例如 DUSP3、GBP5 和 TBP) 的表达水平可以包含对来自受试者的生物样品提取的核酸进行定量 PCR (qPCR)。熟练的技术人员将理解, 在其中将定量 PCR 用于定量生物标志物的表达水平的方面, 生物标志物的表达水平可以表示为循环阈值 (Ct) 值。

[0128] 熟练的技术人员将理解, 定量 PCR 方法的一个非限制性实例包括反转录酶定量 PCR, 即 RT-qPCR。

[0129] 熟练的技术人员将理解, 本文描述的方法可以与 **GENEXPERT[®]** 系统 (Cepheid, Sunnyvale) 联合使用。**GENEXPERT[®]** 系统可以用于确定本文列举的生物标志物的表达水平。熟练的技术人员将理解, **GENEXPERT[®]** 系统利用自给的一次性筒。样品提取、扩增和检测都可以在这个自给的“筒内实验室”内进行 (参见例如, 美国专利 5,958,349、6,403,037、6,440,725、6,783,736、6,818,185、9,873,909 和 10,562,030; 它们中的每一篇通过引用整体并入本文)。

[0130] 筒的组件包括但不限于含有试剂、过滤器和捕获技术的处理腔室,它们可用于提取、纯化和扩增靶核酸。阀使流体能够从一个腔室转移到另一个腔室,并含有核酸裂解和过滤组件。光学窗口能够实现实时光学检测。反应管能够实现非常快速的热循环。

[0131] 在某些方面,所述筒可以包括一个或多个筒体(所述筒体包含多个流体连通的腔室)、以及与处理腔室流体连通的用于结合核酸的核酸结合基质,其中所述处理腔室包含用于裂解来自样品的细胞、扩增和检测来自样品的核酸的试剂,以及包含用于检测GBP5、DUSP3和TBP的引物集合的组合物。在特定方面,所述多个处理腔室包含与核酸结合基质流体连通的裂解腔室,其中所述裂解腔室包含一种或多种用于裂解细胞的试剂,以及一个或多个反应容器,所述反应容器与所述裂解腔室流体连通并被构造成用于扩增核酸和检测扩增产物。用于检测GBP5、DUSP3和TBP的引物集合可以设置在所述一个或多个反应容器中。

[0132] 所述多个处理腔室可以进一步包括样品腔室,所述样品腔室用于接收样品并至少具有流体出口,所述流体出口与所述多个处理腔室的另一个腔室流体连通。任选地,其中所述样品腔室和裂解腔室是同一个。

[0133] 所述反应容器可以被构造成检测单一扩增产物或多种扩增产物。

[0134] 在某些方面,在将样品加入筒中以后,可以任选地使样品与裂解缓冲液接触,并且释放的核酸,其可以是RNA、DNA和/或cDNA,可以结合至核酸结合基质,诸如二氧化硅或玻璃基质。所述裂解缓冲液通常包含离液剂、螯合剂、缓冲剂、去污剂或其组合。所述离液剂可以选自硫氰酸胍、盐酸胍、碱金属高氯酸盐、碱金属碘化物、脲、甲酰胺或其组合。所述离液剂的浓度可以在从约1M至约10M范围内,诸如从约2.5M至约7.5M、小于4.5M、小于2M或小于1M。所述螯合剂可以选自N-乙酰基-L-半胱氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、1,2-双(o-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和膦酸酯螯合剂。所述螯合剂的浓度可以在从约10mM至约100mM范围内和/或包含约0.5%至约5%的裂解试剂。所述缓冲剂可以选自由以下成员组成的集合:Tris、磷酸盐缓冲剂、PBS、柠檬酸盐缓冲剂、TAPS、N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸(Bicine)、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、TAPSO、HEPES、TES、MOPS、PIPES、二甲基胍酸盐(Cacodylate)、SSC和MES。所述缓冲剂的浓度可以在从约5mM至约100mM范围内,诸如从约5mM至约50mM。所述去污剂可以选自离子去污剂或非离子去污剂。在某些实例中,所述去污剂包含选自由以下成员组成的集合的去污剂:N-月桂酰基肌氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、鲸蜡基甲基溴化铵(CTAB)、TRITON®-X-100、正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、CHAPS、正辛酰基蔗糖、正辛基-β-D-吡喃麦芽糖苷、正辛基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷、PLURONIC®F-127、TWEEN®20和正庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷。所述去污剂可以包含约0.1%至约2%的裂解试剂,和/或范围从约10mM直到约100mM。所述裂解试剂可以具有在从约pH 3.0至约pH 5.5范围内的pH。在某些实例中,所述裂解缓冲液包含胍盐化合物、任选的EDTA、缓冲剂和去污剂。

[0135] 如本文描述的,所述核酸可以结合至核酸结合基质,在本文中也称作为过滤器。在某些实例中,所述过滤器包含玻璃纤维和任选的聚合物结合剂。所述玻璃纤维可以被核酸结合配体诸如烷基胺、环烷基胺、烷氧基胺、多胺部分、芳基胺、嵌入剂、DNA沟结合剂、肽、氨基酸、蛋白或其组合改性。在某些实例中,所述过滤器包含500微米至2000微米厚的玻璃纤维盘,其具有0.2微米至1微米的孔径。在某些方面,所述样品可以在裂解过程中或以后与结合试剂、洗涤试剂或组合接触。所述结合试剂可以促进核酸与过滤器的结合,从而促进非靶

材料的除去。在某些实施方案中,所述结合试剂可以包括结合聚合物,诸如聚丙烯酸(PAA)、聚丙烯酰胺(PAM)、聚乙二醇(PEG)、聚(磺基甜菜碱)或盐或其组合。在某些实施方案中,所述过滤试剂和/或所述洗涤试剂可以包括所述结合试剂。例如,所述结合试剂、所述过滤试剂和/或所述洗涤试剂可以包括结合聚合物(例如,PEG 200)、缓冲剂、无机盐、抗氧化剂和/或螯合剂、消泡剂SE15、叠氮化钠、二糖或二糖衍生物、载体蛋白、离液剂(诸如盐酸胍)去污剂、DMSO或其组合。所述结合聚合物可以以至少10% v/v、至少20% v/v、至少30% v/v和/或小于60% v/v、小于40% v/v、小于30% v/v、小于20% v/v或小于10% v/v的量存在,或可以落在由这些值中的任何值限定的任何范围内,例如,结合试剂、过滤试剂和/或洗涤试剂的10%至60% v/v。所述缓冲剂可以选自由以下成员组成的集合:Tris、2-氨基-2-羟基甲基-1,3-丙二醇、HEPES、磷酸盐缓冲剂、PBS、柠檬酸盐缓冲剂、TAPS、N,N-双(2-羟基乙基)甘氨酸(Bicine)、三(羟甲基)甲基甘氨酸(Tricine)、TAPSO、HEPES、TES、MOPS、PIPES、二甲基膦酸盐(Cacodylate)、SSC和MES。所述缓冲剂的浓度可以在从约5mM至约100mM范围内,诸如从约5mM至约50mM。所述盐,诸如NaCl、KCl或MgCl₂,可以以从约0.05M至约1M的浓度存在,诸如从约0.1M至约0.5M。所述抗氧化剂和/或螯合剂包含选自由以下成员组成的集合的试剂:N-乙酰基-L-半胱氨酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)、乙二胺-N,N'-二琥珀酸(EDDS)、1,2-双(o-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和膦酸酯螯合剂。在某些实施方案中,所述抗氧化剂和/或螯合剂包含EDTA。在某些实施方案中,所述抗氧化剂和/或螯合剂占结合试剂、过滤试剂和/或洗涤试剂的0.2%至约5%、约0.2%至约3%、或约0.5%至约2%、或约0.5%。在某些实施方案中,在结合试剂、过滤试剂或洗涤试剂中的抗氧化剂和/或螯合剂的浓度范围为约2mM至约50mM或约5mM至约20mM。在某些实施方案中,所述去污剂是离子去污剂或非离子去污剂。所述去污剂可以选自离子去污剂或非离子去污剂。在某些实例中,所述去污剂包含选自由以下成员组成的集合的去污剂:N-月桂酰基肌氨酸、十二烷基硫酸钠(SDS)、鲸蜡基甲基溴化铵(CTAB)、**TRITON®**-X-100、正辛基-β-D-吡喃葡萄糖苷、CHAPS、正辛酰基蔗糖、正辛基-β-D-吡喃麦芽糖苷、正辛基-β-D-硫代吡喃葡萄糖苷、**PLURONIC®**F-127、**TWEEN®**20、Brij-35和正庚基-β-D-吡喃葡萄糖苷。所述去污剂可以占结合试剂、过滤试剂和/或洗涤试剂的约0.1%至约2%,和/或范围从约10mM直到约100mM。所述结合试剂、过滤试剂和/或所述洗涤试剂可以具有在从约pH 6.0至约pH 8.0(诸如从约6.5至约7.5)范围内的pH。

[0136] 然后除去样品上清液,并在洗脱缓冲液诸如Tris/EDTA缓冲液中洗脱核酸。所述洗脱缓冲液可以包含氨或碱金属氢氧化物。一般而言,所述洗脱缓冲液具有高于约9、高于约10或高于约11的pH。所述洗脱缓冲液可以进一步包含聚阴离子、任意的角叉菜胶、载体核酸或i-角叉菜胶和KOH。然后可以在筒中处理洗脱液以检测本文描述的靶基因。在某些实施方案中,所述洗脱液用于重构至少一些PCR试剂,所述试剂作为冻干的颗粒存在于筒中。具体地,所述冻干的颗粒可以是珠子的形式,并且包含引物、探针、盐、dNTP、热稳定的聚合酶、反转录酶或其组合。所述冻干物可以存在于筒的反应容器中。

[0137] 熟练的技术人员将理解,Ct值是在定量PCR实验中与特定靶核酸的扩增相关的荧光信号超过预定阈值所需的循环数目。熟练的技术人员将理解,该阈值可以是在实验中测量的背景荧光水平。

[0138] 生物样品可以是受试者分离的任何类型的生物材料。在某些方面,生物样品包

含血液。在某些方面,生物样品可以包含唾液。在某些方面,生物样品可以包含鼻拭子样品。在某些方面,生物样品可以包含血液、血浆、血清、尿、母乳、脑脊液、粘液、胃液、腹膜液、胸膜液、唾液、皮脂、精液、汗液、泪液、阴道分泌物、呕吐物、内淋巴、外淋巴或其任何组合。

[0139] 在某些方面,在训练集中的生物样品可以包含血液。在某些方面,在训练集中的生物样品可以包含唾液。在某些方面,在训练集中的生物样品可以包含鼻拭子样品。在某些方面,在训练集中的生物样品可以包含血液、血浆、血清、尿、母乳、脑脊液、粘液、胃液、腹膜液、胸膜液、唾液、皮脂、精液、汗液、泪液、阴道分泌物、呕吐物、内淋巴、外淋巴或其任何组合。

[0140] 熟练的技术人员将理解,使用本领域已知的适当方法,可以从受试者收集在本公开内容的方法中使用的生物样品。在某些实例中,可以在Minivette®护理点试验(POCT; Sarstedt,德国)中收集生物样品。Minivette®POCT可以容纳10 μ L至200 μ L的体积,优选10 μ L至50 μ L,和50 μ L体积。Minivette®POCT可以具有中性、肝素或EDTA制品。

[0141] 在某些方面,所述生物样品是从患者收集的全血。熟练的技术人员将理解,在生物样品包含血液的情况下,使用本领域已知的任何血液收集方法,可以从受试者收集血液。例如,通过毛细管(例如,从手指针刺(finger-prick),又名手指针刺(finger-stick))或静脉穿刺抽血,可以从患者收集全血。因此,本公开内容用于检测手指针刺体积(5-50 μ L)或更大体积的全血中的结核病的生物标志物。在某些实施方案中,在本文公开的方法中使用的血液体积可以是1000 μ L或更小、500 μ L或更小、400 μ L或更小、300 μ L或更小、200 μ L或更小、100 μ L或更小或50 μ L或更小。所述血液体积通常是约50 μ L或更小(例如40 μ L或更小、25 μ L或更小、15 μ L或更小、10 μ L或更小或5 μ L或更小)。在某些实施方案中,在所述方法中使用的血液体积是至少0.5 μ L、至少1 μ L、至少2 μ L、至少5 μ L、至少15 μ L、至少25 μ L或至少50 μ L。

[0142] 熟练的技术人员将理解,在其中生物样品包含血液的方面,使用PAXgene®(QIAGEN/BD,Hombrechtikon,瑞士)收集方法可以从受试者收集血液。

[0143] 熟练的技术人员将理解,在其中生物样品包含血液的方面,使用EDTA样品收集管可以从受试者收集血液。

[0144] 在其中生物样品包含血液的某些方面,可以从受试者收集血液,并随后与稳定溶液混合。在某些实例中,所述生物样品可以包含补充了抗凝血剂或RNA稳定缓冲剂的全血。熟练的技术人员将理解,稳定溶液的一个非限制性实例是RNAlater™(Thermo Fisher Scientific,US)。

[0145] 在某些方面,使用本领域已知的任何方法,包括但不限于在美国专利号10,465,182(其通过引用整体并入本文)中描述的方法,可以从生物样品提取生物标志物,包括DNA和RNA。

[0146] 熟练的技术人员将理解,在其中要测量的生物标志物是RNA转录物的方面,使用本领域已知的任何合适RNA提取方法,可以从生物样品提取RNA。

[0147] 熟练的技术人员将理解,在其中要测量的生物标志物是蛋白的方面,使用本领域已知的任何合适蛋白提取方法,可以从生物样品提取蛋白。

[0148] 在某些实施方案中,可以在一个或多个时间从受试者收集的样品中测量生物标志物的存在,以监测受试者中的结核病治疗。在某些实施方案中,所述测定可以用在疑似呼吸道感染的受试者中,例如,在咨询其卫生保健提供者之后。在某些实施方案中,本测定可以

用作受试者的常规和/或预防性卫生保健的一部分。在某些实施方案中,本测定可以季节性地在用作受试者的常规和/或预防性卫生保健的一部分。在某些实施方案中,本测定可以用作具有结核病的特定风险的受试者的常规和/或预防性卫生保健的一部分。

[0149] 在某些实施方案中,从具有结核病的一种或多种症状的个体获得要试验的样品。

[0150] 在某些实施方案中,本文描述的方法可以用于对没有风险因素的健康个体进行常规筛查。在某些实施方案中,本文描述的方法用于筛查无症状个体,例如在常规或预防性护理期间。在某些实施方案中,本文描述的方法用于筛查怀孕或试图怀孕的妇女。在某些实施方案中,所述方法用于在免疫抑制疗法之前试验患者。

[0151] 在某些实施方案中,本文描述的方法可以用于评估患者中对结核病感染的治疗的有效性。

[0152] 可以在从受试者收集生物样品的同一设施处进行本文描述的方法。例如,所述方法可以是护理点方法。在其它情况下,可以在医院、急救中心、急诊室、医师办公室、健康诊所或家庭中进行所述方法。在进一步的情况下,所述方法是临床实验室改进修正案 (CLIA) - 免除试验。在某些实施方案中,与受试者中结核病的诊断相关的信息被传达给医学从业人员。本文中使用的“医学从业人员”表示诊断和/或治疗患者的个人或实体,诸如医院、诊所、医师办公室、医师、护士或任何上述实体和个人的代理人。在某些实施方案中,在已经从医学从业人员或医学从业人员的代理人接收了受试者的样品的实验室处进行所述方法。所述实验室通过任何方法(包括本文描述的那些)进行检测,然后将结果传达给医学从业人员。如本文中使用的,当通过任何方式向医学从业人员提供结果时,结果“被传达”。在某些实施方案中,这样的传达可以是口头或书面的,可以通过电话、当面、通过电子邮件、通过邮件或其它快递,或者可以通过将信息直接存入例如医学从业人员可访问的数据库(包括医学从业人员不控制的数据库)来进行。在某些实施方案中,将测定的结果与临床参数、数据或关于其它风险因素的信息(例如胸部x射线)相组合,以进行诊断。在某些实施方案中,所述信息以电子形式维护。在某些实施方案中,所述信息可以存储在存储器或其它计算机可读介质中,诸如RAM、ROM、EEPROM、闪存存储器、计算机芯片、数字视频光盘(DVD)、光盘(CD)、硬盘驱动器(HDD)、磁带等。还可以使用基于网络的应用来提供结果,所述应用可以在智能电话或其它移动设备上提供给卫生保健从业人员或患者。在某些方面,可以通过移动设备向患者提供结果。

[0153] 在某些实施方案中,所述方法进一步包含从实验室接收指示样品中结核病的诊断的通信。本文中使用的“实验室”是通过任何方法(包括本文描述的方法)检测样品中的靶基因并将结果传达给医学从业人员的任何设施。在某些实施方案中,实验室是在医学从业人员的控制下。在某些实施方案中,实验室不是在医学从业人员的控制下。

[0154] 如本文中使用的,当方法涉及诊断结核病感染时,所述方法包括在其中执行所述方法的步骤的活动,但结果对于结核病感染的存在而言是阴性的。也就是说,检测、确定、监测和诊断结核病感染包括执行产生阳性或阴性结果的方法的情况。

[0155] 示例性的对照

[0156] 本文描述的测定可以包含检测生物标志物和至少一种内源对照。所述内源对照可以是样品足够性对照(SAC)。在某些这样的实施方案中,如果在样品中没有检测到生物标志物,并且在样品中也没有检测到SAC,则测定结果被视为“无效”,因为样品可能已经不足。虽

然无意受任何特定理论约束,但不足的样品可能太稀、含有太少的细胞材料、含有测定抑制剂等。在某些实施方案中,未能检测到SAC可能指示测定反应失败。在某些实施方案中,内源对照是RNA(诸如mRNA、tRNA、核糖体RNA等)。

[0157] TBP可以用作阳性对照生物标志物,其指示样品的质量。不希望受理论约束,使用TBP作为阳性对照意味着,当在足够的水平检测到TBP表达时,样品被认为具有足够高的质量以继续分析,和/或当没有在足够的水平检测到TBP表达时,该样品被认为具有低质量并且不使用该样品进行进一步分析。因此,在某些方面,在前述方法中的第一预定的截止值可以是测量的TBP表达的阈值,其指示TBP存在于生物样品中。熟练的技术人员将理解,所述阈值可以由执行前述方法的用户基于用于测量所述生物标志物的表达水平的实验条件而导出。

[0158] 在测定的执行过程中,诸如用一种或多种缓冲液或试剂,可以添加外源对照(诸如SPC)。在某些实施方案中,当要使用**GENEXPERT**[®]系统时,SPC被包括在**GENEXPERT**[®]筒中。在某些实施方案中,外源对照(诸如SPC)是**ARMORED**[®]RNA,其由噬菌体外壳保护。

[0159] 可以与生物标志物的检测同时检测内源对照和/或外源对照,例如在相同的测定中。在某些实施方案中,测定包含用于在同一测定反应中同时检测生物标志物和外源对照的试剂。例如,测定反应可以包含用于扩增每种生物标志物的引物集合、和用于扩增外源对照的引物集合以及用于检测扩增产物的经标记的探针(诸如**TAQMAN**[®]探针)。

[0160] 靶RNA的水平可以归一化为内源对照RNA。归一化可以包含例如确定靶RNA水平与内源对照RNA水平的差异。在某些这样的实施方案中,RNA的水平由从定量PCR获得的Ct值表示。在某些这样的实施方案中,两个测量值之间的差异被表示为 ΔCt 。 ΔCt 可以计算为Ct[靶RNA]-Ct[内源对照]或Ct[内源对照]-Ct[靶RNA]。在某些实施方案中, $\Delta Ct = Ct[\text{内源对照}] - Ct[\text{生物标志物}]$ 。在某些实施方案中,设置阈值 ΔCt 值,高于或低于该值则指示特定诊断。在某些这样的实施方案中, ΔCt 阈值被设置为这样的 ΔCt 值:在该值以下,75%的正常样品被正确表征。不同的阈值可以适用于不同的测定,因此在某些情况下,阈值可以更高,例如80%、90%、95%或97%,并且在某些情况下,阈值可以更低,例如50%、60%或70%。在某些这样的实施方案中,高于阈值 ΔCt 值的 ΔCt 值指示特定疾病诊断。

[0161] 可以预先确定指示ATB、ITB或STB的靶RNA的阈值Ct(或“截止Ct”)值。在这样的实施方案中,可以不与试验样品同时测定对照样品。在某些实施方案中,如本文所讨论的,已经预先确定 ΔCt 阈值,在该值之上则指示TB或其区分ATB、ITB和STB。

[0162] 在某些实施方案中,使用线性辨别分析(LDA),例如以将两种或更多种标志物组合成单个组合量表。在某些这样的实施方案中,对于每个特征,为在LDA中包括的标志物使用单个阈值,例如,对于每组标志物或每个特征分析存在单独的阈值。

[0163] 示例性的RNA制备

[0164] 可以通过任何适当的方法制备靶RNA。通过任何方法,包括但不限于,在Wilkinson,M.(1988)Nucl.Acids Res.16(22):10,933;和Wilkinson,M.(1988)Nucl.Acids Res.16(22):10934中所述的方案,或通过使用商购可得的试剂盒或试剂,诸如**TRIzol**[®]试剂(Invitrogen)、总RNA提取试剂盒(iNtRON Biotechnology)、总RNA纯化试剂盒(Norgen

Biotek Corp.)、RNAqueous™ (Invitrogen)、MagMAX™ (Applied Biosystems)、RecoverAll™ (Invitrogen)、RNAeasy (Qiagen) 等,可以分离总RNA。

[0165] 在某些实施方案中,在未首先从细胞中纯化RNA的样品中测量RNA水平。在某些这样的实施方案中,将细胞进行裂解步骤以释放RNA。非限制性的示例性裂解方法包括声处理(例如,2-15秒、8-18 μ m,在36kHz);化学裂解,例如,使用去污剂;以及各种商购可得的裂解试剂(诸如RNAeasy裂解缓冲液,Qiagen)。在某些实施方案中,在其中已经分离RNA的样品中测量RNA水平。

[0166] 在某些实施方案中,在检测靶RNA之前修饰RNA。在某些实施方案中,样品中的所有RNA都被修饰。在某些实施方案中,仅要分析的特定靶RNA被修饰,例如,以序列特异性的方式。在某些实施方案中,将RNA反转录。在某些这样的实施方案中,使用反转录酶诸如MMLV、AMV或其变体将RNA反转录,所述变体已经被工程改造成具有特征诸如降低的RNA酶H活性和增加的持续合成能力、敏感性和热稳定性。使用MMLV反转录酶反转录RNA的非限制性示例性条件包括在40°C至50°C温育5至20分钟。

[0167] 当将靶RNA反转录时,形成靶RNA的DNA互补物。在某些实施方案中,检测靶RNA的互补物而不是靶RNA本身(或RNA本身的DNA拷贝)。因此,当本文中讨论的方法指示检测靶RNA或确定靶RNA的水平时,这样的检测或确定可以在靶RNA的互补物上进行,而不是靶RNA本身或除了RNA本身之外。在某些实施方案中,当检测靶RNA的互补物而不是靶RNA时,使用用于检测的多核苷酸,其与靶RNA的互补物互补。在某些这样的实施方案中,用于检测的多核苷酸包含与靶RNA在序列上相同的至少一部分,尽管它可以含有胸苷来替代尿苷,和/或包含其它修饰的核苷酸。

[0168] 示例性的分析方法

[0169] 能够允许靶基因的特异性检测的任何分析程序可以用于本文提供的方法中。示例性的非限制性的分析程序包括但不限于核酸扩增方法、PCR方法、等温扩增方法和本领域技术人员已知的其它分析检测方法。

[0170] 在某些实施方案中,检测靶基因的方法包含扩增基因和/或其互补物。这样的扩增可以通过任何方法实现。示例性的方法包括但不限于等温扩增、实时RT-PCR、终点RT-PCR、以及使用T7聚合酶从与DNA退火的T7启动子扩增,诸如由可以在德国Implen获得的SenseAmp Plus™试剂盒提供。

[0171] 当扩增靶基因时,在某些实施方案中,形成靶基因的扩增子。扩增子可以是单链的或双链的。在某些实施方案中,当扩增子为单链时,扩增子的序列在有义或反义方向上与靶基因相关。在某些实施方案中,检测靶基因的扩增子而不是靶基因本身。因此,当本文中讨论的方法指示检测靶基因时,这样的检测可以在靶基因的扩增子(而不是靶基因本身,或除了靶基因本身之外)上进行。在某些实施方案中,当检测靶基因的扩增子而不是靶基因时,使用用于检测的多核苷酸,其与靶基因的互补物互补。在某些实施方案中,当检测靶基因的扩增子而不是靶基因时,使用用于检测的多核苷酸,其与靶基因互补。此外,在某些实施方案中,可以使用用于检测的多种多核苷酸,并且某些多核苷酸可以与靶基因互补并且某些多核苷酸可以与靶基因的互补物互补。

[0172] 在某些实施方案中,检测靶基因的方法包含如下文所述的PCR。在某些实施方案中,检测一种或多种靶基因包含实时监测PCR反应,这可以通过任何方法实现。这样的方法

包括但不限于使用TAQMAN[®]、分子信标或Scorpions探针(即,能量转移(ET)探针,诸如FRET探针)和使用嵌入染料,诸如SYBR绿、EvaGreen、噻唑橙、YO-PRO、TO-PRO等。

[0173] 用于扩增已经从靶RNA反转录的cDNA的非限制性示例性条件如下。示例性的循环包含最初在90℃至100℃变性20秒至5分钟,接着循环,所述循环包含在90℃至100℃变性1至10秒,随后在60℃至75℃退火并扩增10至40秒。另一个示例性的循环包含在94℃保持20秒,随后是3个在95℃保持1秒、在62℃保持35秒的循环,20个在95℃保持1秒、在62℃保持20秒的循环,和14个在95℃保持1秒、在62℃保持35秒的循环。在某些实施方案中,对于初始变性步骤后的第一个循环,省略循环变性步骤。在某些实施方案中,将Taq聚合酶用于扩增。在某些实施方案中,所述循环进行至少10次、至少15次、至少20次、至少25次、至少30次、至少35次、至少40次或至少45次。在某些实施方案中,使用具有热启动功能的Taq。在某些实施方案中,所述扩增反应在GENEXPERT[®]筒中发生,并且靶基因和外源对照的扩增在同一个反应中发生。在某些实施方案中,靶基因的检测从初始变性到最后延伸在小于3小时、小于2.5小时、小于2小时、小于1小时、小于45分钟、小于40分钟、小于35分钟或小于30分钟内发生。

[0174] 在某些实施方案中,靶基因的检测包含形成复合物,所述复合物包含与靶基因或其互补物互补的多核苷酸,和选自靶基因、靶基因的DNA扩增子和靶基因的互补物的核酸。因此,在某些实施方案中,所述多核苷酸与靶基因形成复合物。在某些实施方案中,所述多核苷酸与靶RNA的互补物(诸如从靶RNA反转录的cDNA)形成复合物。在某些实施方案中,所述多核苷酸与靶基因的DNA扩增子形成复合物。当双链DNA扩增子是本文中使用的复合物的一部分时,所述复合物可以包含DNA扩增子的一条或两条链。因此,在某些实施方案中,复合物仅包含DNA扩增子的一条链。在某些实施方案中,复合物是三链体,并且包含所述多核苷酸和DNA扩增子的两条链。在某些实施方案中,通过所述多核苷酸与靶基因、靶基因的互补物或靶基因的DNA扩增子之间的杂交,形成复合物。在某些实施方案中,所述多核苷酸是引物或探针。

[0175] 在某些实施方案中,检测所述复合物。在某些实施方案中,所述复合物在检测时不必缔合。也就是说,在某些实施方案中,形成复合物,然后将复合物以某种方式解离或破坏,并且检测来自所述复合物的组分。这样的系统的一个实例是TAQMAN[®]测定。在某些实施方案中,当所述多核苷酸是引物时,所述复合物的检测可以包含扩增靶基因、靶基因的互补物或靶基因的DNA扩增子。

[0176] 在某些实施方案中,在本文所述方法中用于检测至少一种靶基因的分析方法包括实时定量PCR。在某些实施方案中,用于检测至少一种靶基因的分析方法包括使用TAQMAN[®]探针。所述测定使用能量转移(“ET”),诸如荧光共振能量转移(“FRET”),以检测和定量合成的PCR产物。通常,

[0177] TAQMAN[®]探针包含偶联至5'-端的荧光染料分子和偶联至3'-端的猝灭剂分子,使得所述染料和所述猝灭剂紧密靠近,从而允许猝灭剂通过FRET抑制染料的荧光信号。当聚合酶复制TAQMAN[®]探针所结合的嵌合扩增子模板时,所述聚合酶的5'-核酸酶切割探针,从而使染料与猝灭剂解偶联,以便检测到染料信号(诸如荧光)。信号(诸如荧光)随

每个PCR循环与被切割的探针的量成比例地增加。

[0178] 在某些实施方案中,如果在PCR循环中从TAQMAN[®]探针产生任何信号,则认为检测到靶基因。例如,在某些实施方案中,如果PCR包括40个循环,如果在扩增过程中在任何循环处产生信号,则认为靶基因存在并被检测到。在某些实施方案中,如果在PCR循环的最后没有产生信号,则认为靶基因不存在以及未被检测到。

[0179] 在某些实施方案中,通过从已知浓度的核酸构建标准曲线,并且然后推算未知浓度的靶基因的定量信息,进行实时PCR测定的结果的定量。在某些实施方案中,用于产生标准曲线的核酸是DNA(例如内源对照或外源对照)。在某些实施方案中,用于产生标准曲线的核酸是在体外产生的纯化的双链质粒DNA或单链DNA。

[0180] 在某些实施方案中,为了用测定将ATB、STB或ITB与其它疾病区分开,内源对照(诸如SAC)和/或外源对照(诸如SPC)的Ct值必须在先前确定的有效范围内。也就是说,在某些实施方案中,不能确认TB的不存在,除非检测到对照,所述对照指示测定是成功的。在某些实施方案中,所述测定包括外源对照。Ct值与样品中核酸靶标的量成反比。

[0181] 在某些实施方案中,先前已经确定靶基因(包括内源对照和/或外源对照)的阈值Ct(或“截止Ct”)值,低于该值则认为检测到所述基因。在某些实施方案中,使用基本上相同的测定条件和将在其上试验样品的系统(诸如GENEXPERT[®])来确定阈值Ct。在某些实施方案中,确定 Δ Ct值。

[0182] 除了TAQMAN[®]测定外,在本文所述的方法中可用于检测和定量PCR产物的其它实时PCR化学包括但不限于分子信标、Scorpions探针和嵌入染料,诸如SYBR绿、EvaGreen、噻唑橙、YO-PRO、TO-PRO等,它们在下面讨论。

[0183] 在各种实施方案中,在单个多路反应中利用实时PCR检测来检测生物标志物和任选的内源对照和外源对照。在某些多路实施方案中,使用多种探针,诸如TAQMAN[®]探针,其各自对不同靶标具有特异性。在某些实施方案中,每种靶基因特异性探针与用于同一个多路反应中的其它探针可以在光谱上区分。一种非限制性的示例性七色多路系统描述在例如Lee等人,BioTechniques,27:342-349中,且一种十色多路系统已经描述在例如Xie等人.NEngl JMed 2017;377:1043-1054和Chakravorty等人.J Clin Microbiol2016;55:183-198中。

[0184] 在某些实施方案中,使用结合双链DNA产物的染料(诸如SYBR绿、EvaGreen、噻唑橙、YO-PRO、TO-PRO等)完成实时RT-PCR产物的定量。在某些实施方案中,所述测定是来自Qiagen的QuantiTect SYBR绿PCR测定。在该测定中,首先从样品分离总RNA。然后将总RNA在3'-端多腺苷酸化,并且使用在5'-端具有聚-dT的通用引物反转录。在某些实施方案中,单个反转录反应足以测定多个靶RNA。然后使用靶RNA特异性的引物和ImiScript通用引物(其在5'-端包含聚-dT序列)完成实时RT-PCR。SYBR绿染料非特异性地结合双链DNA并且在激发后发光。在某些实施方案中,促进引物与PCR模板的高特异性退火的缓冲条件(例如,可来自Qiagen的QuantiTect SYBR绿PCR试剂盒中获得)可以用于避免非特异性的DNA双链体和引物二聚体(它们将结合SYBR绿并且不利地影响定量)的形成。因此,随着PCR产物积累,来自SYBR绿的信号增加,从而允许特定产物的定量。

[0185] 使用本领域可获得的任何PCR仪器进行实时PCR。通常,用于实时PCR数据收集和分

析中的仪器包含热循环仪、用于荧光激发和发射收集的光学器件、以及任选的计算机和数据采集和分析软件。

[0186] 在某些实施方案中,使用结合双链DNA产物的染料(诸如SYBR绿、EvaGreen、噻唑橙、YO-PRO、TO-PRO等)完成实时PCR产物的检测和/或定量。在某些实施方案中,用于本文描述的方法中的分析方法是DASL[®](DNA介导的退火、选择、延伸和连接)测定。在某些实施方案中,通过任何方法从要分析的样品中分离总RNA。然后可以将总RNA多腺苷酸化(将>18个A残基添加到在反应混合物中的RNA的3'-端)。使用生物素标记的DNA引物反转录RNA,所述DNA引物从5'到3'端包含这样的序列:其包括PCR引物位点和结合样品RNA的聚-dA尾的聚-dT区域。然后将得到的生物素化的cDNA转录物通过生物素-抗生蛋白链菌素相互作用与固体支持物杂交并且与一种或多种靶RNA特异性的多核苷酸接触。靶RNA特异性的多核苷酸从5'-端到3'-端包含:包含PCR引物位点的区域、包含地址序列的区域和靶RNA特异性的序列。

[0187] 在某些DASL[®]实施方案中,靶RNA特异性的序列包含至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19个邻接核苷酸,其序列与靶RNA、内源对照RNA或外源对照RNA的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19个邻接核苷酸相同或互补。

[0188] 在杂交后,将靶RNA特异性的多核苷酸延伸,并且然后将延伸的产物从固定化的cDNA阵列洗脱。使用荧光标记的通用引物的第二PCR反应产生包含靶RNA特异性序列的荧光标记的DNA。然后将标记的PCR产物与用于检测和定量的微珠阵列杂交。

[0189] 在某些实施方案中,在本文描述的方法中用于检测和定量靶基因的分析方法是基于珠子的流式细胞计数测定。参见Lu J.等人(2005)Nature435:834-838,其通过引用整体并入本文。基于珠子的流式细胞计数测定的一个实例是Luminex, Inc.的xMAP[®]技术。参见luminexcorp.com。在某些实施方案中,将总RNA从样品分离并且随后用生物素标记。然后将标记的RNA与共价结合至微珠的靶RNA特异性捕获探针(例如,由Luminex, Inc.出售的FlexmiR[™]产品,在luminexcorp.com)杂交,每种捕获探针用具有不同荧光强度的2种染料标记。将抗生蛋白链菌素结合的报告分子(例如,抗生蛋白链菌素-藻红蛋白,也被称作“SAPE”)连接至捕获的靶RNA,并且使用流式细胞计量术读出每个珠子的独特信号。在某些实施方案中,首先将RNA样品多腺苷酸化,并且随后使用桥接多核苷酸用生物素化的3DNA[™]树枝状聚合物(即,与其结合了多个生物素分子的多臂DNA)标记,所述桥接多核苷酸与样品RNA的聚-dA尾的3'-端互补以及与连接至生物素化的树枝状聚合物的多核苷酸的5'-端互补。然后将抗生蛋白链菌素结合的报告分子连接至生物素化的树枝状聚合物,然后通过流式细胞计量术分析。在某些实施方案中,首先将生物素标记的RNA暴露于SAPE,并且随后将RNA/SAPE复合物暴露于连接至DNA树枝状聚合物(其可以结合多至900个生物素分子)的抗-藻红蛋白抗体。这允许多个SAPE分子通过生物素-抗生蛋白链菌素相互作用结合生物素化的树枝状聚合物,从而增加来自测定的信号。

[0190] 在某些实施方案中,在本文描述的方法中用于检测和定量至少一种靶基因的水平的方法是通过凝胶电泳和利用经标记的探针(例如,用放射性标记或化学发光标记标记过的探针)的检测,诸如通过RNA印迹法。在某些实施方案中,从样品分离总RNA,并且然后

通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳按大小分离。然后将分离的RNA印迹在膜上并且与放射性标记的互补探针杂交。在某些实施方案中,示例性的探针含有一种或多种如下文讨论的增强亲和力的核苷酸类似物,诸如锁核酸(“LNA”)类似物,其含有二环糖部分,而不是脱氧核糖或核糖。参见,例如,Varallyay, E.等人(2008) Nature Protocols 3(2):190-196,其通过引用整体并入本文。

[0191] 在某些实施方案中,使用微流控装置和单分子检测实现一种或多种靶基因的检测和定量。在某些实施方案中,将分离的总RNA的样品中的靶RNA与两种探针杂交,其中一种与靶RNA的5' -端的核酸互补并且第二种与靶RNA的3' -端互补。在某些实施方案中,每种探针包含一种或多种增强亲和力的核苷酸类似物,诸如LNA核苷酸类似物,并且每种用具有不同荧光发射谱的不同荧光染料(即,可检测地不同的染料)标记。然后将样品流过微流体毛细管,在其中多种激光激发荧光探针,使得光子的独特一致爆发鉴定出特定靶RNA,并且可以计数光子的特定独特一致爆发的数目以定量样品中靶RNA的量。在某些替代实施方案中,靶RNA特异性的探针可以用3种或更多种独特标记进行标记,所述标记选自例如荧光团、电子自旋标记等,并且然后与RNA样品杂交。

[0192] 示例性的自动化和系统

[0193] 在某些实施方案中,使用自动化的样品操作和/或分析平台检测基因表达。在某些实施方案中,利用商购可得的自动化分析平台。例如,在某些实施方案中,利用GENEXPERT[®]系统(Cepheid, Sunnyvale, CA)。

[0194] 解释了本公开内容与GENEXPERT[®]系统一起的使用。在下面描述了示例性的样品制备和分析方法。但是,本公开内容不限于特定检测方法或分析平台。本领域技术人员认识到可以利用任何数目的平台和方法。

[0195] GENEXPERT[®]利用自给的一次性筒。样品提取、扩增和检测都可以在这个自给的“筒内实验室”内完成(参见例如,美国专利5,958,349、6,403,037、6,440,725、6,783,736、6,818,185;它们中的每一篇通过引用整体并入本文)。所述筒可以是符合临床实验室改进修正案(CLIA)的筒,按照CLIA操作,由符合CLIA的实验室操作,或在符合CLIA的地方操作。

[0196] 筒的组件包括但不限于,含有试剂的处理腔室,过滤器,和用于提取、纯化和扩增靶核酸的捕获技术。阀使得流体能够在腔室之间转移并且含有核酸裂解和过滤组件。光学窗口使得能够实时光学检测。反应管使得能够非常快速地热循环。

[0197] 在某些实施方案中,所述GENEXPERT[®]系统包括用于可扩展性的多个模块。每个模块包括多个筒、以及样品操作和分析组件。

[0198] 在将样品加入筒中以后,使样品与裂解缓冲液接触并且释放的核酸(NA)结合至NA结合基质诸如二氧化硅或玻璃基质。然后将样品上清液移除,并且在洗脱缓冲液诸如Tris/EDTA缓冲液中洗脱NA。然后可以将洗脱液在筒中处理以检测如本文描述的靶基因。在某些实施方案中,使用洗脱液重构至少某些PCR试剂,其作为冻干的颗粒存在于筒中。

[0199] 在某些实施方案中,将RT-PCR用于扩增和分析靶基因的存在。在某些实施方案中,反转录使用MMLV RT酶并且在40°C至50°C温育5至20分钟。在某些实施方案中,PCR使用具有热启动功能的Taq聚合酶,诸如AptaTaq (Roche)。在某些实施方案中,初始变性在90°C至100

℃保持20秒至5分钟;循环变性温度是在90℃至100℃保持1至10秒;循环退火和扩增温度是在60℃至75℃保持10至40秒;并且进行至多50个循环。在某些实施方案中,可以使用不同的RT。它可以来自另一种生物体,或可以是RT酶的天然或经工程改造的变体,其可以为不同温度温育进行优化。

[0200] 本公开内容不限于特定引物和/或探针序列。

[0201] 示例性的数据分析

[0202] 在某些实施方案中,使用基于计算机的分析程序将由检测测定产生的原始数据转换为临床医师的预测值数据。临床医师可以使用任何合适的方式访问预测数据。因而,在某些实施方案中,本公开内容提供了进一步的益处,即不太可能经过遗传学或分子生物学培训的临床医师不需要理解原始数据。数据以其最有用的形式直接呈现给临床医师。然后,临床医师能够立即利用该信息以优化受试者的护理。

[0203] 本公开内容考虑能够向/从执行测定的实验室、信息提供者、医务人员和受试者接收、处理和传输信息的任何方法。例如,在本公开内容的某些实施方案中,从受试者获得样品(例如,血液样品)并且提供给分析者(例如,在医疗设施处的临床实验室),其位于世界的任何地方(例如,在与受试者居住的国家或最终使用信息的国家不同的国家),以产生原始数据。在样品包含组织或其它生物样品的情况下,受试者可以访问医学中心以获得样品并且发送至分析中心,或受试者可以自己收集样品(例如,尿样品或痰样品)并且直接将它发送至分析中心。在样品包含先前确定的生物学信息的情况下,所述信息可以由受试者直接发送给分析服务(例如,含有该信息的信息卡可以由计算机扫描并且使用电子通信系统将数据传送至分析中心的计算机)。一旦被分析服务接收,就处理样品并产生对受试者所需的诊断或预后信息特异性的特征(即,表达数据)。

[0204] 然后以适合于主治临床医师解释的格式来制备特征数据。例如,不是提供原始表达数据,而是制备的格式可以代表受试者的诊断或风险评估,伴有或没有对特定治疗选择的推荐。所述数据可以通过任何合适的方法显示给临床医师。例如,在某些实施方案中,所述分析服务产生这样的报告:其可以为临床医师打印(例如,在护理地点)或在计算机监视器上显示给临床医师。

[0205] 在某些实施方案中,首先在护理地点处或在当地设施处分析信息。然后将原始数据发送至中心处理设施用于进一步分析和/或将原始数据转换为对临床医师或患者有用的信息。中心处理设施提供了数据分析的隐私(所有数据都用统一的安全协议存储在中心设施中)、速度和一致性方面的优点。所述中心处理设施然后可以在受试者的治疗以后控制数据的命运。例如,使用电子通信系统,中心设施可以将数据提供给临床医师、受试者或研究人员。

[0206] 在某些实施方案中,所述受试者能够使用电子通信系统直接访问数据。所述受试者可以基于结果选择进一步干预或咨询。在某些实施方案中,将数据用于研究用途。例如,数据可以用于进一步优化标志物的包含或消除,以作为疾病的特定状况或阶段的有用指标或作为伴随诊断来确定治疗行动过程。

[0207] 示例性的多核苷酸

[0208] 在某些实施方案中,提供多核苷酸。在某些实施方案中,提供合成的多核苷酸。如本文中使用的合成的多核苷酸表示已经在体外化学地或酶促地合成的多核苷酸。多核苷酸

的化学合成包括但不限于使用多核苷酸合成仪的合成,诸如OligoPilot (Cytiva)、ABI 3900DNA合成仪 (Applied Biosystems) 等。酶促合成包括但不限于通过酶促扩增(例如,PCR)产生多核苷酸。多核苷酸可以包含本文中讨论的一种或多种核苷酸类似物(即,修饰的核苷酸)。

[0209] 在各种实施方案中,多核苷酸包含少于500、少于300、少于200、少于150、少于100、少于75、少于50、少于40或少于30个核苷酸。在各种实施方案中,多核苷酸是6至200、8至200、8至150、8至100、8至75、8至50、8至40、8至30、15至100、15至75、15至50、15至40或15至30个核苷酸长。

[0210] 所述多核苷酸可以是引物。在某些实施方案中,所述引物用可检测的部分标记。在某些实施方案中,引物未被标记。本文中使用的引物是这样的多核苷酸:其能够选择性地与靶RNA、或从靶RNA反转录的cDNA、或已经从靶RNA或cDNA扩增的扩增子(被统称为“模板”)杂交,并且在模板、聚合酶和合适的缓冲液和试剂存在下可以被延伸以形成引物延伸产物。

[0211] 所述多核苷酸可以是探针。在某些实施方案中,所述探针用可检测的部分标记。本文中使用的可检测的部分包括直接可检测的部分,诸如荧光染料,和间接可检测的部分,诸如结合对的成员。当可检测的部分是结合对的成员时,在某些实施方案中,通过将探针与结合至结合对的第二成员的可检测标记一起温育,可以检测探针。在某些实施方案中,探针未被标记,诸如当探针是捕获探针时,例如,在微阵列或珠子上。在某些实施方案中,探针不是可延伸的,例如,通过聚合酶延伸。在其它实施方案中,探针是可延伸的。

[0212] 在某些实施方案中,所述多核苷酸是FRET探针,其在某些实施方案中在5'-端用荧光染料(供体)标记并且在3'-端用猝灭剂(受体)标记,所述猝灭剂是一种当基团紧密靠近(即,连接至同一探针)时吸收(即,抑制)从染料发出的荧光的化学基团。因此,在某些实施方案中,染料的发射谱应该与猝灭剂的吸收谱相当大地重叠。在其它实施方案中,染料和猝灭剂不是在FRET探针的末端处。

[0213] 示例性的多核苷酸修饰

[0214] 在某些实施方案中,本文描述的检测至少一种靶基因的方法采用一种或多种已经被修饰过的多核苷酸,诸如包含一种或多种增强亲和力的核苷酸类似物的多核苷酸。可用于本文描述的方法中的经修饰的多核苷酸包括用于反转录的引物、PCR扩增引物和探针。在某些实施方案中,与仅含有脱氧核糖核苷酸的多核苷酸相比,增强亲和力的核苷酸的掺入增加多核苷酸对其靶核酸的结合亲和力和特异性,并且允许使用更短的多核苷酸或多核苷酸和靶核酸之间的更短的互补性区域。

[0215] 在某些实施方案中,增强亲和力的核苷酸类似物包括包含一个或多个碱基修饰、糖修饰和/或主链修饰的核苷酸。

[0216] 在某些实施方案中,用于增强亲和力的核苷酸类似物中的经修饰的碱基包括5-甲基胞嘧啶、异胞嘧啶、假异胞嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶、6-氨基嘌呤、2-氨基嘌呤、肌苷、二氨基嘌呤、2-氯-6-氨基嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤。

[0217] 在某些实施方案中,增强亲和力的核苷酸类似物包括具有经修饰的糖的核苷酸,所述经修饰的糖诸如2'-取代的糖,诸如2'-O-烷基-核糖、2'-氨基-脱氧核糖、2'-氟-脱氧核糖、2'-氟-阿拉伯糖和2'-O-甲氧基乙基-核糖(2' MOE)。在某些实施方案中,经修饰的糖是阿拉伯糖或d-阿拉伯-己糖醇糖。

[0218] 在某些实施方案中,增强亲和力的核苷酸类似物包括主链修饰,诸如使用肽核酸(PNA;例如,包括通过氨基酸主链连接在一起的核碱基的寡聚物)。其它主链修饰包括硫代磷酸酯键、磷酸二酯修饰的核酸、磷酸二酯和硫代磷酸酯核酸的组合、甲基磷酸酯、烷基磷酸酯、磷酸酯、烷基硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯、碳酸酯、磷酸三酯、乙亚胺酸酯、羧甲基酯、甲基硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、对乙氧基和它们的组合。

[0219] 在某些实施方案中,多核苷酸包括至少一个具有经修饰的碱基的增强亲和力的核苷酸类似物、至少一个具有经修饰的糖的核苷酸(其可以是相同的核苷酸)和/或至少一个非天然存在的核苷酸间连接。

[0220] 在某些实施方案中,增强亲和力的核苷酸类似物含有锁核酸(“LNA”)糖,其为二环路糖。在某些实施方案中,用于本文描述的方法中的多核苷酸包含一个或多个具有LNA糖的核苷酸。在某些实施方案中,多核苷酸含有一个或多个由具有LNA糖的核苷酸组成的区域。在其它实施方案中,多核苷酸含有散布有脱氧核糖核苷酸的具有LNA糖的核苷酸。参见,例如,Frieden,M.等人(2008)Curr.Pharm.Des.14(11):1138-1142。

[0221] 示例性的引物

[0222] 在某些实施方案中,使用引物和引物对。在某些实施方案中,引物与生物标志物靶标的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性。

[0223] 在某些实施方案中,引物还可以包含不与靶基因相同或互补的部分或区域。在某些实施方案中,引物的与靶基因具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或互补性的区域是连续的,使得引物的不与靶基因具有同一性或互补性的任何区域不破坏具有同一性或互补性的区域。

[0224] 在某些实施方案中,引物包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的部分。在某些这样的实施方案中,包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的区域的引物能够选择性地与已经从RNA反转录的cDNA杂交,或与已经通过靶基因的扩增而产生的扩增子杂交。在某些实施方案中,所述引物与cDNA或扩增子的足够部分互补,使得它在使用的特定测定条件下选择性地与cDNA或扩增子杂交。

[0225] 在具体实例中,DUSP3的引物对产生50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长、90-150个核苷酸长或50-150个核苷酸长的扩增子。DUSP3的核苷酸序列的实例在登录号AC003098下公开在NCBI数据库中。更具体地,DUSP3的引物对可以产生这样的扩增子:其跨越在登录号AC003098下在NCBI数据库中公开的DUSP3的核苷酸序列的外显子2和/或3。在其它具体实例中,GBP5的引物对产生50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长、90-150个核苷酸长或50-150个核苷酸长的扩增子。GBP5的核苷酸序列的实例在登录号AC099063下公开在NCBI数据库中。更具体地,DUSP3的引物对可以产生这样的扩增子:其跨越在登录号AC099063下在NCBI数据库中公开的GBP5的核苷酸序列的外显子9和/或10。在其它具体实例中,TBP的引物对产生50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长、90-

150个核苷酸长或50-150个核苷酸长的扩增子。TBP的核苷酸序列的实例在登录号AL031259下公开在NCBI数据库中。更具体地，TBP的引物对可以产生这样的扩增子：其跨越在登录号AL031259下在NCBI数据库中公开的TBP的核苷酸序列的外显子3和/或4。在某些实施方案中，用于检测TBP的引物对的至少一种引物可以包含与SEQ ID NO:4 (图6)的至少10(至少12、至少14或至少15)个邻接核苷酸相同或互补的序列。在其它更具体的实例中，TBP的引物对可以包括SEQ ID NO:1:CCCGAAACGCCGAATATAATCC(正向引物)和SEQ ID NO:2:CTCCTGTGCACACCATTTTCC(反向引物)。

[0226] 本文中使用的“选择性地杂交”是指，多核苷酸(诸如引物或探针)将与样品中的特定核酸杂交的亲合力是它将与存在于相同样品中的、在杂交区域中具有不同核苷酸序列的另一种核酸杂交的亲合力的至少5倍。在本文中讨论了示例性的杂交条件，例如，在反转录反应或PCR扩增反应的背景中。在某些实施方案中，多核苷酸将与样品中的特定核酸杂交的亲合力是它将与存在于相同样品中的、在杂交区域中具有不同核苷酸序列的另一种核酸杂交的亲合力的至少10倍。

[0227] 在某些实施方案中，将引物用于反转录靶RNA，例如，如本文中讨论的。在某些实施方案中，将引物用于扩增靶RNA或其反转录的cDNA。在某些实施方案中，这样的扩增是定量PCR，例如，如本文中讨论的。

[0228] 在某些实施方案中，引物包含可检测的部分。

[0229] 在某些实施方案中，使用引物对。这样的引物对被设计成扩增生物标志物基因的一部分，或内源对照诸如样品足够性对照(SAC)，或外源对照诸如样品处理对照(SPC)。在某些实施方案中，将引物对设计成产生50-1500个核苷酸长、50-1000个核苷酸长、50-750个核苷酸长、50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长、50-150个核苷酸长、100-300个核苷酸长、100-200个核苷酸长或100-150个核苷酸长的扩增子。

[0230] 使用DNA Software, Inc.的Visual OMP(寡核苷酸建模平台)，可以进行用于扩增RNA片段的引物和探针的设计。Visual OMP在计算机环境中通过并入所有公共结构域热力学参数以及DNA、RNA、PNA和肌苷的专有最近邻和多态热力学参数对单链核酸的折叠和杂交进行建模。这使得能够有效设计引物和探针用于复杂的测定诸如微阵列、微流体应用和多路PCR。计算机环境实验在给出的指定条件下模拟靶标(最佳和次佳)、引物(最佳和次佳)、同源二聚体、以及靶标和引物异源二聚体的二级结构。为所有物质计算熔化温度(T_m)、自由能(ΔG)、结合百分比和浓度的值。此外，Visual OMP预测在单个或多路反应中引物和探针与一种或多种靶标之间的结合效率。

[0231] 使用该软件工具，可以在热力学上评价寡核苷酸和不同靶标之间的预测的相互作用，并且使不希望的相互作用最小化。

[0232] 示例性的探针

[0233] 在各种实施方案中，测量生物标志物的水平的方法包含使样品的核酸与探针杂交。

[0234] 在某些实施方案中，所述探针包含与靶基因或内源对照诸如样品足够性对照(SAC)或外源对照诸如样品处理对照(SPC)互补的部分。在某些实施方案中，所述探针包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的部分。

[0235] 在某些这样的实施方案中,与靶基因具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的探针是与靶基因的足够部分互补的,使得它在使用的特定测定条件下选择性地与靶基因杂交。在某些实施方案中,与靶基因互补的探针包含与靶基因的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的区域。

[0236] 与靶基因具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的探针还可以包含与靶基因不互补的部分或区域。在某些实施方案中,探针的与靶基因具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的区域是相邻的,使得探针的与靶基因不互补的任何区域不破坏互补区域。

[0237] 在某些实施方案中,所述探针包含与靶基因的区域或内源对照诸如样品足够性对照(SAC)或外源对照诸如样品处理对照(SPC)具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的部分。在某些这样的实施方案中,包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的区域的探针能够选择性地与已经从靶基因反转录的cDNA杂交或与已经通过靶基因的扩增而产生的扩增子杂交。在某些实施方案中,所述探针与cDNA或扩增子的足够部分具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性,使得它在使用的特定测定条件下选择性地与cDNA或扩增子杂交。在某些实施方案中,与cDNA或扩增子互补的探针包含与cDNA或扩增子的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24、至少25、至少26、至少27、至少28、至少29或至少30个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的区域。与cDNA或扩增子具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的探针还可以包含与cDNA或扩增子不互补的部分或区域。在某些实施方案中,探针的与cDNA或扩增子具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的区域是相邻的,使得探针的与cDNA或扩增子不互补的任何区域不破坏互补区域。

[0238] 在具体实例中,DUSP3的探针可以包括这样的寡核苷酸:其为10-30、12-25或16-22个核苷酸长并且与从本文描述的其引物对产生的扩增子内的区域互补。更具体地,DUSP3的探针可以包括这样的寡核苷酸:其与在登录号AC003098下在NCBI数据库中公开的DUSP3的核苷酸序列的外显子3和/或4内的区域互补。在其它具体实例中,GBP5的探针可以包括这样的寡核苷酸:其为10-30、12-25或16-22个核苷酸长并且与从本文描述的其引物对产生的扩增子内的区域互补。更具体地,GBP5的引物对可以包括这样的寡核苷酸:其与在登录号AC099063下在NCBI数据库中公开的GBP5的核苷酸序列的外显子3和/或4内的区域互补。在其它具体实例中,TBP的探针可以包括这样的寡核苷酸:其为10-30、12-25或16-22个核苷酸长并且与从本文描述的其引物对产生的扩增子内的区域互补。更具体地,TBP的引物对可以包括这样的寡核苷酸:其与在登录号AL031259下在NCBI数据库中公开的TBP的核苷酸序列的外显子3和/或4内的区域互补。在某些实施方案中,用于检测TBP的探针可以包含与SEQ ID NO:4(图6)的至少10(至少12、至少14或至少15)个邻接核苷酸相同或互补的序列。在其它更具体的实例中,TBP的探针可以包括SEQ ID NO:3:CCACGAACCACGGCACTGATTTT。

[0239] 在某些实施方案中,检测一种或多种靶基因的方法包含:(a)反转录靶RNA以产生与靶RNA互补的cDNA;(b)扩增来自(a)的cDNA;和(c)使用实时RT-PCR和检测探针检测靶RNA

的量(其可以与扩增步骤(b)同时)。

[0240] 如上文所述的,在某些实施方案中,使用FRET探针,其包括但不限于TAQMAN[®]探针、分子信标探针和Scorpions探针,可以进行实时RT-PCR检测。在某些实施方案中,用TAQMAN[®]探针进行实时RT-PCR检测,所述TAQMAN[®]探针是线性探针,其通常具有共价结合在DNA的一个末端处的荧光染料和共价结合在DNA的其它地方(诸如在另一个末端处)的猝灭剂分子。FRET探针包含与cDNA或扩增子的区域互补的序列,使得当FRET探针与cDNA或扩增子杂交时,染料荧光被猝灭,并且当所述探针在cDNA或扩增子的扩增过程中被消化时,染料从探针释放并且产生荧光信号。在某些实施方案中,样品中靶基因的量与在扩增过程中测量的荧光的量成比例。

[0241] TAQMAN[®]探针通常包含具有特定序列的邻接核苷酸区域,所述特定序列与靶基因或从靶RNA模板反转录的其互补cDNA的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或互补性(即,探针区域的序列与要检测的靶RNA互补或相同地存在于要检测的靶RNA中),使得所述探针可选择性地与靶基因的区域PCR扩增子杂交。在某些实施方案中,所述探针包含具有特定序列的至少6个邻接核苷酸区域,所述特定序列与已经从靶基因反转录的cDNA的区域完全互补或相同地存在于已经从靶基因反转录的cDNA的区域中。在某些实施方案中,所述探针包含与具有特定序列的至少8个邻接核苷酸、至少10个邻接核苷酸、至少12个邻接核苷酸、至少14个邻接核苷酸或至少16个邻接核苷酸具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或互补性的区域,所述特定序列与从要检测的靶基因反转录的cDNA的区域互补或相同地存在于从要检测的靶基因反转录的cDNA的区域中。

[0242] 在某些实施方案中,具有与TAQMAN[®]探针序列具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的序列的扩增子区域是在扩增子分子的中心处或附近。在某些实施方案中,在互补性区域的5'-端处和3'-处端独立地存在扩增子的至少2个核苷酸,诸如至少3个核苷酸,诸如至少4个核苷酸,诸如至少5个核苷酸。

[0243] 在某些实施方案中,分子信标可以用于检测PCR产物。与TAQMAN[®]探针类似,分子信标通过具有连接在探针的末端处的荧光染料和猝灭剂的探针使用FRET来检测PCR产物。不同于TAQMAN[®]探针,分子信标在PCR循环期间仍然保持完整。分子信标探针当游离在溶液中时形成茎-环结构,从而允许染料和猝灭剂足够接近以造成荧光猝灭。当分子信标与靶标杂交时,茎-环结构被消除,使得染料和猝灭剂在空间上分开并且染料发出荧光。分子信标可以得自例如Gene Link[™](参见genelink.com)。

[0244] 在某些实施方案中,Scorpion探针可以用作序列特异性的引物和用于PCR产物检测。像分子信标一样,在不与靶核酸杂交时,Scorpions探针形成茎-环结构。但是,不同于分子信标,Scorpions探针实现序列特异性的引发和PCR产物检测。将荧光染料分子连接至Scorpions探针的5'-端,并且将猝灭剂连接在其它地方,诸如3'-端。探针的3'部分与PCR引物的延伸产物互补,并且该互补部分通过不可扩增部分连接至探针的5'-端。在Scorpions引物被延伸以后,探针的靶标特异性序列结合在延伸的扩增子内的其互补物,因此打开茎-环结构并且允许5'-端上的染料发荧光并产生信号。Scorpions探针可得自例如Premier Biosoft International(参见premierbiosoft.com)。

[0245] 在某些实施方案中,可以用在FRET探针上的标记包括比色和荧光染料诸如Alexa Fluor染料,BODIPY染料诸如BODIPY FL;Cascade Blue;Cascade Yellow;香豆素及其衍生物,诸如7-氨基-4-甲基香豆素、氨基香豆素和羟基香豆素;花青染料,诸如Cy3和Cy5;曙红和赤藓红;荧光素及其衍生物,诸如异硫氰酸荧光素;镧系元素离子的大环螯合物,诸如Quantum Dye™;Marina Blue;Oregon Green;罗丹明染料,诸如罗丹明红、四甲基罗丹明和罗丹明6G;Texas Red;荧光能量转移染料,诸如噻唑橙-乙锭(ethidium)异源二聚体;和TOTAB。

[0246] 染料的具体实例包括但不限于上文指出的那些和以下染料:AlexaFluor350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700和Alexa Fluor 750;胺反应性BODIPY染料,诸如BODIPY 493/503、BODIPY 530/550、BODIPY 558/568、BODIPY 564/570、BODIPY 576/589、BODIPY 581/591、BODIPY 630/650、BODIPY 650/655、BODIPY FL、BODIPY R6G、BODIPY TMR和BODIPY-TR;Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、Renographin、ROX、SYPRO、TAMRA、2',4',5',7'-四溴砒荧光素和TET。

[0247] 染料/猝灭剂对(即,供体/受体对)的实例包括但不限于荧光素/四甲基罗丹明;IAEDANS/荧光素;EDANS/dabcyl;荧光素/荧光素;BODIPY FL/BODIPY FL;荧光素/QSY 7或QSY 9染料。当供体和受体相同时,可以检测FRET,在某些实施方案中,通过荧光除极化。染料/猝灭剂对(即,供体/受体对)的某些具体实例包括但不限于Alexa Fluor 350/Alexa Fluor 488;Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 546;Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 555;Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 568;Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 594;Alexa Fluor 488/Alexa Fluor 647;Alexa Fluor 546/AlexaFluor 568;AlexaFluor 546/Alexa Fluor 594;Alexa Fluor 546/Alexa Fluor 647;AlexaFluor 555/AlexaFluor 594;Alexa Fluor 555/Alexa Fluor 647;Alexa Fluor 568/Alexa Fluor 647;Alexa Fluor 594/Alexa Fluor 647;Alexa Fluor 350/QSY35;Alexa Fluor 350/dabcyl;Alexa Fluor 488/QSY 35;Alexa Fluor 488/dabcyl;Alexa Fluor 488/QSY 7或QSY 9;Alexa Fluor 555/QSY 7或QSY9;Alexa Fluor 568/QSY 7或QSY 9;Alexa Fluor 568/QSY 21;Alexa Fluor 594/QSY 21;和Alexa Fluor 647/QSY 21。在某些情况下,相同的猝灭剂可以用于多种染料,例如,广谱猝灭剂,诸如IowaBlack®猝灭剂(Integrated DNA Technologies,Coralville, IA)或Black Hole Quencher™(BHQ™;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO)。

[0248] 在某些实施方案中,例如,在其中同时检测两种或更多种部分(诸如扩增子)的多路反应中,每种探针包含可检测地不同的染料,使得当在同一个反应中同时检测时,可以区分染料。本领域技术人员可以选择一组可检测地不同的染料用于多路反应。

[0249] 可用于制备用在本文描述的方法的某些实施方案中的PCR探针的荧光标记的核糖核苷酸的具体实例可得自Molecular Probes(Invitrogen),并且这些包括Alexa Fluor 488-5-UTP、荧光素-12-UTP、BODIPY FL-14-UTP、BODIPY TMR-14-UTP、四甲基罗丹明-6-UTP、Alexa Fluor 546-14-UTP、Texas Red-5-UTP和BODIPY TR-14-UTP。其它荧光核糖核苷

酸可得自Cytiva,诸如Cy3-UTP和Cy5-UTP。

[0250] 可用于制备用在本文描述的方法中的PCR探针的荧光标记的脱氧核糖核苷酸的实例包括二硝基苯基 (DNP) -1'-dUTP、Cascade Blue-7-dUTP、Alexa Fluor 488-5-dUTP、荧光素-12-dUTP、Oregon Green 488-5-dUTP、BODIPY FL-14-dUTP、罗丹明绿-5-dUTP、Alexa Fluor 532-5-dUTP、BODIPY TMR-14-dUTP、四甲基罗丹明-6-dUTP、Alexa Fluor 546-14-dUTP、Alexa Fluor 568-5-dUTP、Texas Red-12-dUTP、Texas Red-5-dUTP、BODIPY TR-14-dUTP、Alexa Fluor 594-5-dUTP、BODIPY 630/650-14-dUTP、BODIPY 650/665-14-dUTP; Alexa Fluor488-7-OBEA-dCTP、Alexa Fluor 546-16-OBEA-dCTP、Alexa Fluor594-7-OBEA-dCTP、Alexa Fluor 647-12-OBEA-dCTP。荧光标记的核苷酸是商购可得的并且可以购自例如Thermo Fisher。

[0251] 在某些实施方案中,所述FRET探针可以进一步包含在多路聚合酶链式反应 (PCR) 中减少引物-二聚体扩增的其它非天然修饰。美国专利号9,598,456B2和9,598,455B2描述了经修饰的碱基,其在杂交复合物中提供增强的碱基配对亲和力,它们的公开内容特此通过引用并入。

[0252] 在某些实施方案中,将染料和其它部分(诸如猝灭剂)通过修饰的核苷酸引入用在本文描述的方法中的多核苷酸(诸如FRET探针)中。“修饰的核苷酸”表示已经被化学修饰但仍然作为核苷酸起作用的核苷酸。在某些实施方案中,所述修饰的核苷酸具有共价连接的化学部分诸如染料或猝灭剂,并且可以引入多核苷酸中,例如,通过多核苷酸的固相合成。在其它实施方案中,所述修饰的核苷酸包括一个或多个反应基团,其可以在将修饰的核苷酸掺入核酸中之前、过程中或之后与染料或猝灭剂反应。在具体实施方案中,所述修饰的核苷酸是胺修饰的核苷酸,即,已经被修饰以具有反应性胺基团的核苷酸。在某些实施方案中,所述修饰的核苷酸包含经修饰的碱基部分,诸如尿苷、腺苷、鸟苷和/或胞嘧啶。在具体实施方案中,所述胺修饰的核苷酸选自5-(3-氨基烯丙基)-UTP;8-[(4-氨基)丁基]-氨基-ATP和8-[(6-氨基)丁基]-氨基-ATP;N6-(4-氨基)丁基-ATP、N6-(6-氨基)丁基-ATP、N4-[2,2-氧基-二-(乙胺)]-CTP;N6-(6-氨基)己基-ATP;8-[(6-氨基)己基]-氨基-ATP;5-炔丙基氨基-CTP、5-炔丙基氨基-UTP。在某些实施方案中,将具有不同核碱基部分的核苷酸类似地修饰,例如,5-(3-氨基烯丙基)-GTP替代5-(3-氨基烯丙基)-UTP。许多胺修饰的核苷酸可商购得自例如Applied Biosystems、Sigma、JenaBioscience和TriLink。

[0253] 示例性的可检测的部分还包括但不限于结合对的成员。在某些这样的实施方案中,结合对的第一成员连接至多核苷酸。结合对的第二成员连接至可检测标记,诸如荧光标记。当将连接至结合对的第一成员的多核苷酸与连接至可检测标记的结合对的第二成员一起温育时,结合对的第一成员和第二成员缔合并可以检测到多核苷酸。示例性的结合对包括但不限于生物素和抗生物素蛋白链菌素、抗体和抗原等。

[0254] 在某些实施方案中,在单个多路反应中检测多种靶基因。在某些这样的实施方案中,靶向独特的扩增子的每种探针当从探针释放时是在光谱上可辨别的,在该情况下,通过独特的荧光信号检测每种靶基因。在某些实施方案中,使用相同的荧光信号检测两种或更多种靶基因,在该情况下,该信号的检测指示靶基因之一或二者的存在。

[0255] 本领域技术人员可以选择适当的检测方法用于选择的测定,例如,实时RT-PCR测定。选择的检测方法不需要是上文所述的方法,并且可以是任何方法。

[0256] 示例性的组合物和试剂盒

[0257] 在另一个方面,提供了组合物。在某些实施方案中,提供了用于用在本文描述的方法中的组合物。

[0258] 在某些实施方案中,提供了组合物,其包含至少一种靶基因特异性的引物。术语“靶基因特异性的引物”和“靶RNA特异性的引物”可互换使用并涵盖具有邻接核苷酸区域的引物,所述区域具有符合以下特征的序列:(i)与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性,或(ii)与在靶基因中发现的邻接核苷酸区域的序列具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性。在某些实施方案中,提供了一种组合物,其包含至少一个靶基因特异性的引物对。术语“靶基因特异性的引物对”涵盖适合用于扩增限定的靶基因区域的引物对。靶基因特异性的引物对通常包含:包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的序列的第一引物,和包含与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的序列的第二引物。引物对通常适合用于扩增50-1500个核苷酸长、50-1000个核苷酸长、50-750个核苷酸长、50-500个核苷酸长、50-400个核苷酸长、50-300个核苷酸长、50-200个核苷酸长、50-150个核苷酸长、100-300个核苷酸长、100-200个核苷酸长或100-150个核苷酸长的靶基因的区域。

[0259] 在某些实施方案中,组合物包含至少一个靶基因特异性的引物对。在某些实施方案中,组合物另外包含用于扩增内源对照(诸如SAC)的靶基因特异性的引物对和/或一个用于扩增外源对照(诸如SPC)的靶基因特异性的引物对。例如,所述组合物可以包含一个或多个选自SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2或其组合的靶基因特异性的引物对。

[0260] 在某些实施方案中,组合物包含至少一种靶基因特异性的探针。术语“靶基因特异性的探针”和“靶RNA特异性的探针”可互换使用并涵盖具有邻接核苷酸区域的探针,所述区域具有符合以下特征的序列:(i)与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性,或(ii)与在靶基因中发现的邻接核苷酸区域的序列具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性。

[0261] 在某些实施方案中,组合物(包括上述的组合物,其包含一个或多个靶基因特异性的引物对)包含一种或多种用于检测靶基因的探针。在某些实施方案中,组合物包含用于检测内源对照(诸如SAC)的探针和/或用于检测外源对照(诸如SPC)的探针。例如,所述组合物可以包含一种或多种用于检测靶基因的探针,包括SEQ ID NO:3。

[0262] 在某些实施方案中,组合物是水性组合物。在某些实施方案中,水性组合物包含缓冲组分,诸如磷酸盐、tris、HEPES等,和/或如下文讨论的另外组分。在某些实施方案中,组合物是干燥的,例如,冻干的,并且适合用于通过加入液体进行重构。干燥的组合物可以包括一种或多种缓冲组分和/或另外组分。

[0263] 在某些实施方案中,组合物进一步包含一种或多种另外组分。另外组分包括但不限于盐,诸如NaCl、KCl和MgCl₂;聚合酶,包括热稳定的聚合酶诸如Taq; dNTP;反转录酶,诸如MMLV反转录酶;RNA酶抑制剂;牛血清白蛋白(BSA)等;还原剂,诸如β-巯基乙醇;EDTA等,等等。本领域技术人员可以根据组合物的预期用途选择合适的组合物组分。

[0264] 在某些实施方案中,提供了组合物,其包含用于检测至少一种靶基因的至少一种多核苷酸。在某些实施方案中,所述多核苷酸被用作反转录酶反应的引物。在某些实施方案中,所述多核苷酸被用作扩增的引物。在某些实施方案中,所述多核苷酸被用作PCR的引物。

在某些实施方案中,所述多核苷酸被用作用于检测至少一种靶基因的探针。在某些实施方案中,所述多核苷酸被可检测地标记。在某些实施方案中,所述多核苷酸是FRET探针。在某些实施方案中,所述多核苷酸是TAQMAN[®]探针、分子信标或Scorpions探针。

[0265] 在某些实施方案中,组合物包含至少一种FRET探针,其具有与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的序列。在某些实施方案中,将FRET探针用供体/受体对标记,使得当在PCR反应期间消化探针时,其产生与特定靶基因相关的独特荧光发射。在某些实施方案中,当组合物包含多种FRET探针时,将每种探针用不同供体/受体对标记,使得当在PCR反应期间消化探针时,每一种产生与特定探针序列和/或靶基因相关的独特荧光发射。在某些实施方案中,FRET探针的序列与靶基因的靶区域互补。在其它实施方案中,所述FRET探针具有包含一个或多个碱基错配的序列(当与靶基因的最佳对齐的靶区域的序列比较时)。

[0266] 在某些实施方案中,组合物包含由至少8、至少9、至少10、至少11、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个核苷酸组成的FRET探针,其中所述序列的至少一部分与靶基因的区域具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性或至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性。在某些实施方案中,FRET探针的至少8、至少9、至少10、至少11、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个核苷酸相同地存在于靶基因的区域中或与靶基因的区域互补。在某些实施方案中,所述FRET探针的序列与靶基因的序列或互补物相比具有1、2或3个碱基错配。

[0267] 在某些实施方案中,试剂盒包含上面讨论的多核苷酸。在某些实施方案中,试剂盒包含上面讨论的至少一种引物和/或探针。在某些实施方案中,试剂盒包含至少一种聚合酶,诸如热稳定的聚合酶。在某些实施方案中,试剂盒包含dNTP。在某些实施方案中,用于用在本文描述的实时RT-PCR方法中的试剂盒包含一种或多种靶基因特异性的FRET探针和/或一种或多种用于反转录靶RNA的引物和/或一种或多种用于扩增靶基因或从其反转录的cDNA的引物。

[0268] 在某些实施方案中,引物和/或探针中的一种或多种是“线性的”。“线性的”引物表示作为单链分子的多核苷酸,并且通常不包含例如至少3、4或5个邻接核苷酸的短区域,所述邻接核苷酸与同一多核苷酸内的另一个区域互补使得所述引物形成内部双链体。在某些实施方案中,用于反转录的引物在3'-端包含至少4个、诸如至少5个、诸如至少6个、诸如至少7个或更多个邻接核苷酸的区域,其具有与靶基因的5'-端的至少4个、诸如至少5个、诸如至少6个、诸如至少7个或更多个邻接核苷酸的区域互补的序列。

[0269] 在某些实施方案中,试剂盒包含一个或多个线性引物对(“正向引物”和“反向引物”),其用于扩增靶基因或从其反转录的cDNA。因此,在某些实施方案中,第一引物包含至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸的区域,该区域具有与靶基因中的第一位置处的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸区域的序列具有至少85%、至少90%、至少95%或100%同一性的序列。此外,在某些实施方案中,第二引物包含至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少

15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸的区域,该区域具有与靶基因中的第二位置处的至少8、至少9、至少10、至少11、至少12、至少13、至少14、至少15、至少16、至少17、至少18、至少19、至少20、至少21、至少22、至少23、至少24或至少25个邻接核苷酸的区域的序列具有至少85%、至少90%、至少95%或100%互补性的序列,使得使用所述两种引物的PCR反应产生从靶基因的第一位置延伸到靶基因的第二位置的扩增子。

[0270] 在某些实施方案中,所述试剂盒包含至少两组、至少三组或至少四组引物,其中每组用于扩增不同的靶基因或从其反转录的cDNA。在某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含至少一组用于扩增对照RNA(诸如内源对照和/或外源对照)的引物。

[0271] 在某些实施方案中,用于用在本文描述的组合物中的探针和/或引物包含脱氧核糖核苷酸。在某些实施方案中,用于用在本文描述的组合物中的探针和/或引物包含脱氧核糖核苷酸和一种或多种核苷酸类似物,诸如上面描述的LNA类似物或其它稳定双链体的核苷酸类似物。在某些实施方案中,用于用在本文描述的组合物中的探针和/或引物包含所有核苷酸类似物。在某些实施方案中,所述探针和/或引物在互补性区域中包含一种或多种稳定双链体的核苷酸类似物,诸如LNA类似物。

[0272] 在某些实施方案中,本文描述的用于用在实时RT-PCR方法中的试剂盒进一步包含用于用在反转录和扩增反应中的试剂。在某些实施方案中,所述试剂盒包含酶,诸如反转录酶或热稳定的DNA聚合酶,诸如Taq聚合酶。在某些实施方案中,所述试剂盒进一步包含用于用在反转录和/或扩增中的脱氧核糖核苷酸三磷酸(dNTP)。在其它实施方案中,所述试剂盒包含为探针和引物的特异性杂交优化的缓冲液。

[0273] 试剂盒通常包括具有一个或多个容器的包装,所述容器容纳试剂,作为一种或多种分开的组合物,或任选地,在将允许试剂的相容性的情况下,作为混合物。所述试剂盒还可以包括从用户的角度可能需要的其它材料,诸如缓冲液、稀释剂、标准品和/或可用于样品处理、洗涤或进行测定的任何其它步骤的任何其它材料。

[0274] 试剂盒优选地包括关于实现本文描述的一种或多种方法的说明书。包括在试剂盒中的说明书可以附着至包装材料或可以作为包装插页而包括在内。尽管说明书通常是书写的或打印的材料,但它们不限于此。本公开内容考虑能够存储这样的说明书并将它们传递给最终使用者的任何介质。这样的介质包括但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、筒、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。本文中使用的术语“说明书”可以包括提供说明书的因特网站点的地址。

[0275] 在某些实施方案中,所述试剂盒可以包含在一个或多个GENEXPERT[®]筒中提供的上文描述的试剂。这些筒允许在该自给的“筒中实验室”内进行提取、扩增和检测(参见例如,美国专利5,958,349、6,403,037、6,440,725、6,783,736、6,818,185、9,873,909和10,562,030;它们中的每一篇通过引用整体并入本文)。可以在试剂盒内的分开的筒中提供用于测量基因组拷贝数水平和检测病原体的试剂,或可以在单个筒中提供这些试剂(适用于多路检测)。

[0276] 在某些实施方案中,本文描述的任何试剂盒可以包括血液样品的容器。所述容器可以含有一种或多种抗原,或它可以是不包括抗原的Li-肝素管。

[0277] 在某些方面,本公开内容的试剂盒可以包含至少约1种试剂,或至少约2、或至少约

3、或至少约4、或至少约5、或至少约6、或至少约7、或至少约8、或至少约9、或至少约10种试剂,所述试剂专门用于检测至少约1种生物标志物、或至少约2、或至少约3、或至少约4、或至少约5、或至少约6、或至少约7、或至少约8、或至少约9、或至少约10种生物标志物(包括但不限于DUSP3、GBP5和TBP)的表达。在某些方面,专门用于检测至少一种生物标志物的表达的试剂可以包含引物、引物对、有义和反义引物对、特异性地与生物标志物杂交的多核苷酸或它们的任何组合。

[0278] 下述实例仅用于解释目的,并且无意以任何方式进行限制。

[0279] 示例性实施方案

[0280] 实施方案1.一种治疗患者的结核病的方法,其包含:

[0281] (a) 基于生物样品中GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,将所述患者鉴定为具有结核病;和

[0282] (b) 给所述患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0283] 实施方案2.实施方案1的方法,其中所述生物样品包含全血、痰、外周血单核细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0284] 实施方案3.实施方案1-2中的任一个的方法,其中所述生物样品包含全血、补充了抗凝血剂的全血或补充了RNA稳定缓冲剂的全血。

[0285] 实施方案4.实施方案1-3中的任一个的方法,其中将所述生物样品在从4°C至35°C的温度储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0286] 实施方案5.实施方案1-4中的任一个的方法,其中将所述生物样品在室温至35°C储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0287] 实施方案6.实施方案1-5中的任一个的方法,其中所述生物标志物是通过PCR定量的RNA生物标志物。

[0288] 实施方案7.实施方案6的方法,所述方法包含:

[0289] 使来自所述患者的生物样品与检测所述生物样品中的GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合接触,其中所述检测TBP的引物集合包括包含12-25个核苷酸长的核酸序列的第一引物和第二引物;

[0290] 生成通过GBP5、DUSP3和TBP的PCR产生的扩增子;和

[0291] 使所述扩增子与所述生物标志物中的每一种的至少一种探针接触,其中每种探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列和可检测标记。

[0292] 实施方案8.实施方案1-7中的任一个的方法,所述方法进一步包含将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或对照进行比较以区分活动性结核病、初始结核病和亚临床结核病感染的患者的步骤。

[0293] 实施方案9.实施方案1-8中的任一个的方法,其中所述患者被诊断为具有活动性结核病。

[0294] 实施方案10.实施方案1-9中的任一个的方法,其中给所述患者施用至少一种抗生素,其选自由以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0295] 实施方案11.实施方案9或10的方法,所述方法进一步包含给具有活动性结核病的患者施用有效量的皮质类固醇。

[0296] 实施方案12. 实施方案1-11中的任一个的方法, 所述方法进一步包含如下监测所述患者对治疗的应答:

[0297] (c) 将来自步骤(a)的所述生物样品中的生物标志物的表达水平与第二生物样品中的所述生物标志物的表达水平进行比较, 其中所述第二生物样品在第二时间点从所述患者得到, 或基于所述第一生物样品和所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平来计算TB评分, 以确定所述患者中的结核病感染是否改善或恶化; 和

[0298] (d) 任选地向所述患者施用第二治疗方案。

[0299] 实施方案13. 一种用于诊断和治疗患者中的活动性结核病感染的方法, 所述方法包含:

[0300] a) 使要分析所述活动性结核病感染的存在的生物样品与检测GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合接触, 其中所述引物集合中的每种引物是至少10个核苷酸长度;

[0301] b) 生成每种GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的扩增子;

[0302] c) 使所述扩增子与所述生物标志物中的每一种的至少一种探针接触, 其中每种探针包含可检测标记;

[0303] d) 测量每种生物标志物的表达水平, 并基于所述生物标志物的表达水平, 将所述患者诊断为具有活动性结核病感染; 和

[0304] e) 给诊断为具有活动性结核病的患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0305] 实施方案14. 实施方案13的方法, 其中所述用于检测TBP的引物集合包括包含12-25个核苷酸长的核酸序列的第一引物和第二引物; 且其中用于检测TBP的探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列。

[0306] 实施方案15. 一种用于诊断和治疗患者中结核病感染的各种阶段的方法, 所述方法包含:

[0307] (a) 从所述患者获得第一生物样品;

[0308] (b) 测量所述第一生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0309] (c) 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的参考值或与对照进行比较;

[0310] (d) 通过结合每种生物标志物的相应参考值范围来分析每种生物标志物的表达水平, 将所述患者诊断为具有活动性结核病、初始结核病或亚临床结核病; 和

[0311] (e) 给所述患者施用有效量的至少一种抗生素。

[0312] 实施方案16. 实施方案15的方法, 所述方法进一步包含如下监测所述患者对治疗的应答:

[0313] f) 在来自所述患者的第二生物样品中测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平, 其中所述第二生物样品在第二时间点从所述患者得到;

[0314] g) 将所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平与所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平进行比较, 或基于所述第一生物样品和所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平来计算TB评分, 以确定所述患者中的结核病感染是否改善或恶化; 和

[0315] h) 任选地向所述患者施用第二治疗方案。

[0316] 实施方案17. 实施方案13-16中的任一个的方法, 其中将所述生物样品在从4°C至35°C的温度储存至多24小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0317] 实施方案18.实施方案13-17中的任一个的方法,其中将所述生物样品在室温至35℃储存0.5至8小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0318] 实施方案19.实施方案13-18中的任一个的方法,其中给所述患者施用至少一种抗生素,其选自由以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0319] 实施方案20.实施方案19的方法,所述方法进一步包含给具有活动性结核病的患者施用有效量的皮质类固醇。

[0320] 实施方案21.一种试剂盒,其包含用于检测和/或测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平的引物和探针,

[0321] 其中所述引物包含用于检测GBP5生物标志物的第一PCR引物对、用于检测DUSP3生物标志物的第二PCR对和用于检测TBP生物标志物的第三PCR引物对;且

[0322] 其中所述探针包含用于检测GBP5生物标志物的至少一种探针、用于检测DUSP3生物标志物的至少一种探针和用于检测TBP生物标志物的至少一种探针,且

[0323] 其中每种探针包含可检测标记。

[0324] 实施方案22.实施方案21的试剂盒,其中每种探针包含荧光染料和猝灭剂分子。

[0325] 实施方案23.实施方案21或22的试剂盒,其中所述用于检测TBP的第三PCR引物对包含12-25个核苷酸长的核酸序列;且其中用于检测TBP的探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列。

[0326] 实施方案24.一种监测患者中的结核病感染的方法,所述方法包含:

[0327] a) 在来自所述受试者的第一生物样品中测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,其中所述第一生物样品在第一时间点从所述受试者得到;

[0328] b) 在来自所述受试者的第二生物样品中测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,其中所述第二生物样品在第二时间点从所述受试者得到;和

[0329] c) 将所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平与所述第二生物样品中所述生物标志物的表达水平进行比较,

[0330] 其中所述第二生物样品中GBP5、DUSP3或TBP生物标志物的表达水平与所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平相比的增加指示,所述患者中的结核病感染正在改善,并且所述第二生物样品中GBP5、DUSP3或TBP生物标志物的表达水平与所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平相比的降低指示,所述患者中的结核病感染正在恶化,或

[0331] 所述第二生物样品中GBP5、DUSP3或TBP生物标志物的表达水平与所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平相比的增加指示,所述患者中的结核病感染正在恶化,并且所述第二生物样品中GBP5、DUSP3或TBP生物标志物的表达水平与所述第一生物样品中所述生物标志物的表达水平相比的降低指示,所述患者中的结核病感染正在改善。

[0332] 实施方案25.一种监测受试者中的结核病感染的方法,所述方法包含:

[0333] a) 在来自所述受试者的第一生物样品中测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,其中所述第一生物样品在第一时间点从所述受试者得到;

[0334] b) 在来自所述受试者的第二生物样品中测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,其中所述第二生物样品在第二时间点从所述受试者得到;和

[0335] c) 基于所述第一生物样品和所述第二生物样品中GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的

表达水平,计算TB评分,

[0336] 其中所述第二生物样品的TB评分与所述第一生物样品的TB评分相比的降低指示,所述患者中的结核病感染正在改善,并且所述第二生物样品的TB评分与所述第一生物样品的TB评分相比的升高指示,所述患者中的结核病感染正在恶化;或

[0337] 其中所述第二生物样品的TB评分与所述第一生物样品的TB评分相比的降低指示,所述患者中的结核病感染正在恶化,并且所述第二生物样品的TB评分与所述第一生物样品的TB评分相比的升高指示,所述患者中的结核病感染正在改善。

[0338] 实施方案26.实施方案24或25的方法,其中所述第一时间点是在治疗所述患者的结核病之前,并且所述第二时间点是在用至少一种用于治疗结核病的抗生素治疗所述患者之后。

[0339] 实施方案27.实施方案24或25的方法,其中所述第一和第二时间点是在用至少一种用于治疗结核病的抗生素治疗所述患者之后。

[0340] 实施方案28.一种用于将患者中的活动性结核病与未感染、潜伏性结核病和其它肺部病症或感染性疾病区分开的方法,所述方法包含:

[0341] a) 从所述患者得到生物样品;

[0342] b) 测量GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平;和

[0343] c) 结合所述生物标志物的相应参考值范围来分析GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平,

[0344] 其中GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平与具有活动性结核病的受试者的参考值范围的相似性指示,所述患者具有活动性结核病,且

[0345] 其中GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的表达水平与未感染的或具有潜伏性结核病和其它肺部病症或感染性疾病的受试者的参考值范围的相似性指示,所述患者未被感染、具有潜伏性结核病或其它肺部病症或感染性疾病。

[0346] 实施方案29.一种用于诊断患者中的结核病的方法,所述方法包含:

[0347] a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0348] b) 基于DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平来确定评分,其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0349] \quad \text{评分} = \frac{(\text{GBP5} + \text{DUSP3})}{2} - \text{TBP}$$

[0350] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平,DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平,且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平;和

[0351] c) 基于所述评分鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病。

[0352] 实施方案30.实施方案29的方法,所述方法进一步包含给被鉴定为具有结核病的患者施用有效量的至少一种结核病治疗,其中所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合。

[0353] 实施方案31.实施方案29的方法,其中所述至少一种抗生素选自以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0354] 实施方案32.实施方案29-31中的任一个的方法,其中步骤(c)包含将所述评分与

预定的截止值进行比较。

[0355] 实施方案33.实施方案32的方法,其中:

[0356] i) 当所述评分大于或等于预定的截止值时,将所述患者鉴定为具有结核病;且当所述评分小于预定的截止值时,将所述患者鉴定为不具有结核病;或

[0357] ii) 当所述评分小于或等于预定的截止值时,将所述患者鉴定为具有结核病;且当所述评分大于预定的截止值时,将所述患者鉴定为不具有结核病。

[0358] 实施方案34.实施方案32或33的方法,其中所述预定的截止值区分活动性结核病、初始结核病和亚临床结核病感染的患者。

[0359] 实施方案35.实施方案32-34中的一个的方法,其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的特异性。

[0360] 实施方案36.实施方案32-35中的一个的方法,其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的敏感性。

[0361] 实施方案37.实施方案32-36中的一个的方法,其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阳性预测值。

[0362] 实施方案38.实施方案32-37中的一个的方法,其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阴性预测值。

[0363] 实施方案39.实施方案29-38中的任一个的方法,其中所述结核病是活动性结核病、初始结核病和亚临床结核病。

[0364] 实施方案40.实施方案29-39中的任一个的方法,其中所述生物样品包含全血、痰、外周血单核细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0365] 实施方案41.实施方案29-40中的任一个的方法,其中所述生物样品包含全血、补充了抗凝血剂的全血或补充了RNA稳定缓冲剂的全血。

[0366] 实施方案42.实施方案29-41中的任一个的方法,其中将所述生物样品在从4℃至35℃的温度储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0367] 实施方案43.实施方案29-42中的任一个的方法,其中将所述生物样品在室温至35℃储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0368] 实施方案44.实施方案29-43中的任一个的方法,其中所述生物标志物是通过PCR定量的RNA生物标志物。

[0369] 实施方案45.实施方案44的方法,所述方法包含:

[0370] 使来自所述患者的生物样品与检测所述生物样品中的GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合接触,其中所述检测TBP的引物集合包括包含12-25个核苷酸长的核酸序列的第一引物和第二引物;

[0371] 生成通过GBP5、DUSP3和TBP的PCR产生的扩增子;和

[0372] 使所述扩增子与所述生物标志物中的每一种的至少一种探针接触,其中每种探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列和可检测标记。

[0373] 实施方案46.一种用于将活动性结核病与未感染、潜伏性结核病和其它肺部病症或感染性疾病区分开,或患者中进展为活动性结核病的风险的筒,所述筒包含:

[0374] 多个流体连通的处理腔室,和

[0375] 与处理腔室流体连通的用于结合核酸的核酸结合基质,

[0376] 其中所述处理腔室包含用于裂解来自样品的细胞、扩增和检测来自样品的核酸的试剂,以及包含用于检测GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合的组合物。

[0377] 实施方案47. 实施方案46的筒,其中所述多个处理腔室包含

[0378] 与核酸结合基质流体连通的裂解腔室,其中所述裂解腔室包含一种或多种用于裂解细胞的试剂,和

[0379] 反应管,其与所述裂解腔室流体连通并被构造成用于扩增核酸和检测扩增产物。

[0380] 实施方案48. 实施方案46或47的筒,其中所述用于裂解细胞的试剂包含离液剂、螯合剂、缓冲剂和去污剂。

[0381] 实施方案49. 实施方案48的筒,其中所述离液剂选自硫氰酸胍、盐酸胍、碱金属高氯酸盐、碱金属碘化物、脲、甲酰胺或其组合。

[0382] 实施方案50. 实施方案46-49中的任一个的筒,其中

[0383] a) 用于检测TBP的引物集合选自:

[0384] i) 用于检测TBP基因的序列的正向引物和至少一种反向引物;或

[0385] ii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子3和/或4处的TBP基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子3和/或4处的TBP基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性,或

[0386] iii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:4的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:4的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性,

[0387] b) 用于检测GBP5的引物集合选自:

[0388] i) 用于检测GBP5基因的序列的正向引物和至少一种反向引物;或

[0389] ii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子9和/或10处的GBP5基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子9和/或10处的GBP5基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性,且

[0390] c) 用于检测DUSP3的引物集合选自:

[0391] i) 用于检测DUSP3基因的序列的正向引物和至少一种反向引物;或

[0392] ii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子2和/或3处的DUSP3基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子2和/或3处的DUSP3基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性。

[0393] 实施方案51. 一种鉴定患者具有结核病或不具有结核病的方法,所述方法包含:

[0394] a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0395] b) 基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病。

[0396] 实施方案52. 实施方案51的方法,其中被鉴定为具有结核病的患者是具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一的患者。

[0397] 实施方案53. 实施方案51或实施方案52的方法,其中被鉴定为不具有结核病的患

者是不具有结核病感染或具有潜伏性结核病的患者。

[0398] 实施方案54.实施方案51-53中的任一个的方法,其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病包含:将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的相应参考值或对照进行比较以鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病。

[0399] 实施方案55.实施方案51-54中的任一个的方法,其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病包含:

[0400] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;

[0401] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病。

[0402] 实施方案56.实施方案51-55中的任一个的方法,其中基于所述评分鉴定所述患者具有结核病或不具有结核病包含:

[0403] i) 将所述评分与预定的截止值进行比较;和

[0404] ii) 基于所述评分与预定的截止值之间的关系确定所述患者具有结核病或不具有结核病。

[0405] 实施方案57.实施方案51-56中的任一个的方法,其中基于所述评分与预定的截止值之间的关系确定所述患者具有结核病或不具有结核病包含:当所述评分大于或等于预定的截止值时,确定所述患者具有结核病;并且当所述评分小于预定的截止值时,确定所述患者不具有结核病。

[0406] 实施方案58.实施方案51-57中的任一个的方法,其中基于所述评分与预定的截止值之间的关系确定所述患者具有结核病或不具有结核病包含:当所述评分小于或等于预定的截止值时,确定所述患者具有结核病;并且当所述评分大于预定的截止值时,确定所述患者不具有结核病。

[0407] 实施方案59.实施方案51-58中的任一个的方法,其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0408] \text{评分} = \frac{(\text{GBP5} + \text{DUSP3})}{2} - \text{TBP}$$

[0409] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平,DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平,且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平。

[0410] 实施方案60.实施方案51-59中的任一个的方法,其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分,其中:i)所述多个受试者中的至少一个受试者具有结核病;且ii)所述多个受试者中的至少一个受试者不具有结核病。

[0411] 实施方案61.实施方案51-60中的任一个的方法,其中所述多个受试者中的具有结核病的至少一个受试者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一。

[0412] 实施方案62.实施方案51-61中的任一个的方法,其中所述多个受试者中的不具有结核病的至少一个受试者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0413] 实施方案63.实施方案51-62中的任一个的方法,其中当所述患者被鉴定为具有结核病时,所述方法进一步包含:基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0414] 实施方案64. 实施方案51-63中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病包含: 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的一种或多种相应参考值或一种或多种对照进行比较以鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0415] 实施方案65. 实施方案51-64中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病包含:

[0416] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;

[0417] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0418] 实施方案66. 实施方案51-65中的任一个的方法, 基于所述评分鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病包含:

[0419] i) 将所述评分与一种或多种预定的截止值进行比较; 和

[0420] ii) 基于所述评分与一种或多种预定的截止值之间的关系, 确定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0421] 实施方案67. 实施方案51-66中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分。

[0422] 实施方案68. 实施方案51-67中的任一个的方法, 其中:

[0423] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有活动性结核病;

[0424] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有亚临床结核病; 且

[0425] iii) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有初始结核病。

[0426] 实施方案69. 实施方案51-68中的任一个的方法, 其中当将所述患者鉴定为不具有结核病时, 所述方法进一步包含: 基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0427] 实施方案70. 实施方案51-69中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病包含: 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的一种或多种相应参考值或一种或多种对照进行比较以鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0428] 实施方案71. 实施方案51-70中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病包含:

[0429] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;

[0430] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0431] 实施方案72. 实施方案51-71中的任一个的方法, 其中基于所述评分鉴定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病包含:

[0432] i) 将所述评分与一种或多种预定的截止值进行比较; 和

[0433] ii) 基于所述评分与一种或多种预定的截止值之间的关系确定所述患者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0434] 实施方案73. 实施方案51-72中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分, 其中:

- [0435] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者不具有结核病感染;
- [0436] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有潜伏性结核病。
- [0437] 实施方案74. 一种鉴定患者是否具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病的方法, 所述方法包含:
- [0438] a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;
- [0439] b) 基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者:
- [0440] i) 具有结核病;
- [0441] ii) 处于获得结核病的高风险中;
- [0442] iii) 处于获得结核病的低风险中; 或
- [0443] iv) 不具有结核病。
- [0444] 实施方案75. 实施方案51-74中的任一个的方法, 其中被鉴定为具有结核病的患者是具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一的患者。
- [0445] 实施方案76. 实施方案51-75中的任一个的方法, 其中被鉴定为处于获得结核病的高风险中的患者是具有获得活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一的高风险的患者。
- [0446] 实施方案77. 实施方案51-76中的任一个的方法, 其中被鉴定为处于获得结核病的低风险中的患者是具有获得活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一的低风险的患者。
- [0447] 实施方案78. 实施方案51-77中的任一个的方法, 其中被鉴定为不具有结核病的患者是不具有结核病感染或具有潜伏性结核病的患者。
- [0448] 实施方案79. 实施方案51-79中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病包含: 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的一种或多种相应参考值或与对照进行比较。
- [0449] 实施方案80. 实施方案51-79中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病包含:
- [0450] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;
- [0451] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病。
- [0452] 实施方案81. 实施方案51-80中的任一个的方法, 其中基于所述评分鉴定所述患者具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病包含:
- [0453] i) 将所述评分与第一、第二和第三预定的截止值进行比较; 和
- [0454] ii) 确定:
- [0455] a) 当所述评分大于或等于第三预定的截止值时, 所述患者具有结核病;
- [0456] b) 当所述评分小于所述第三预定的截止值并且大于或等于所述第二预定的截止值时, 所述患者处于获得结核病的高风险中;
- [0457] c) 当所述评分小于所述第二预定的截止值并且大于或等于所述第一预定的截止

值时,所述患者处于获得结核病的低风险中;或

[0458] d) 当所述评分小于所述第一预定的截止值时,所述患者不具有结核病。

[0459] 实施方案82. 实施方案51-81中的任一个的方法,其中所述第三预定的截止值具有至少约98%的特异性和至少约45%的敏感性。

[0460] 实施方案83. 实施方案51-82中的任一个的方法,其中所述第二预定的截止值具有至少约70%的特异性和至少约90%的敏感性。

[0461] 实施方案84. 实施方案51-83中的任一个的方法,其中所述第一预定的截止值具有至少约99%的特异性或至少约30%的敏感性。

[0462] 实施方案85. 实施方案51-84中的任一个的方法,所述方法进一步包含:当所述患者被鉴定为具有结核病或被鉴定为具有获得结核病的高风险时,给所述患者施用至少一种结核病治疗。

[0463] 实施方案86. 一种监测具有结核病的患者对结核病治疗的应答的方法,所述方法包含:

[0464] a) 在第一时间点从所述患者得到的第一生物样品中测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0465] b) 在第二时间点从所述患者得到的第二生物样品中测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;和

[0466] c) 通过将来自步骤(a)的表达水平与来自步骤(b)的表达水平进行比较来确定所述患者是否正在对结核病治疗做出应答。

[0467] 实施方案87. 实施方案51-86中的任一个的方法,其中所述第一时间点是在给所述患者施用所述结核病治疗之前,并且所述第二时间点是在给所述患者施用至少一个量的所述结核病治疗之后。

[0468] 实施方案88. 实施方案51-87中的任一个的方法,其中所述患者在所述第一时间点之前已经被施用至少一个量的所述结核病治疗,并且所述第二时间点是在施用至少一个另外的量的所述结核病治疗之后。

[0469] 实施方案89. 实施方案51-88中的任一个的方法,其中所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0470] 实施方案90. 实施方案51-89中的任一个的方法,其中在步骤(c)中通过将来自步骤(a)的表达水平与来自步骤(b)的表达水平进行比较来确定所述患者是否正在对结核病治疗做出应答包含:

[0471] i) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定第一评分;

[0472] ii) 使用在步骤(b)中测量的表达水平确定第二评分;

[0473] iii) 比较所述第一评分和所述第二评分;和

[0474] iv) 基于所述第一评分和所述第二评分之间的关系确定所述受试者正在对所述治疗做出应答或没有正在对所述治疗做出应答。

[0475] 实施方案91. 实施方案51-90中的任一个的方法,其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分,其中:

[0476] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者对所述结核病治疗做出应答;且

[0477] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者没有对所述结核病治疗做出应答。

[0478] 实施方案92. 一种鉴定患者是否具有结核病、获得结核病的风险或不具有结核病的方法, 所述方法包含:

[0479] a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0480] b) 基于在步骤(a)中测量的表达水平将所述患者鉴定为具有i) 结核病、ii) 获得结核病的高风险、iii) 获得结核病的低风险或iv) 无结核病感染。

[0481] 实施方案93. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病、获得结核病的风险或不具有结核病包含: 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的相应参考值或对照进行比较以鉴定所述患者具有结核病、获得结核病的高风险、获得结核病的低风险或不具有结核病。

[0482] 实施方案94. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有结核病、获得结核病的风险或不具有结核病包含:

[0483] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;

[0484] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有结核病、获得结核病的高风险、获得结核病的低风险或不具有结核病。

[0485] 实施方案95. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0486] \quad \text{评分} = \frac{(GBP5 + DUSP3)}{2} - TBP$$

[0487] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平, DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平, 且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平。

[0488] 实施方案96. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分, 优选地其中:

[0489] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有结核病; 且

[0490] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者不具有结核病, 优选地:

[0491] 其中所述多个受试者中的具有结核病的至少一个受试者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病之一; 和/或

[0492] 所述多个受试者中的不具有结核病的至少一个受试者不具有结核病感染或具有潜伏性结核病。

[0493] 实施方案97. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中当所述患者被鉴定为具有结核病或获得结核病的高风险时, 所述方法进一步包含: 基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病或者具有获得活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病的高风险。

[0494] 实施方案98. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病包含: 将每种生物标志物的表达水平与该生物标志物的一种或多种相应参考值或一种或多种对照进行比较以鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0495] 实施方案99. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达

水平鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病包含：

[0496] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分；

[0497] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有活动性结核病、亚临床结核病或初始结核病。

[0498] 实施方案100. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分, 优选地其中:

[0499] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有活动性结核病;

[0500] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有亚临床结核病; 且

[0501] iii) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有初始结核病。

[0502] 实施方案101. 一种鉴定患者是否具有活动性结核病、处于获得活动性结核病的高风险中、处于获得活动性结核病的低风险中或不具有结核病的方法, 所述方法包含:

[0503] a) 测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0504] b) 基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者:

[0505] i) 具有活动性结核病;

[0506] ii) 处于获得活动性结核病的高风险中;

[0507] iii) 处于获得活动性结核病的低风险中; 或

[0508] iv) 不具有结核病。

[0509] 实施方案102. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中被鉴定为处于获得活动性结核病的低风险中的患者是具有亚临床结核病、初始结核病或潜伏性结核病的患者。

[0510] 实施方案103. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中被鉴定为不具有结核病的患者是不具有结核病感染或具有潜伏性结核病的患者。

[0511] 实施方案104. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于在步骤(a)中测量的表达水平鉴定所述患者具有活动性结核病、处于获得活动性结核病的高风险中、处于获得活动性结核病的低风险中或不具有结核病包含:

[0512] b₁) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定评分;

[0513] b₂) 基于所述评分鉴定所述患者具有结核病、处于获得结核病的高风险中、处于获得结核病的低风险中或不具有结核病。

[0514] 实施方案105. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述评分使用下式进行计算:

$$[0515] \quad \text{评分} = \frac{(\text{GBP5} + \text{DUSP3})}{2} - \text{TBP}$$

[0516] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平, DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平, 且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平。

[0517] 实施方案106. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分, 优选地其中:

[0518] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者具有活动性或可能的结核病; 和

[0519] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者不具有结核病或具有潜伏性结核病。

[0520] 实施方案107. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中基于所述评分鉴定所述患者具有活动性结核病、处于获得活动性结核病的高风险中、处于获得活动性结核病的低风险中或不具有结核病包含:

[0521] i) 将所述评分与第一、第二和第三预定的截止值进行比较; 和

[0522] ii) 确定:

[0523] a) 当所述评分大于或等于所述第三预定的(诊断)截止值时, 所述患者具有活动性结核病;

[0524] b) 当所述评分低于所述第三预定的截止值并且大于或等于所述第二预定的(分诊)截止值时, 所述患者处于获得活动性结核病的高风险中;

[0525] c) 当所述评分小于所述第二预定的截止值并且大于或等于所述第一预定的(排除)截止值时, 所述患者处于获得活动性结核病的低风险中; 或

[0526] d) 当所述评分小于所述第一预定的截止值时, 所述患者不具有结核病。

[0527] 实施方案108. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中

[0528] i) 所述第三预定的截止值具有至少约98%的特异性和至少约45%的敏感性;

[0529] ii) 所述第二预定的截止值具有至少约70%的特异性和至少约90%的敏感性; 和/或

[0530] iii) 所述第一预定的截止值具有至少约99%的特异性或至少约30%的敏感性。

[0531] 实施方案109. 前述实施方案中的任一个的方法, 所述方法进一步包含: 当所述患者被鉴定为具有活动性结核病或被鉴定为具有获得结核病的高风险时, 给所述患者施用至少一种结核病治疗。

[0532] 实施方案110. 前述实施方案中的任一个的方法, 所述方法进一步包含: 当所述患者被鉴定为具有活动性结核病或被鉴定为具有获得结核病的高风险时, 监测对结核病治疗的应答和/或监测疾病进展。

[0533] 实施方案111. 一种监测具有结核病的患者对结核病治疗的应答的方法, 所述方法包含:

[0534] a) 在第一时间点从所述患者得到的第一生物样品中测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平;

[0535] b) 在第二时间点从所述患者得到的第二生物样品中测量DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平; 和

[0536] c) 通过将来自步骤(a)的表达水平与来自步骤(b)的表达水平进行比较来确定所述患者是否正在对结核病治疗做出应答。

[0537] 实施方案112. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中:

[0538] (i) 所述第一时间点是在给所述患者施用所述结核病治疗之前, 并且所述第二时间点是在给所述患者施用至少一个量的所述结核病治疗之后; 或

[0539] (ii) 其中所述患者在所述第一时间点之前已经被施用至少一个量的所述结核病治疗, 并且所述第二时间点是在施用至少一个另外的量的所述结核病治疗之后。

[0540] 实施方案113. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述患者具有活动性结核病、获得活动性结核病的高风险、获得活动性结核病的低风险、亚临床结核病或初始结核病。

[0541] 实施方案114. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中在步骤(c)中通过将来自步骤(a)的表达水平与来自步骤(b)的表达水平进行比较来确定所述患者是否正在对结核病治疗做出应答包含:

[0542] i) 使用在步骤(a)中测量的表达水平确定第一评分;

[0543] ii) 使用在步骤(b)中测量的表达水平确定第二评分;

[0544] iii) 比较所述第一评分和所述第二评分; 和

[0545] iv) 基于所述第一评分和所述第二评分之间的关系确定所述受试者正在对所述治疗做出应答或没有正在对所述治疗做出应答。

[0546] 实施方案115. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述第一评分和所述第二评分使用下式进行计算:

$$[0547] \quad \text{评分} = \frac{(GBP5 + DUSP3)}{2} - TBP$$

[0548] 其中GBP5是在步骤(a)中测量的GBP5生物标志物的表达水平, DUSP3是在步骤(a)中测量的DUSP3生物标志物的表达水平, 且TBP是在步骤(a)中测量的TBP生物标志物的表达水平。

[0549] 实施方案116. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中当所述第二评分小于所述第一评分时, 将所述受试者鉴定为正在对所述治疗做出应答; 并且当所述第二评分等于或大于所述第一评分时, 将所述受试者鉴定为没有正在对所述治疗做出应答。

[0550] 实施方案117. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中当所述第二评分小于或等于所述第一评分时, 将所述受试者鉴定为正在对所述治疗做出应答; 并且当所述第二评分大于所述第一评分时, 将所述受试者鉴定为没有正在对所述治疗做出应答。

[0551] 实施方案118. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中使用从在得自多个受试者的多个生物样品中分析DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平所导出的公式计算所述评分, 其中:

[0552] i) 所述多个受试者中的至少一个受试者对所述结核病治疗做出应答; 且

[0553] ii) 所述多个受试者中的至少一个受试者没有对所述结核病治疗做出应答。

[0554] 实施方案119. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合, 优选地其中所述至少一种抗生素选自由以下成员组成的集合: 利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0555] 实施方案120. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述生物样品包含:

[0556] i) 全血、痰、外周血单核细胞、单核细胞或巨噬细胞;

[0557] ii) 全血、补充了抗凝血剂的全血或补充了RNA稳定缓冲剂的全血。

[0558] 实施方案121. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中将所述生物样品储存:

[0559] i) 在从4°C至35°C的温度至多24小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平;

[0560] ii) 在室温至35°C至多24小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平; 或

[0561] iii) 在室温至35°C持续0.5至8小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0562] 实施方案122. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述生物标志物是通过PCR定量的RNA生物标志物, 优选地其中测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物

标志物的表达水平包含：

[0563] 使来自所述患者的生物样品与检测所述生物样品中的GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合接触,其中所述引物集合中的每种引物是至少10个核苷酸长度;

[0564] 生成通过GBP5、DUSP3和TBP的PCR产生的扩增子;和

[0565] 使所述扩增子与所述生物标志物中的每一种的至少一种探针接触,其中每种探针包含可检测标记。

[0566] 实施方案123.前述实施方案中的任一个的方法,其中:

[0567] i) 每种探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列;和/或

[0568] ii) 检测TBP的引物集合包括包含12-25个核苷酸长的核酸序列的第一引物和第二引物。

[0569] 实施方案124.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述预定的截止值:

[0570] i) 具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的特异性;

[0571] ii) 具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的敏感性;

[0572] iii) 具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阳性预测值;和/或

[0573] iv) 具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阴性预测值。

[0574] 实施方案125.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述至少一种结核病治疗包含至少一种抗生素、至少一种皮质类固醇或它们的任何组合。

[0575] 实施方案126.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述至少一种抗生素选自由以下成员组成的集合:利福平、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、利福喷汀、乙硫异烟胺、莫西沙星和链霉素。

[0576] 实施方案127.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述生物样品包含全血、痰、外周血单核细胞、单核细胞或巨噬细胞。

[0577] 实施方案128.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述生物样品包含全血、补充了抗凝血剂的全血或补充了RNA稳定缓冲剂的全血。

[0578] 实施方案129.前述实施方案中的任一个的方法,其中将所述生物样品在从4°C至35°C的温度储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0579] 实施方案130.前述实施方案中的任一个的方法,其中将所述生物样品在室温至35°C储存至多24小时,然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0580] 实施方案131.前述实施方案中的任一个的方法,其中所述生物标志物是通过PCR定量的RNA生物标志物。

[0581] 实施方案132.前述实施方案中的任一个的方法,其中测量来自所述患者的生物样品中DUSP3、GBP5和TBP生物标志物的表达水平包含:

[0582] 使来自所述患者的生物样品与检测所述生物样品中的GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合接触,其中所述引物集合中的每种引物是至少10个核苷酸长度;

[0583] 生成通过GBP5、DUSP3和TBP的PCR产生的扩增子;和

[0584] 使所述扩增子与所述生物标志物中的每一种的至少一种探针接触,其中每种探针包含可检测标记。

[0585] 实施方案133.前述实施方案中的任一个的方法,其中每种探针包含12-25个核苷酸长的核酸序列。

[0586] 实施方案134. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述检测TBP的引物集合包括包含12-25个核苷酸长的核酸序列的第一引物和第二引物。

[0587] 实施方案135. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中将所述生物样品在从4°C至35°C的温度储存至多24小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0588] 实施方案136. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中将所述生物样品在室温至35°C储存0.5至8小时, 然后测量所述生物标志物的表达水平。

[0589] 实施方案137. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的特异性。

[0590] 实施方案138. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的敏感性。

[0591] 实施方案139. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阳性预测值。

[0592] 实施方案140. 前述实施方案中的任一个的方法, 其中所述预定的截止值具有至少85%、或至少90%、或至少95%、或至少99.5%的阴性预测值。

[0593] 实施方案141. 一种用于鉴定患者是否具有结核病、获得结核病的风险或不具有结核病的筒, 所述筒包含:

[0594] 多个流体连通的处理腔室, 和

[0595] 与处理腔室流体连通的用于结合核酸的核酸结合基质,

[0596] 其中所述处理腔室包含用于裂解来自样品的细胞、扩增和检测来自样品的核酸的试剂, 以及包含用于检测GBP5、DUSP3和TBP生物标志物的引物集合的组合物。

[0597] 实施方案142. 前述实施方案中的任一个的筒, 其中所述多个处理腔室包含

[0598] 与核酸结合基质流体连通的裂解腔室, 其中所述裂解腔室包含一种或多种用于裂解细胞的试剂, 和

[0599] 反应管, 其与所述裂解腔室流体连通并被构造成用于扩增核酸和检测扩增产物。

[0600] 实施方案143. 前述实施方案中的任一个的筒, 其中所述用于裂解细胞的试剂包含离液剂、螯合剂、缓冲剂和去污剂。

[0601] 实施方案144. 前述实施方案中的任一个的筒, 其中所述离液剂选自硫氰酸胍、盐酸胍、碱金属高氯酸盐、碱金属碘化物、脲、甲酰胺或其组合。

[0602] 实施方案146. 前述实施方案中的任一个的筒, 其中

[0603] a) 用于检测TBP的引物集合选自:

[0604] i) 用于检测TBP基因的序列的正向引物和至少一种反向引物; 或

[0605] ii) 正向引物, 其包含至少15个邻接核苷酸的区域, 该区域的序列与在外显子3和/或4处的TBP基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性; 和至少一种反向引物, 其包含至少15个邻接核苷酸的区域, 该区域的序列与在外显子3和/或4处的TBP基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性, 或

[0606] iii) 正向引物, 其包含至少15个邻接核苷酸的区域, 该区域的序列与SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:4的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性; 和至少一种反向引物, 其包含至少15个邻接核苷酸的区域, 该区域的序列与SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:4的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性,

[0607] b) 用于检测GBP5的引物集合选自：

[0608] i) 用于检测GBP5基因的序列的正向引物和至少一种反向引物；或

[0609] ii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子9和/或10处的GBP5基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子9和/或10处的GBP5基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性,且

[0610] c) 用于检测DUSP3的引物集合选自：

[0611] i) 用于检测DUSP3基因的序列的正向引物和至少一种反向引物；或

[0612] ii) 正向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子2和/或3处的DUSP3基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性;和至少一种反向引物,其包含至少15个邻接核苷酸的区域,该区域的序列与在外显子2和/或3处的DUSP3基因的至少15个邻接核苷酸具有至少85%同一性。

实施例

[0613] 实施例1: TBP作为在具有潜伏性和活动性结核病的患者中稳定地表达的基因的鉴定

[0614] 为了鉴定具有低mRNA表达变异性的基因,首先鉴定了一组在全血样品中具有低表达变异潜力的mRNA。获得每个候选基因的Illumina探针ID,产生共80个相应的ID。获得GEO数据集GSE19491 (Berry等人2010),其含有来自具有活动性和潜伏性结核病的患者的血液基因表达谱,并提取来自该组Illumina探针ID的表达数据。然后使用R-script Normfinder (Andersen等人2004) 计算表达变异(表1)。

[0615] 表1.通过Normfinder确定的表达变异

[0616]

基因		组Dif	组SD	稳定性	平均表达
KLF2	ILMN_1735930	0.04	0.5	0.07	6953
UBE2D2	ILMN_1725644	0.14	0.51	0.1	55
EEF1A1	ILMN_1810810	0.1	0.74	0.12	21240
TBP	ILMN_1697117	0.25	0.56	0.13	183
SIRT5	ILMN_1799598	0.16	0.87	0.15	25
HPRT1	ILMN_1736940	0.25	0.72	0.17	149
YWHAZ	ILMN_1801928	0.4	0.34	0.17	4986
UBC	ILMN_2038773	0.34	0.58	0.18	17022
B2M	ILMN_2148459	0.41	0.57	0.2	10163
GAPDH	ILMN_1343295	0.37	0.71	0.21	1392
ACTB	ILMN_2038777	0.41	0.6	0.21	12160
FAM48A	ILMN_1669555	0.51	0.47	0.23	202
TRAP1	ILMN_1699737	0.37	0.91	0.23	67
DECR1	ILMN_1720838	0.59	0.39	0.25	958
RPLP0	ILMN_1709880	0.53	0.72	0.27	5664
RAB8B	ILMN_2173004	0.59	0.65	0.27	1574

CDC37	ILMN_1668369	0.64	0.65	0.29	2719
DUSP3	ILMN_1797522	2.01	1.12	0.8	774
GBP5	ILMN_2114568	7.57	3.31	2.7	1472

[0617] 在检查的Illumina ID中,发现对应于KLF2的ID显示出最低变异,而对应于GBP5和DUSP3的ID属于具有最高变异的ID。如以下结果所示,KLF2的表达变异性随着时间和温度变化而波动。发现TBP属于具有最低变异的ID,并且被选择进入XPRT原型设计,因为1) 与具有低变异性的其它基因例如UBE2D2和EEF1A1相比,TBP表现出与DUSP3和GBP5更类似的表达水平,和2) 相对于例如YWHAZ,TBP是更适合用于PCR优化的候选者,其中探针设计受限于高度相似序列在多条染色体上的存在。原型设计包括TBP的引物对和探针(例如,SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3)、GBP5的引物对和探针、DUSP3的引物对和探针、以及任选的KLF2的引物对和探针。

[0618] 实施例2:与KLF2相比,TBP提高了在EDTA血液中的特征稳定性

[0619] 从供体(n=3-4)取样全静脉EDTA血液。将样品在不同的温度(4、室温和35℃)保存0、0.5、1、2、4、8和24小时,然后在GENEXPERT®仪器上使用XPRT TB宿主应答原型在每个时间点和温度分析6个重复。计算了两个评分,一个根据方程式 $(GBP5+DUSP3)/2-KLF2$ (“ΔTB-评分”与“TB-评分”可互换使用),且一个根据 $(GBP5+DUSP3)/2-TBP$ (“ΔTBP-评分”与“TBP-评分”可互换使用)。然后将每个时间点和温度的6个重复的平均值归一化到第一时间点(t0)。数据表明,在室温(图1A)和在35℃(图2A),TBP-评分比TB-评分随时间更稳定。TBP-评分稳定低至2uL WB(数据未显示)。

[0620] 此外,从6名供体获得静脉血液样品,并随后在抽取后0、1、3、5和7小时和在21℃、25℃、28℃和35℃使用原型GENEXPERT®筒进行分析。图7显示了来自该分析的数据,并证实,与TB评分相比,TBP评分随着时间和温度更稳定。

[0621] 实施例3:TBP-评分用于诊断结核病的性能验证

[0622] 在Södersten等人的一项研究中包括共201份在PAXgene缓冲液中储存的全血样品,其来自被诊断为具有HIV的患者的南非和秘鲁组群(Journal of Clinical Microbiology,2021,59,3:1-11)。在201名患者中,67名(33.3%)诊断为具有TB,其中23名(34.3%)为涂片阴性/培养物阳性,且44名(65.7%)为涂片阳性/培养物阳性。5名患者被定义为“亚临床TB”,且129名(64.2%)被归类为“非-TB”患者(46名LTBI,83名非LTBI)。没有包括可能具有TB的患者。在第一份痰样品上的Xpert MTB/RIF能够鉴定53名患者(79.1%;涂片阳性43/44[97.7%]和涂片阴性10/23[43.5%]),而所有痰样品的Xpert MTB/RIF检测出57名患者(85%)。用手工组装的Xpert TB宿主应答RUO原型筒分析PAXgene™血液样品,其配方与上述相同。针对MTB培养物(参见图3A-C)和针对XpertMTB/RIF(图3D-F),使用不同的可能评分方程式的接受者操作特征(ROC)分析来评价XPRT TB宿主应答RUO原型筒的性能;TB-评分= $(GBP5+DUSP3)/2-KLF2$,TBP-评分= $(GBP5+DUSP3)/2-TBP$ 或TBP/KLF2评分= $(GBP5+DUSP3)/2-(TBP+KLF2)/2$ 。使用Bonferroni多重比较对所得AUC进行比较。未观察到AUC的显著差异(p=1),从而提示TBP可以完全替换KLF2。

[0623] 实施例4:TBP-评分用于监测活动性结核病的治疗的性能验证

[0624] 在开始治疗前和在1、2、4、6和12个月随访时从40名患者得到239份PAXgene™血液

样品(治愈的患者缺少一次第12个月随访)(现在公开为Zimmer等人,BMC Res Notes,2021,14(1):247)。招募在MGIT培养物上证实具有TB的患者(≥ 18 岁)。参与者在招募后开始第一线TB治疗,其中6名(15%)到6个月之前完成治疗,并且其余34名(85%)到12个月之前完成治疗。使用手工组装的Xpert TB宿主应答RUO原型筒分析样品。TB-评分(图4A)、TBP-评分(图4B)和TBPkLF2-评分(图4C)在组水平上以高度类似的方式随治疗时间而变化。

[0625] 实施例5:半定量TB手指针刺测定的性能验证

[0626] 结核病(TB)是导致死亡的一个主要原因,并且给发展中国家的卫生保健服务带来了巨大压力。结核病病例数目的减少不足以达到2020年结束结核病战略(2020End TB Strategy)的里程碑,每年仍有360万结核病人未确诊,从而导致报告的与估计的活动性病例之间的36%差距。大约30%的结核病患者没有得到治疗,并且在结核病的调查和治疗开始中已经发现了许多不足。随之而来的未确诊结核病的高负担助长了持续的传播,并且延迟的治疗使治疗结果恶化。

[0627] 三分之二的疑似结核病病例出现在公共卫生场所,但由于后勤和财政限制,在结核病高发地区的许多场所仍然无法获得有效的结核病诊断服务。目前可用的诊断方法包括放射学和微生物学试验。试验设施的费用和缺乏使用权意味着许多需要诊断试验的人得不到它。当试验可用并得到充分执行时,由于试验和结果可用性之间的时间延迟,患者经常无法进行随访,并且负担过重的医疗保健系统可能无法对试验结果适当做出反应。尽管高灵敏度和特异性的GeneXpert®MTB/RIF(GeneXpert®)试验具有两小时的可能出报告时间,在几乎消除该时间延迟方面显示出巨大的前景,但由于无法完全分散试验,财务和后勤限制意味着有效的结核病诊断仍然是一个挑战。所有其它可用的诊断模式在初级保健设施中都有使用缺点。液体培养物易受污染,需要多达42天才能产生阴性结果,并且甚至比GeneXpert®更难获得。目前,在资源有限的场合下胸部X射线(CXR)的可用性甚至低于GeneXpert®,是相对昂贵的(>10欧元/CXR),依赖于熟练的人员进行阅读和解释,并且尽管灵敏度高(98%;95%CI 95-100%),但它具有低特异性(75%,95%CI 72-79%)(5)。

[0628] 世界卫生组织(WHO)最近再次强调了对有效结核病筛查的需要。EnDx:TriageTB研究旨在最终确定一项要用于结核病筛查的护理点手指针刺血液试验。分诊联盟(Triage Consortium)的最终目标是为结核病诊断提供一种高灵敏度的“排除”试验,它总体上是低成本的、易于使用的、廉价的和对结核病筛查有效的。该试验已经被概念化、创建并在先前EDCTP资助的研究中使用非洲参与者的血清进行了评价,它需要进一步细化以确保全球适用性,并需要在最终锁定进行生产之前使用手指针刺血液进行现场试验以进行运行试验。该试验是基于测量在血液中存在并且已经被证实与活动性结核病有关的生物标志物的组合的各个浓度。

[0629] 根据先前的研究经验,只有大约30%的表现出与活动性结核病一致的征象和症状的患者实际上是结核病试验阳性。POC-MBT将鉴定出具有最高活动性结核病风险的患者以优先进行进一步试验,同时排除大多数具有除活动性结核病以外的呼吸道疾病的低风险患者。在资源有限的情况下,简化诊断过程可能通过减少不必要的试验而显著减少总体支出。此外,卫生保健工作者将能够专注于对更小数目的具有活动性结核病的高风险的患者进行试验。这可能增加进行的诊断检查的严格性。类似地,意识到具有结核病的高可能性的患者

可能表现出更好的依从性,从而改善 GeneXpert®、培养结果或其它确认性试验的回访率以建立确定性诊断并开始治疗。

[0630] 总体而言,TB疾病的及早检测和治疗会减少进一步的疾病传播,包括抗性株的传播。因此,除了促成可持续目标(Sustainable Goal) 3.3—为了结束结核病流行外,该研究还将促成目标3.8—为了实现普遍卫生保健覆盖和获得高质量的基本卫生保健服务。

[0631] 评估了RT PCR体外诊断半定量TB手指针刺试验的截止定义和技术验证,该试验具有定性截止值,用于从人毛细管或静脉EDTA全血检测推定具有活动性结核病(TB)疾病的个体中的特异性人宿主应答。TB手指针刺试验包括评估来自三个基因特征(GBP5、DUSP3、TBP)的信使核糖核酸(mRNA)的表达水平。从来自广泛地理覆盖范围的概念验证(proof-of-concept)研究数据根据经验确定截止值。所有数据都来自POC场合,并代表了来自静脉或手指针刺的新鲜EDTA血液取样。

[0632] 使用722份样品进行了测定的初步执行(68份手指针刺样品得自瑞典的北非和中东住院患者;195份手指针刺样品得自在ENDxTB计划中招募的南非、乌干达、冈比亚、印度和越南候选患者;且459份静脉样品得自在TB临床试验中的南非、乌干达、菲律宾、印度、冈比亚、越南候选人)。还使用MTB/RIF Ultra对722份样品进行了试验,并比较了结果。来自MTB/RIF Ultra的结果包括539例TB阴性和183例TB阳性。

[0633] 基于所获得的表达值来计算评分,所述评分相对于三个截止值来进行评估,所述三个截止值又将患者分为4个基于风险的类别:阳性、高风险、低风险和阴性(参见图5)。所述截止值具有以下性能:

[0634] -对于活动性TB,诊断截止具有 $\geq 98\%$ 特异性和 $\geq 45\%$ 敏感性,

[0635] -对于活动性TB,分诊截止具有 $\geq 70\%$ 特异性和 $\geq 90\%$ 敏感性,且

[0636] -对于鉴定TB阴性,排除截止具有 $\geq 99\%$ 特异性和 $\geq 30\%$ 敏感性。

[0637] 在本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其它文件特此通过引用整体并入用于所有目的,达到如同单独指出每篇单独的出版物、专利、专利申请或其它文件通过引用并入用于所有目的的相同程度。

[0638] 虽然已经解释和描述了各种具体实施方案,但是应当理解,可以在不脱离本发明的精神和范围的情况下做出改变。

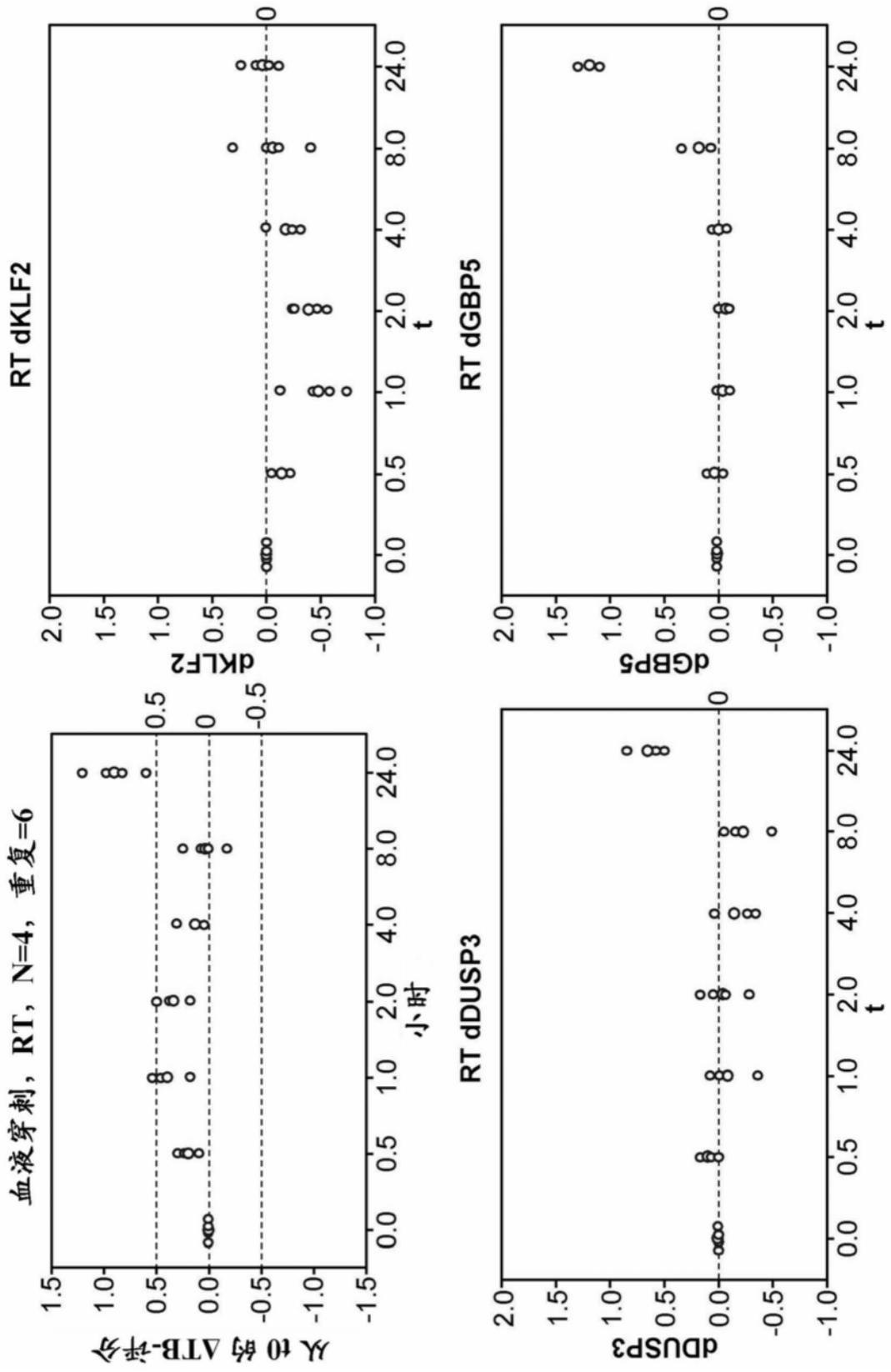


图1A

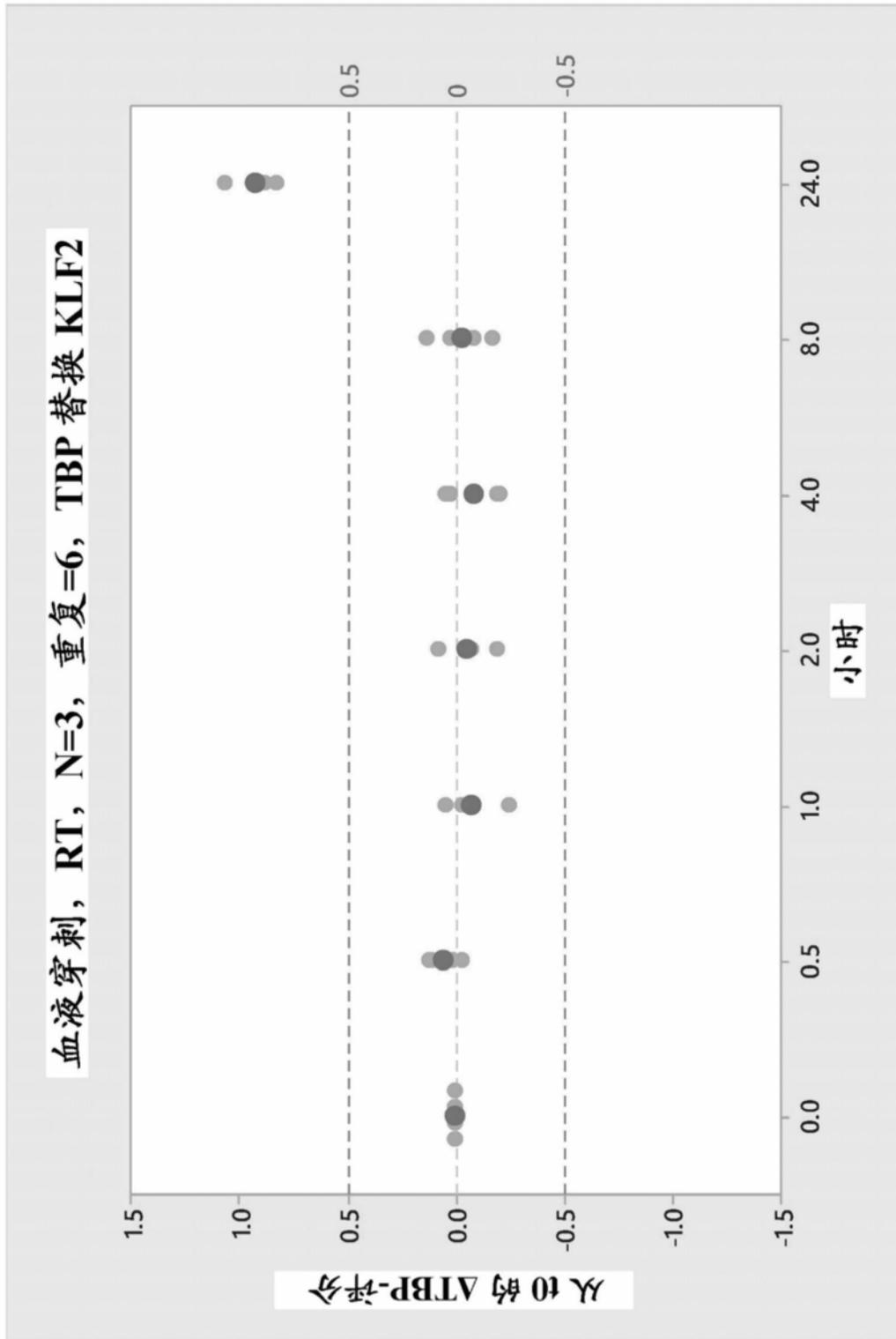


图1B

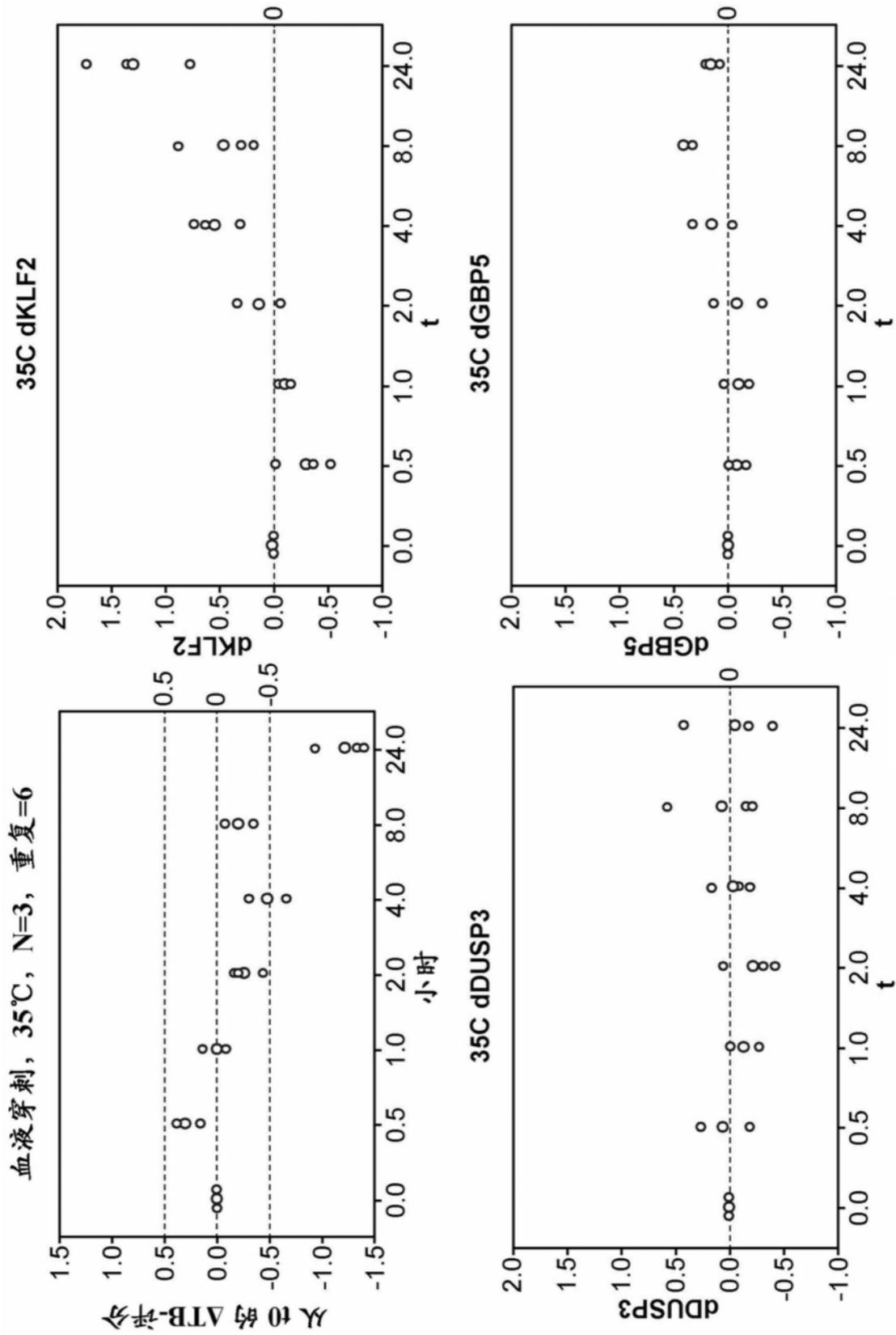


图2A

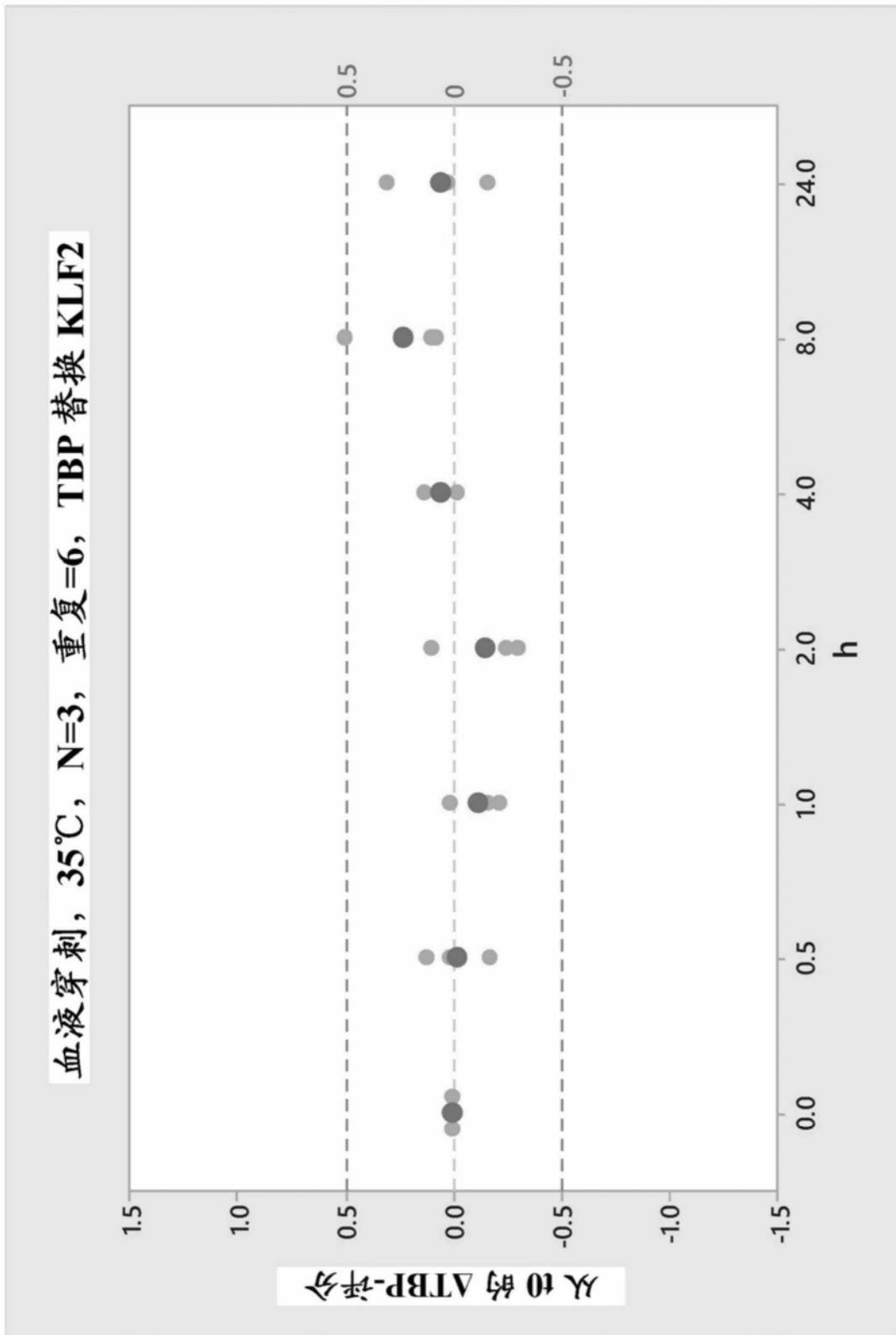


图2B

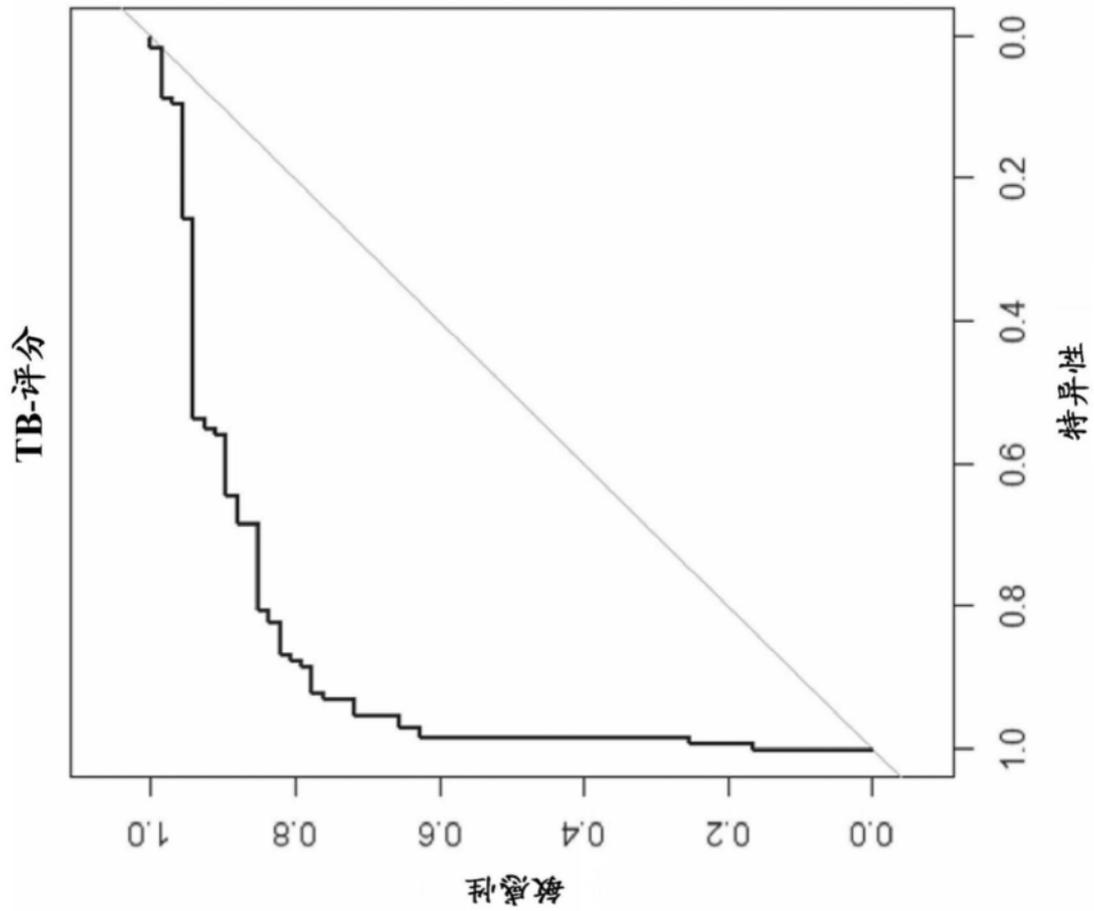


图3A

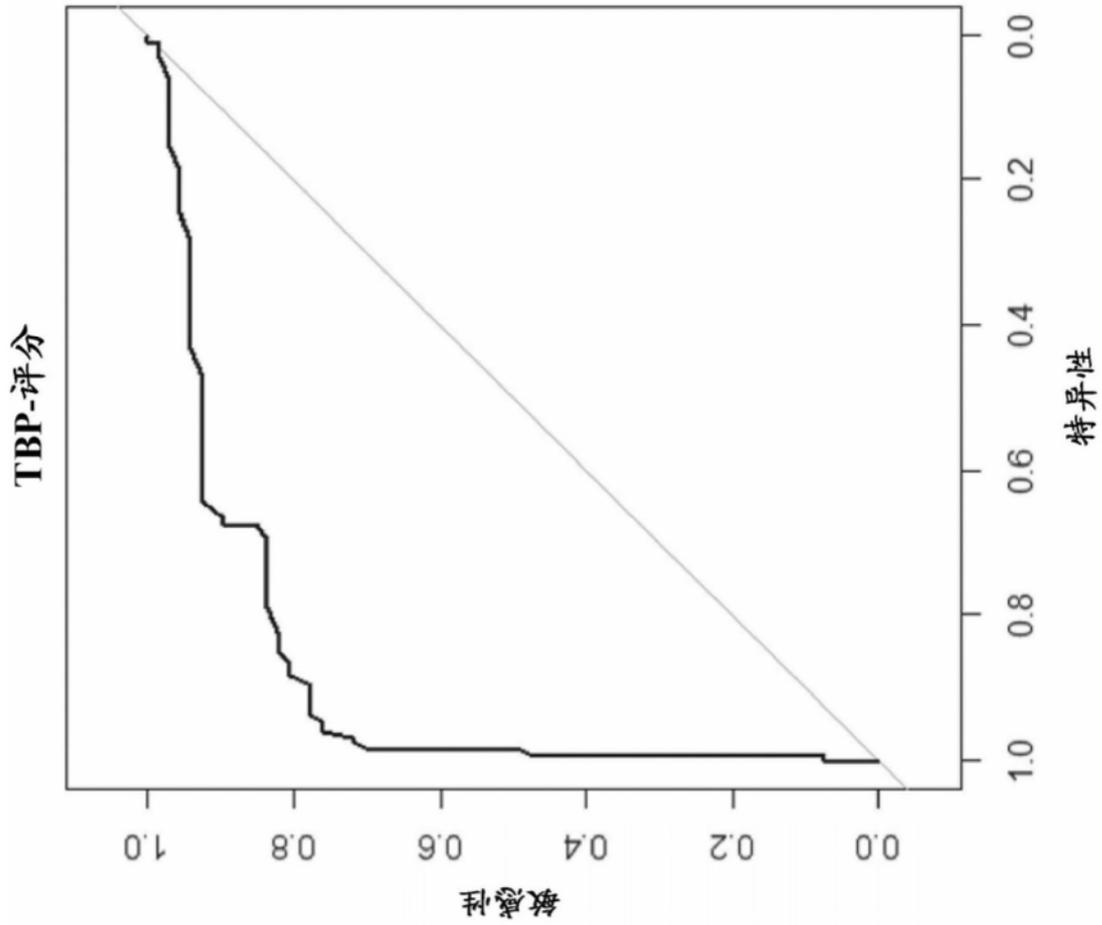


图3B

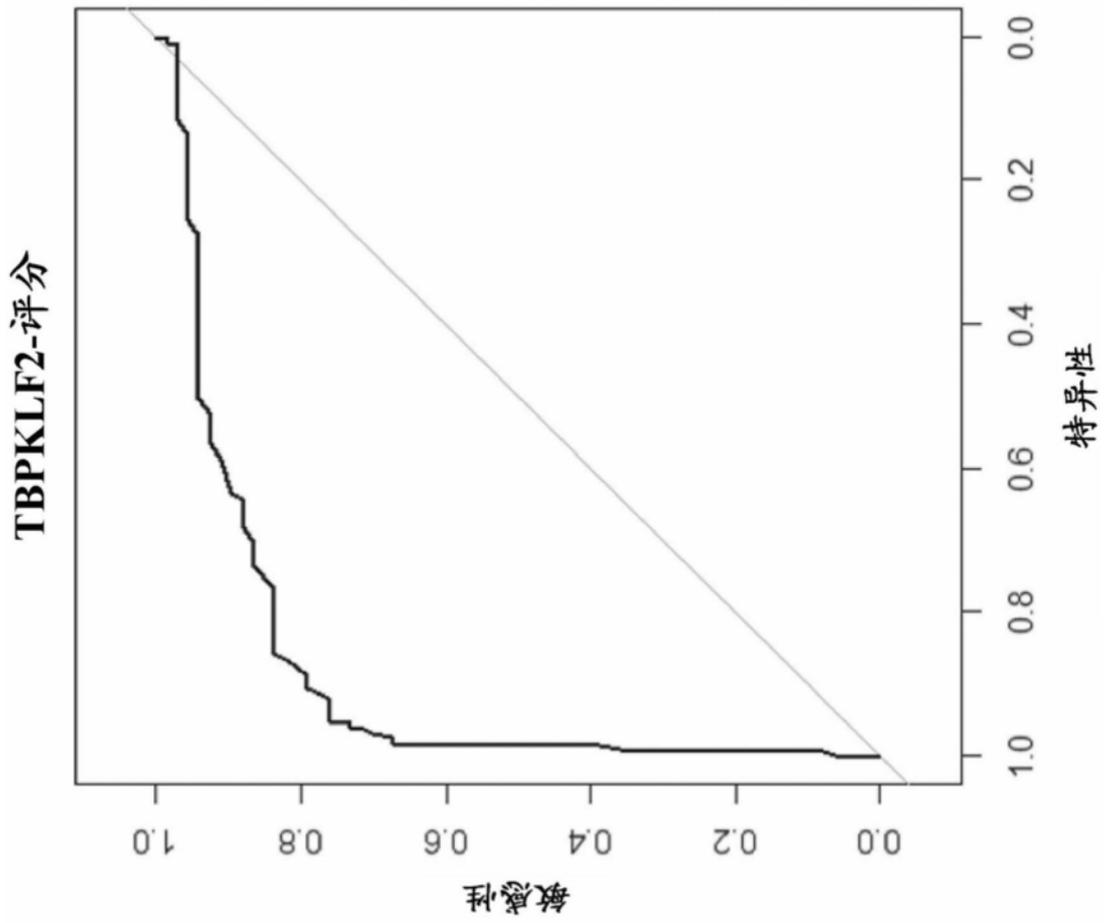


图3C

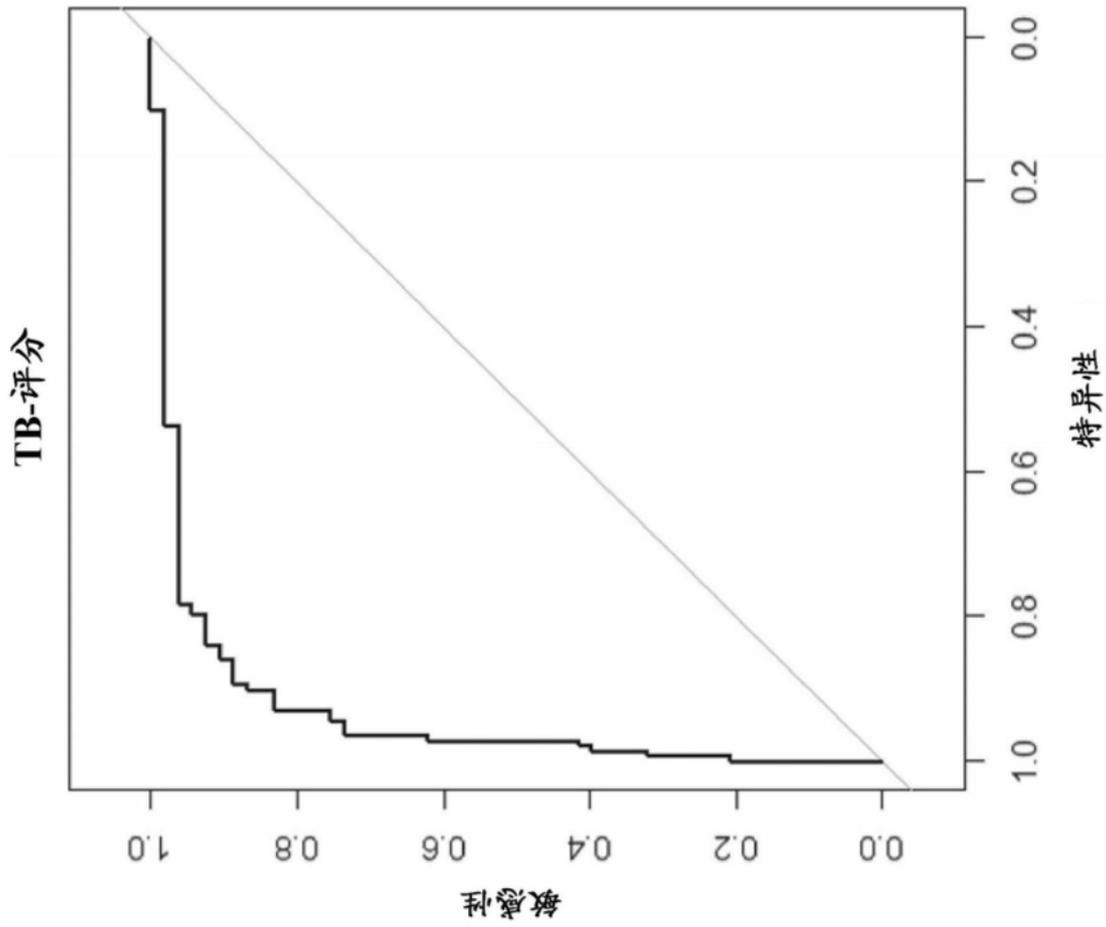


图3D

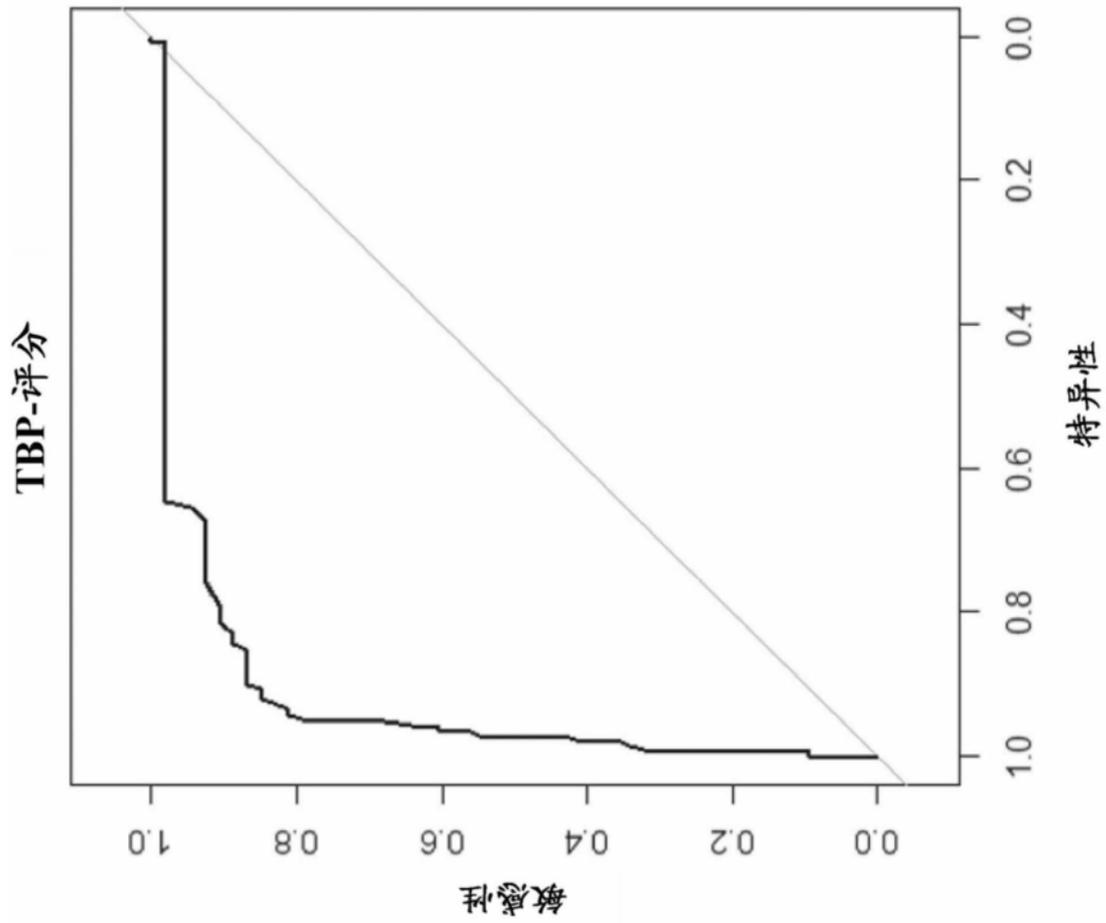


图3E

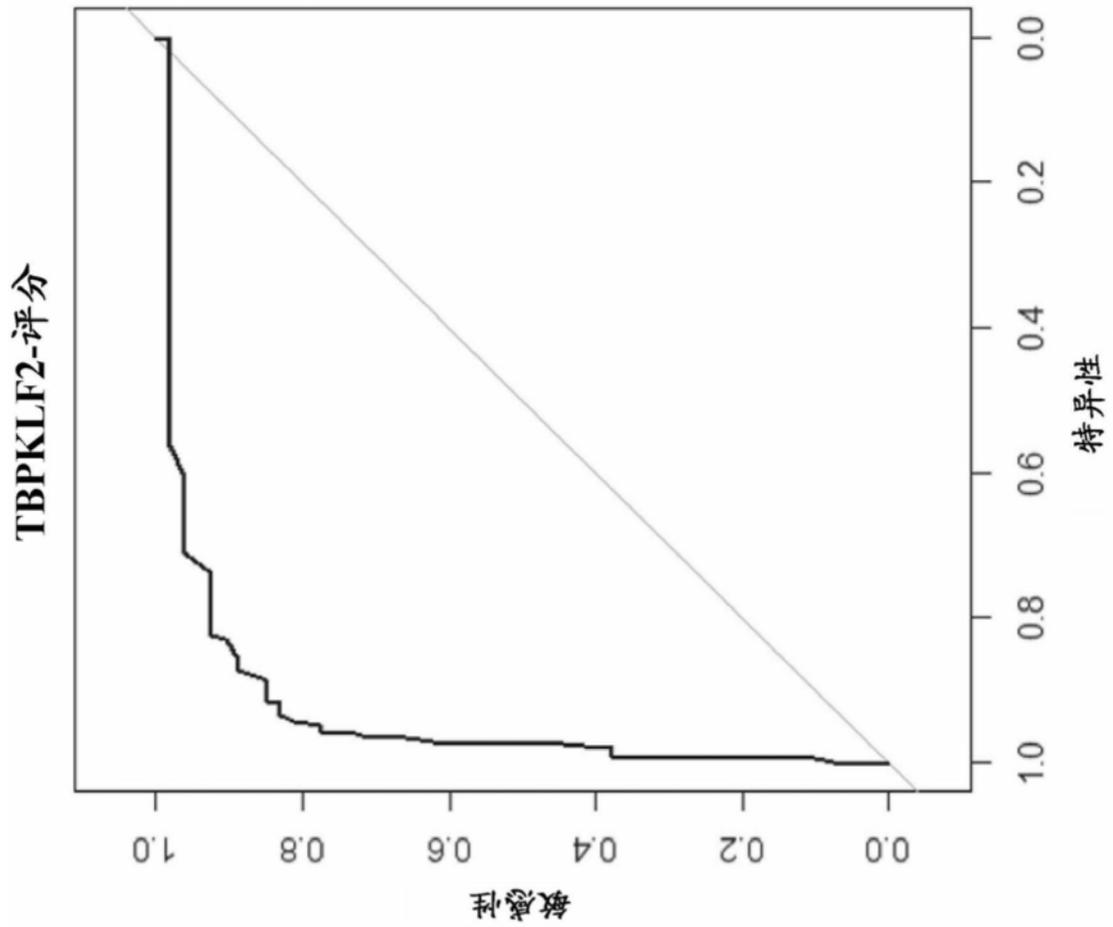


图3F

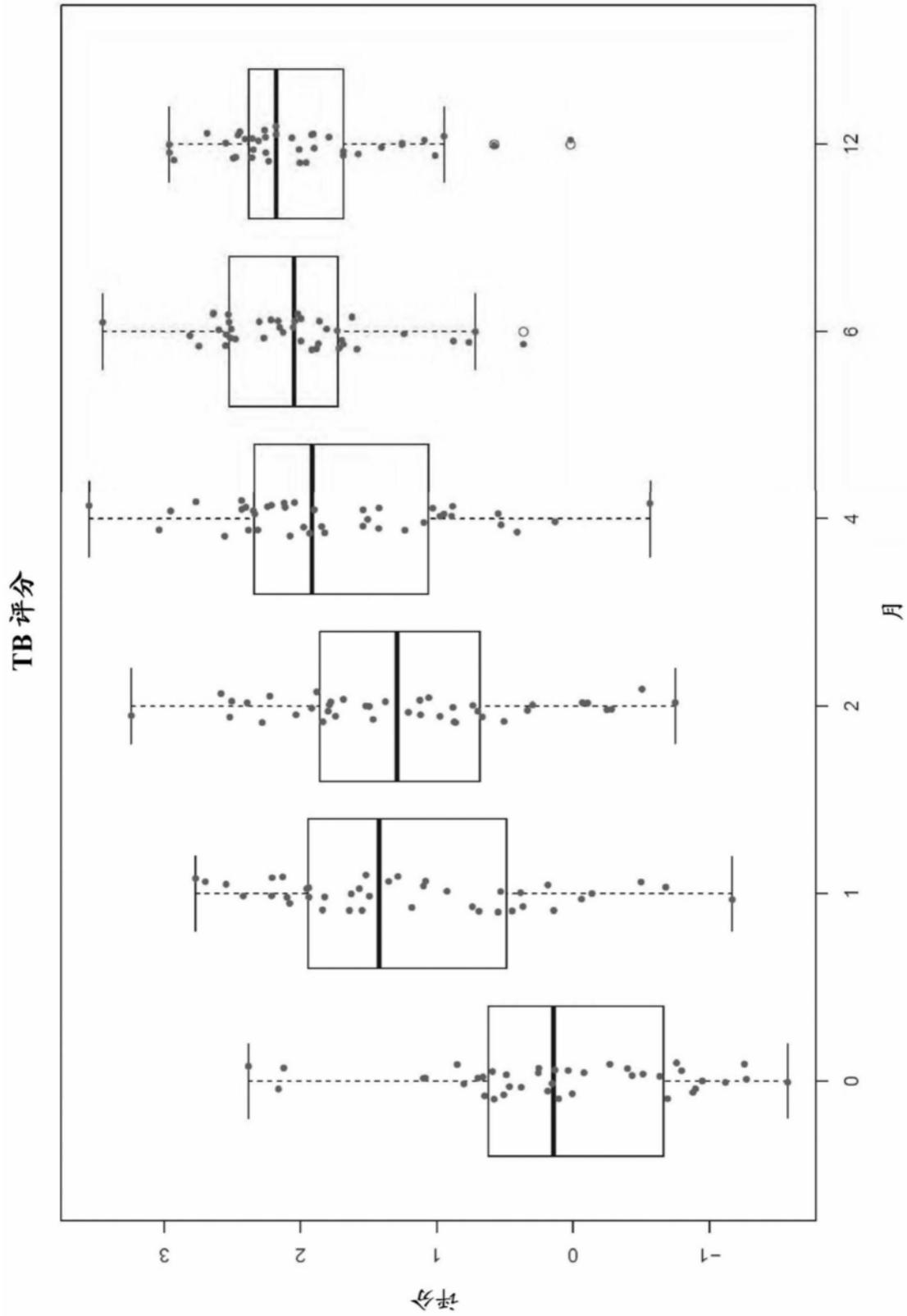


图4A

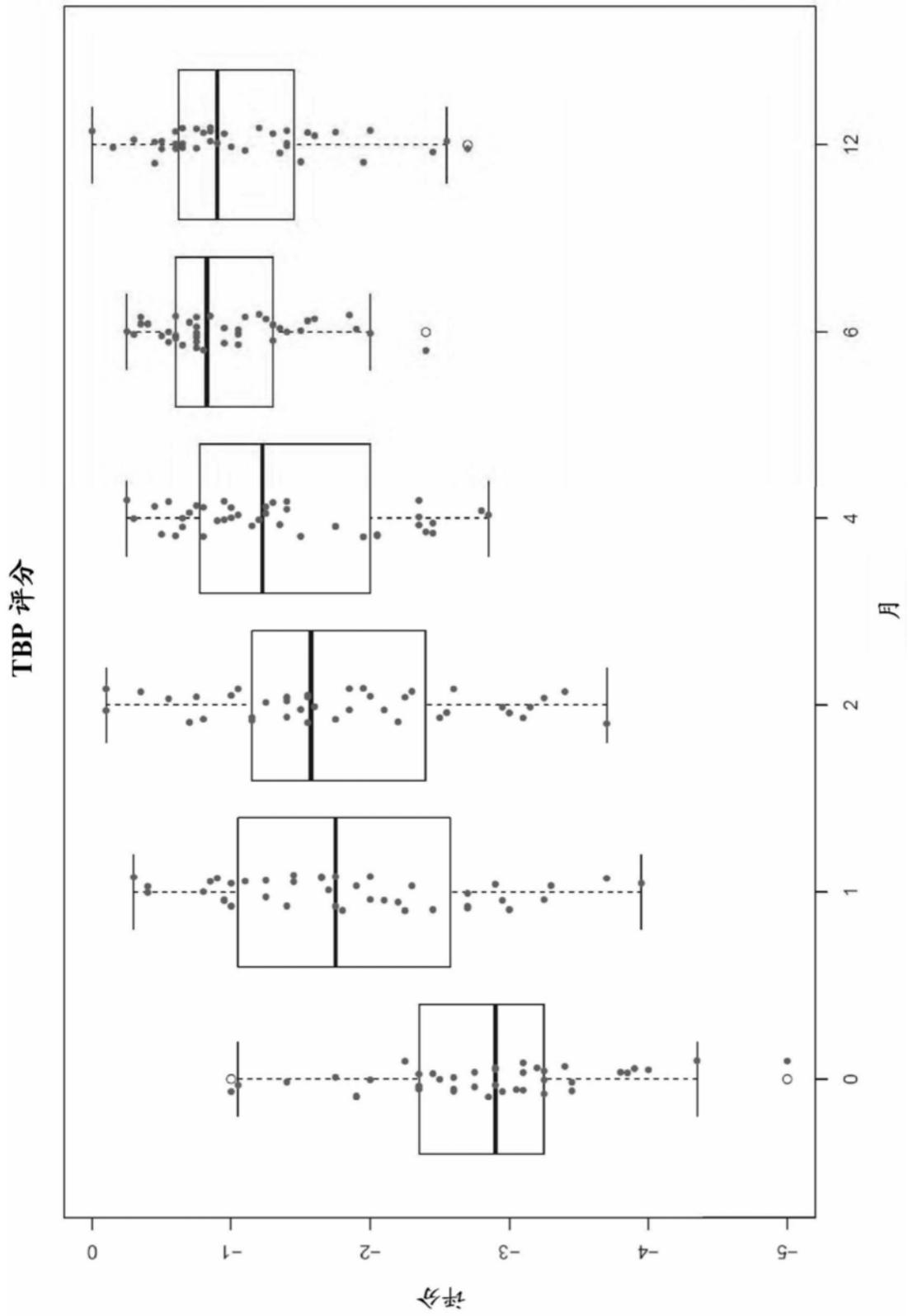


图4B

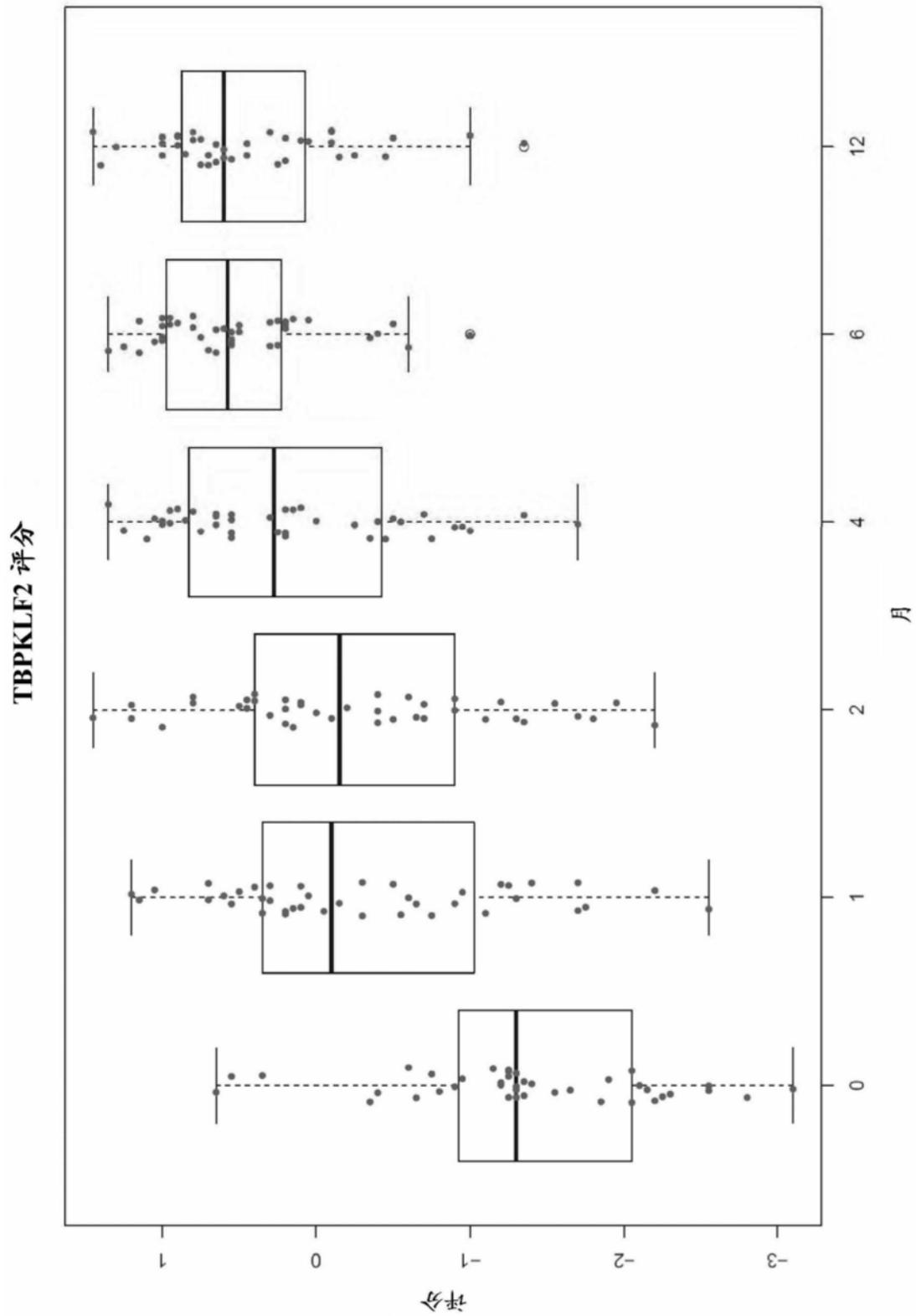


图4C

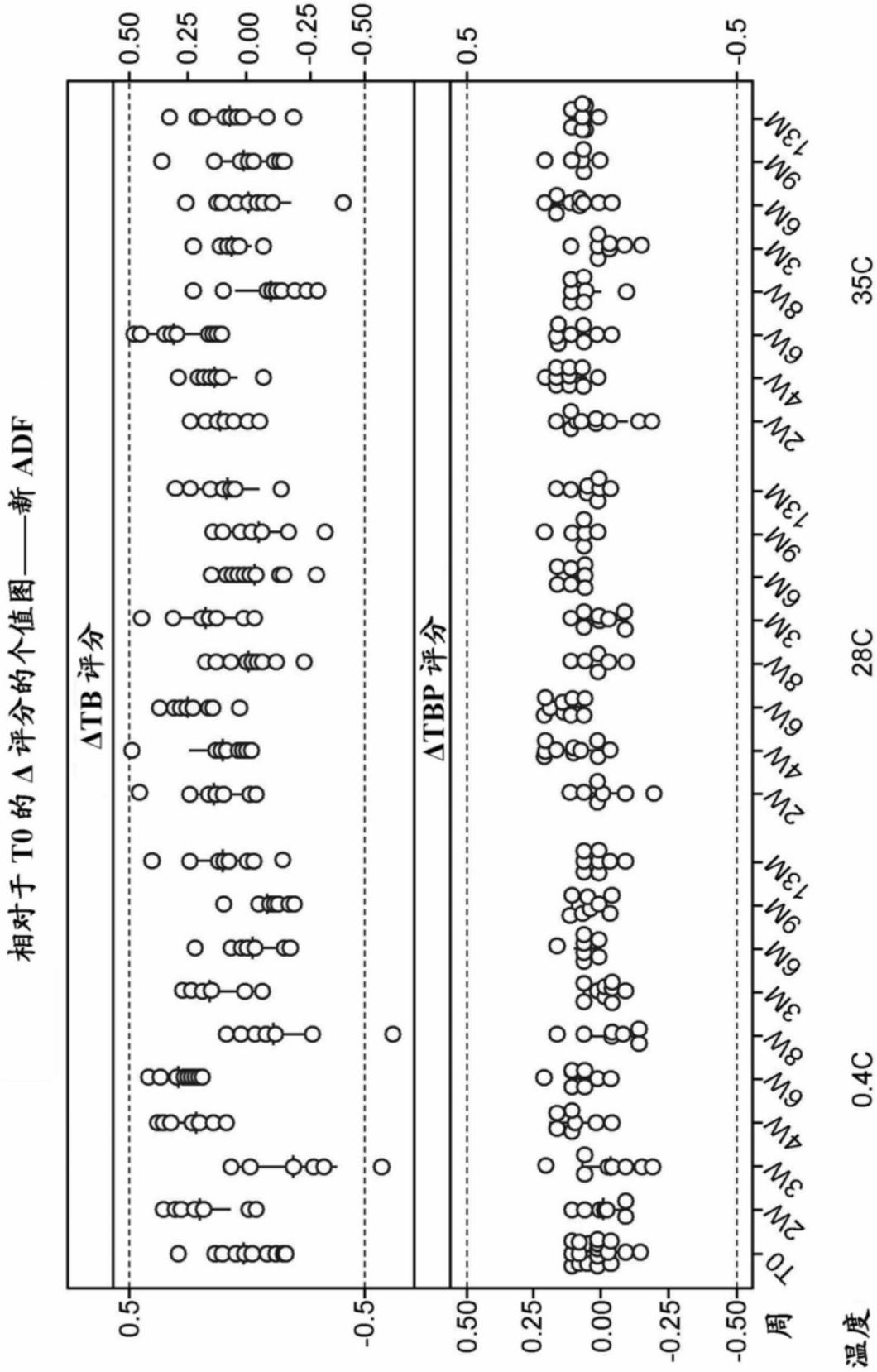


图4D

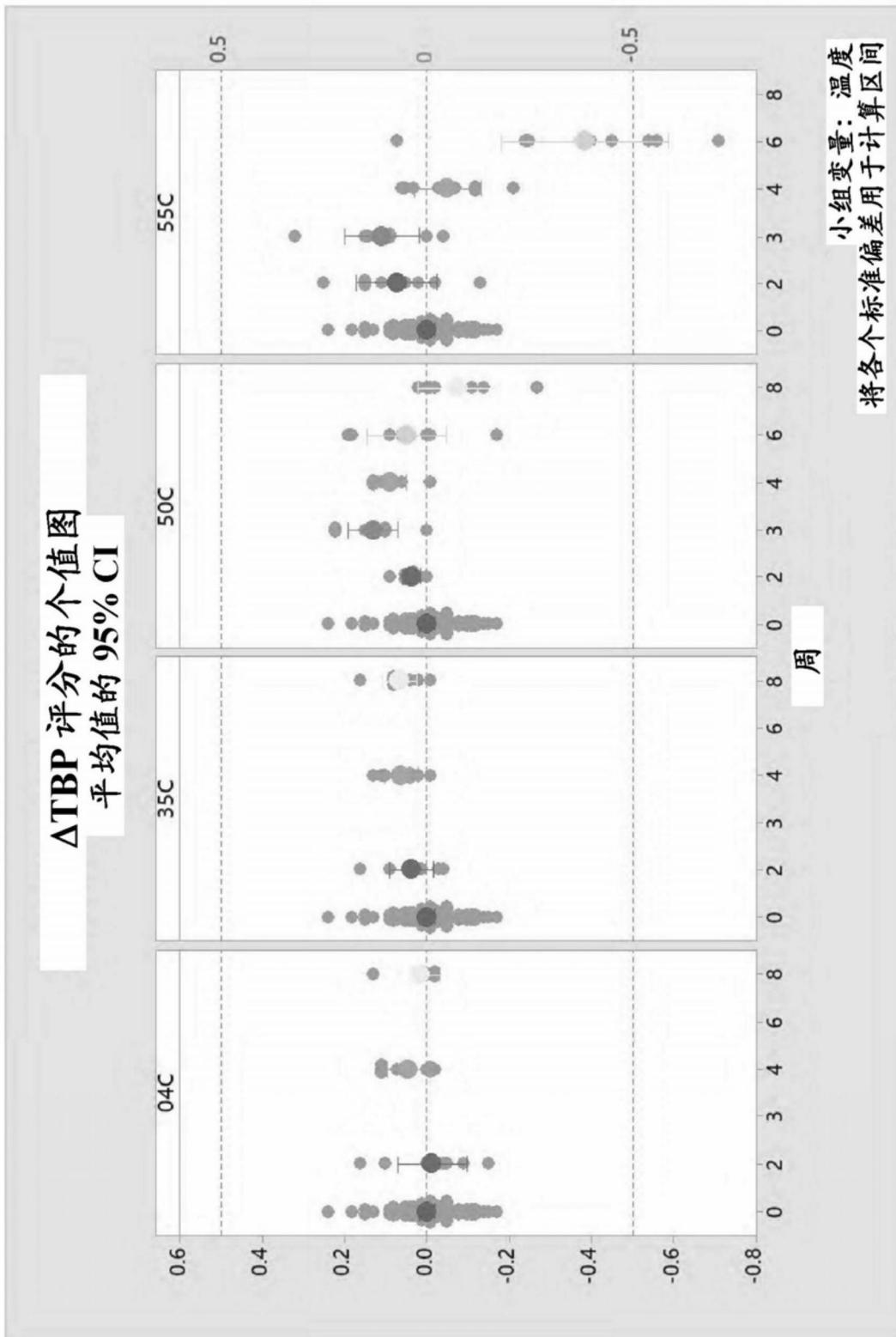


图4E

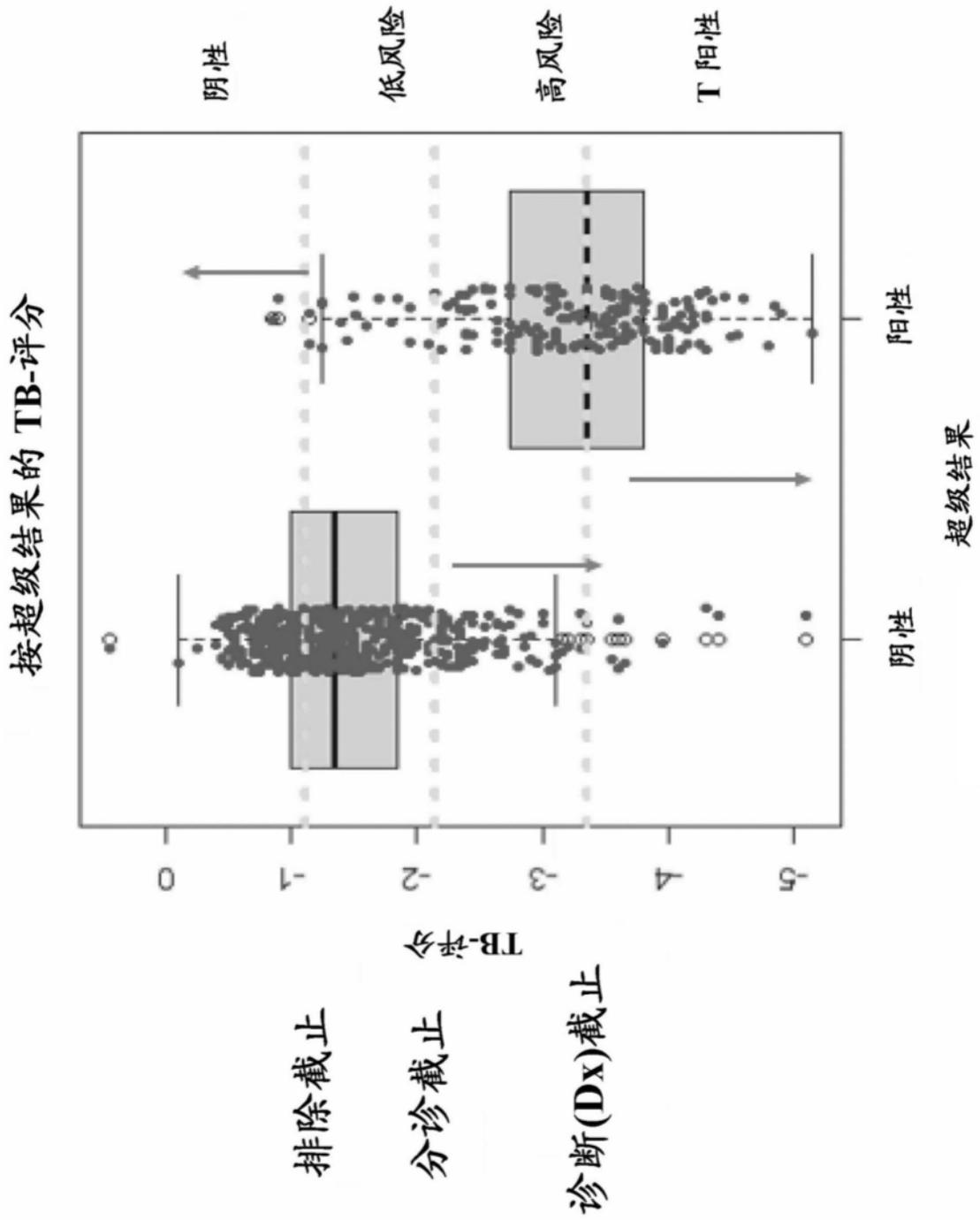


图5

ATAGACCAGAAGATGAATTTCTACGGCTACCTCTTGGCTCCTGTGCACACCCATTTCCAGAACCTGAAAATCAGT
 GCCGTGGTTCGTGGCTCTCTTATCCTCATGATTACCCGAGCAAAACCGCTACAATGGTCAGAGAGAAATCATTAGTGAG
 GTCATGCCAAAACCTGCTCAATGTTGTTAGGCGAACCCACCCATTGACAAAAAAAATCACAACTGGTAGGAAGGACATAGT
 ACATCTAGTTATCAAAAATATTTGTTCTGTATATCTGTAAAGGATTTGCATACACCCACATGTAACAAAATATTTCC
 TTTGCATAAGGAGCAGAAAAATAATCAATGTGACTAAGTTATACCAAAATCTGTATGTTCTTCCATGAGCATTTCCATCA
 AGAGAAATGTTGCAAAATTTGGTTATGTTCTCAATAAATACAAGTCTTCTGTTTCTACTTTTATAITTTGCTGCTTATCA
 TGACTATAGCTTCTCGATACATTTGTTTATTAAATGAATTTGAGGCAAAATAAACCAATAAACCTTTTTCTACCTTAA
 TGGAAATTAATAATCAGATTACAAGCCATCAATACGTAATGAAGTAAATCATGCTTTCAATGGTCTTTTAGAAAACAAT
 ATTAATGTATTAACACATAAATGCAAAATTAGGAAAAAACAACAGTTTTAACTTTTATTTTCTGCTTTTATGCTTTGAAAC
 ATGTTAATTTCTCAGAAAATTTCTTGTCTAAGGTGGTAACCTCAAGGGGAAAATATTTCAACTGTGGGTTGAATTAATG
 GCCTCAGTTATTAGGTACATGATAAAAAGCAATAATTAATTTGAACAACCTAAATATTTAATACATTTAATATACAAAT
 AAAACCTACATGTTCTAATTAAGACGACTCTTTGACAAACTAGATTGCTTTAAACAATTTATTTTTTATTTTATTAAT
 TTTTTTTTAGAGACAAGAGCTCACITTTGTTGCCAGACTGGAGTGCAGTGGTGAATCATGGCTCACTGCAGCCT
 CGAATTCCTGAGCTCAAGAGATCCTTCTGTCTTGGCTCCCAAGTAGCTGGGATTAGGTGTGTGCCACCAACCC
 CAGATAATTTTTTAAATTTCTGATGAAACAAGGCTTGTCTATGTTGCCCAGGCTCGCTTTGAACGTGGGCTCAAG
 TGATCCTCCCACCTTGGCTCCCAAGTGTGGAATTACAGGCTGAGTCAACCATGCTGGCTTTTAAACAATTTTAG
 TTTAAAACCTGCTCTATGCTTCCCCTGTGATTTTATCAACATCTAAAAGAGCTAGCAGTATATAGTAGTTTATATACGTC
 CCAGGAAAAGCCTAGCTATTTGAATTTCCAGAAATTTCCCTACTATTTTATGGTTAAATATCACTTAAAGAACGTAAA
 GTAATAAATATGTATCAACTAAATGTGATTAATAGATGAAAGATTAATCTTAGAATGCTACATGTATACAGACT
 CATTATGAGTGGTTAAAGGTGATTTTCAGACCCCTTAGCTGCTTTTCAGATCTCAGGCATTATGTTTCAGGGATTTTAA
 AATGCACCCCTAAGTCCATTACTTAAACATTTCTCTCAACCCAGCTAATGTTTATCCAAATTAATTTGCTACTATAGCTGG
 CTAACATCATCCCTATACATATACAAAATTTCTCACATGATCCCAATACATAATACATATATAACTTAGCTTATTTTATAGACT
 GCTGTACTCCCAGGGATTTTATATCACAGACACTCAATAAAGATACAAAACAATGCACATTTTACTTTAGATCTTCAT
 TTTATTGGTCAAGGAATAAGCATAACACAAAACCTTTTGATATACAGATTTTTTTTTGAGCGGAGTCTCGCTCTGT
 TGCCAGGCTGGAATGCAATGGCGCAATCTCCGCTCACTGCAACCTCTGCCTCCAGGATCAAGTATTCTCCTGCC
 TCAGCCTCCCAAGTAGCCGGGATTACAGCGCATGCCACACTCCCGCAAAATTTTTGTTATTTTAGTAGAGACGG
 GGTTTCACTATGTTGGCCAGGATGCTTGAACCTCTGACCTCAGATGATCCGCCACCTCGGCTCCCAAAAGTGC
 TGGGATTACACGTTGAGCCACCAAGCCCGGCCAATTTTTTTTTTTTTTAAAGAGACAGGGTCTTGGCCATGTTGCC
 TGGGCTGGTGGTGAACCTCCTAGGTTCAAGAAATTTCTCCTCCCTCAGCCTCCCAAAAGTCTGGGATTACAGGCATTA
 GCCACTGTGCCCTGGCTGATCTACAGACATTTGTTTTATAGCGTGAATACATTAATAATAGAGACACGGCAGAGGA
 GACAAAAAAGAAAAAAGAAATACATTAATAATAGATCTAACCTTGGGATATATTCGGCGTTTTCCGGCACCGAAGT
 GCAATGGTCTTTAGGTC AAGTTTACAACCAAGATTCACTGTGGATACAAATATTTCTGTAAGAGAGATTTAAAAAGAAAA
 (SEQ ID NO: 4)

图6

Δ Tb 评分(用 KLF2)、 Δ TBP 评分(用 TBP)的个体图
平均值的 95% CI

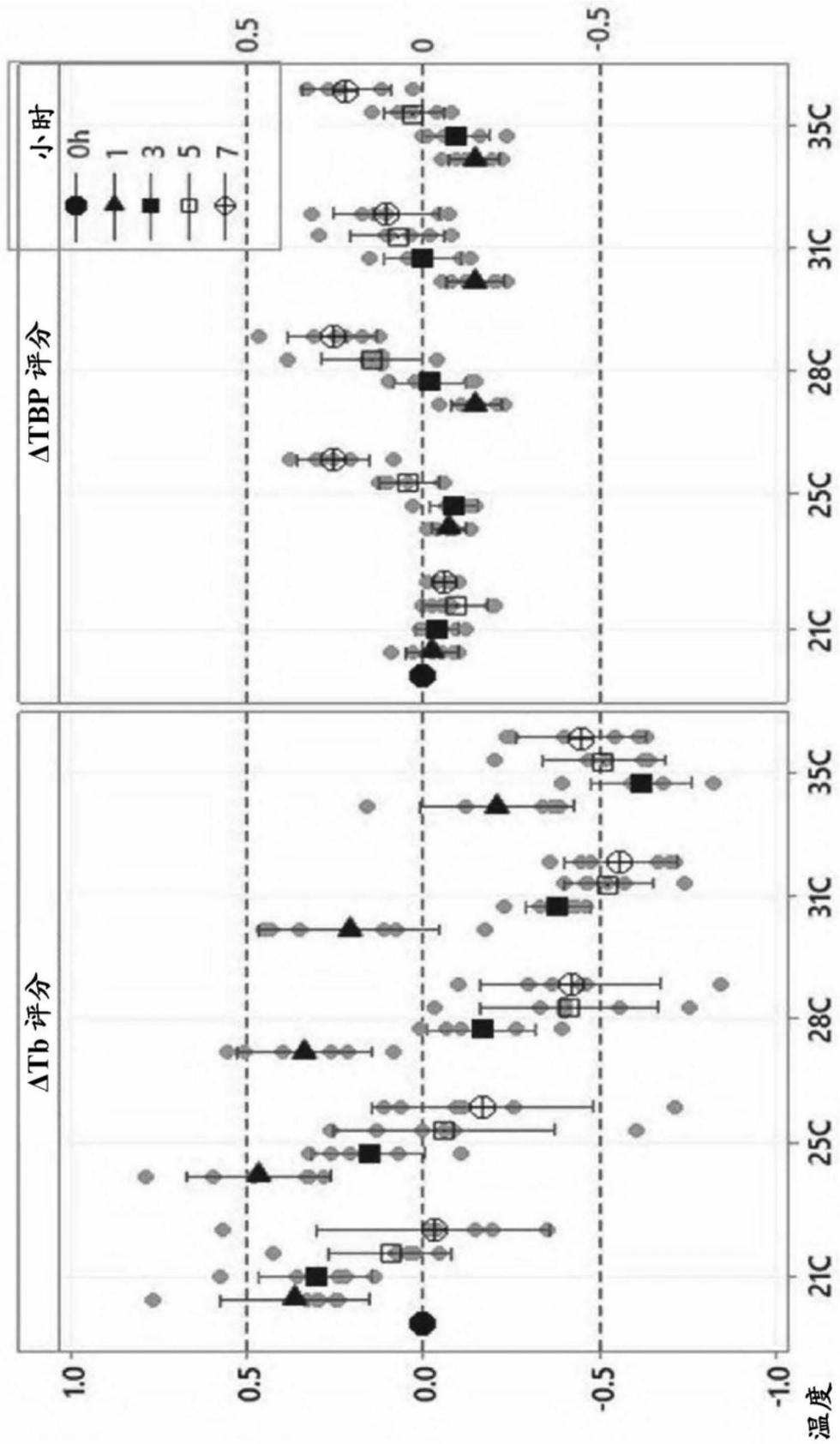


图7

GTCGACGGCCCGTTAAACTTACTCTGAAAGAAATACATAATTTCTTTTGGTTGAGCTTTTGTATTTAAATACAT
 TTGATGAGAGGATATTGAAATAAATAATAGCAGCTTAAATTAATTTACAAATCCCCTAAATGGAAATTTTACATAATG
 AGATATCATAATGAATGTGAATTTTATTTCTGAAATCTTAATAAATCAGTCTTCTCCCTGGTTTTCCAGCTCAGCGCCC
 ATTACGTTTCTGTTCTTTCCCTTAGTGGCATTATTTGTATCACTGTGCATGTGGCTGCCAACCTGCTGCCCGTGCAGA
 AACTCTAGGGTAAGAGCTGGCTCCTGGAGTCCACCCAGGCTGCCCTCACAGTCTGCTCTGTGTCTATGTGTGTGT
 GTTCCTAGGTACGTAATGCATGGCCAAAAGCAAGGTAGTCAAAAGTTCAAAATTTCAATTTGCCCCGCTCTGTGTATAC
 AGAAGTTCTTTCCAAAAAAGAAATGCTTTATCTTTGACTTACCTGCTCACAAAAAAGCTTGCCCAACTTGAAACACTGC
 CTGATGATGAGCTAGAGCCTGAATTTGTGCAACAAGTGACAGAAATCTGTTTCTTACATCTTTAGCCATTTATGACCAAGA
 CTCTTCCAGGTGGCATCATGGTCAATGGATCTCGTCTAAAAGAACCTGGTGTGACCTATGTCAATGCCATCAGCAGTGGGG
 ATCTGCCCTGCATAGAGAAATGCAGTCTGGCCCTGGCTCAGAGAGAACTCAGTGCAGTGCAAAAGGCCATTTGCCACT
 ATGACCAGCAAAATGGCCAGAAAGTGCAGCTGCCATGGAAACCCTCCAGGAGCTGTGGACCTGCACAGGACCAGTGAGA
 GGGAGGCCATTGAAGTCTTCATGAAAAAATCTTTCAAGGATGTAGACCAAAAGTTCCAGAAAAAATTTGGAGACTCTACTAG
 ATGCAAAACAGAAATGACATTTGTAAAACGGAACTTGAAGCATCTCGGATTAATGCTCGGCTTACTTAAGGATATTTTTG
 GTCTCTAGAAGAAGCAGTGAAGCAGGGAATTTATTTAAGCCAGGAGCCATAATCTCTTCAATTCAGAAAAACAGAAAGAAC
 TGAAGGCAAAAGTACTATCGGGAGCTCGGAAAAGGAAATACAGGCTGAAGAAGTTCTGCAGAAAAATTTAAAGTCCAAAGGAGT
 CTGTGAGTCATGCAATATTACAGACTGACCAGGCTCTCACAGAGACGGAAAAAAGAAAAAGAGGCACAAAGTGAAAGCAG
 AAGTGAAGAGGCTGAAGCGCAAAGTTGGCGGGATTTCAAAGGCAGAACGAGCAAAATGATGCAAGGAGAGGGAGACTCC
 ATCAGGAAACAAGTGAGACAAATGGAGATAGCCAAAACAATAATGGCTGGCAGAGCAACAGAAAAATGCAGGAAACAACAGATGC
 AGGAACAGGCTGCACAGCTCAGCACAACTTCCAAGCTCAAATAGAAAGCCTTCTCAGTGAGCTCCAGCACGCCCCAGAGGA
 CTGTTAATAACGATGATCCATGTGTTTACTCTAAAGTCTAAATATGGGAGTTTCCCTTTTACTCTTTTGTCACTGATG
 ACACAAACAGAAAAAGAACTGTAGACCTTGGGACAAATCAACATTTAAATAAACTTTAATAATTTTCAAACCTTTTCATAT
 AGAGTTATAAGATTATGATGCTGGTATCTGGTAAATGTACATCCCAGTAGTCCAATAGTTTAAATGTTTATTTGCTTCCCTT
 TAAGAGATTATAAATGTATAAGGACATTTGATCACTGCTTCAATTTATGGGTGATATTTGGATGGTTTTCATCAGGAGAT
 GCTTTCCTTGCATCTCAATGTCAATCTGTCTAAATTTCTCATAAGGGGATATGTTACTAGAGCAGGGCTTCCCAACCCTCA
 GGCCATAGACTAGCTGATCTGTGGCTCTTAGGAACCCGGCCACACAGCAGGAGGTGAGCAGCAGGTAGCGGCCGCTTA
 ATTAAGGGACAAAAGCCCTCTCCCTGCAGAACTCGCAACAGTCTTCCGACAGCAGAGTCCCCCCACGCCCGCAGTGCCA
 TAAGCGCACCGGCACTGCCCGGTTGTCTGTCCGAGGCCACCATCGTGGCGCTCCGCAAGACCGGGCAGATCTGGCCCAA
 CGATGGCGAGGGCCCTCCATGGAGACGAGATGGCTCGTTCGGAACACCACCTGGATACGGCTGGCTGCAGACCGGGC
 AGAGGAGCAGCGCCGGCACCAGATGGGTGCCCCACATTTGATGACTCGCCCTCTCATCGCCCCACCTCAGCAGCAAGGG
 CAGGGCAGCCGGATGCGTGGTCTCGGGAGCCCTGGAGTCCACTAAAGCGAGTGAGCTGGACTTGGAAAAGGGCTTCAC
 GTGACGCGGTGGATCC (SEQ ID NO: 5)

图8A

GCAACAAGTGACAGAAATCTGTTCCTACATCTTAGCCATTCTATGACCAAGACTCTTCCAGGTGGCATC
ATGGTCAATGGATCTCGTCTAAAGAACCTGGTGTGACCTATGTCAATGCCATCAGCATGCGGGATCTGC
CTTGCCATAGAGAAATGCAGTCCCTGGCTCAGAGAGAACTCAGCTGCAGTGCAAAAAGGCCATTGC
CCACTATGACCAGCAAATGGGCCAGAAAGTGCAGCTGCCATGGAAACCTCCAGGAGCTGCTGGACCTG
CACAGGACCAGTGAGAGGGAGGCCATTGAAAGTCTTCATGAAAACTCTTCAAGGATGTAGACCAAAAGTT
TCCAGAAAGAAATGGAGACTCTACTAGATGCAAAACAGAAATGACATTTGTAAACGGAACTGGAAAGCATC
CTCGGATTAATGCTCGGCTTTACTTAAGGATAATTTTGGTCCCTAGAAAGCAGTGAAGCAGGGAATTT
TATTTAAGCCAGGAGGCCATAATCTTTCATTCAGAAAACAGAAAGAACTGAAGGCCAAAGTACTATCGGG
AGCCTCGGAAAAGGAAATACAGGCTGAAAGTCTGCAGAAATATTTAAAGTCCAAAGGAGTCTGTGAGTCA
TGCAATAATTACAGACTGACCCAGGCTCTCACAGAGACGGAAAAGAAAGAAAGGCCAACAAAGTGAAAGCA
GAAAGTGAAAAGGCTGAAGCCGCAAGGTTGGCCGGATTCAAAGGCAGAACGAGCAAATGATGCAGGAGA
GGGAGAGACTCCATCAGGAACAAGTGAGACAAATGGAGATAGCCAAACAAAATTTGGCTGGCAGAGCAACA
GAAAATGCAGGAACAACAGATGCAGGAACAGGCTGCACAGCTCAGCACAACATTCCAAGCTCAAAATAGA
AGCCTTCTCAGTGAGCTCCAGCACGCCAGAGGACTGTTAATAACGATGATCCATGTGTTTACTCTAAA
GTGCTAAAATATGGGAGTTTCTTTTACTCTTTTGTCACTGATGACACAACAGAAAAGAAACGTGAGAC
CTTGGGACAAATCAACATTTAAATAAACTTTA (SEQ ID NO: 6)

图8B

GTCGACCACGTGTAGTGTATAAATTTGTTATCTTATTGTTCTTTCATTTGTTCTTCCCTGAAATACTCTGCTCTCTCCTA
 TCTCTGCTCTGAAAGGCAGAAAGAGGGCAGCCCTCTCCAAAGGCAAAATGGGGCTCCTGTGGGAAACAGAGGGGTGCCTCTG
 TCAACAAGGTGATGCCACATCCCTTTCAACCATGCTGACACCTCTGGTTTTGTAAAGTGCCCACTCTCTGTGCACGGTG
 ATGCATAGGCACCTGCACCCCGTGCCTAAACCTGCAGCTGGCAGGGCCCTGTCTGCTCTTCAATTCACCGTTCTCACGAG
 TTGCAATAAGTTCAGCCCTCCATGTCACACTGTGTTTTCTTAGGACCGGTAATGCCAACTTTACAAGGACTCCGGCATCA
 CATACCTGGGCATCAAGGCCAACGACACACAGGAGTTCAACCTCAGCGCTTACTTTGAAAGGGCTGCCGACTTCATTGACC
 AGGCTTTGGCTCAAAAAGATGGCCGGGTGCTCGTCCACTGCCGGGAAGTTATAGCCGCTCCCCAACGCTAGTTATCGCCT
 ACCTCATGATGCGGCAGAAAGTGGACGTCAAGTCTGCCCTGAGCATCGTGAGGCAGAACCGTGAGATCGGCCCCAAACGATG
 GCTTCTGGCCAGCTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCCAAGGATTTGAAGTTGAAACCCTAGTTCAATTCAACCCAAAT
 CTGCTCGAGATTTCCGTAAGTTAGGCCGTAGCAAAAGGTCAAGAGCTGCCATGTTTAGGAAAACACACTGTATACTGCTC
 CCAGCATCACAAAGCACTTGTCTACAAGTGTGTCCCAACACAGTCTTGGCCACTTTAAACCACCCTGGGGAGCACATAAAG
 AAGCTTGCCAAATTAGGATGTCCTTGTCTCGGATTAATGCTCGGCTTTACTTAAGGATATTTTTGGTCCATAAAGAAGAAGC
 AGTGAAGCAGGGAATTTATTTAAAGCCAGGAGCCATAATCTCTCATTCAGAAAACAGAAAGAACTGAAAGGCAAAAGTACTA
 TCGGGAGCCTCGGAAAAGGAATACAGGCTGAAAGATTCTGCAGAAATATTTAAAGTCCAAAGGAGTCTGTGAGTCAATGCAAT
 ATTACAGACTGACCAAGGCTCTCACAGAGACGGAAAAAAGAAAGAGGCACAAAGTGAAGCAGAAAGCTGAAAAGGCTGA
 AGCGCAAAGGTTGGCGCGGATTTCAAAGGCAAGAACGAGCAAATGATGCAGGAGAGGGAGACTCCATCAGGAAACAAGTGAG
 ACAAATGGAGATAGCCAAACAAAATTTGGCTGGCAGAGCAAAGAAAATGCAGGAAACAACAGATGCAGGAAACAGGCTGCACA
 GCTCAGCACAAACATTTCAAAGCTCAAAATAGAAAGAACGGTAACAGCGTGTTTACAGAGAAATCTAACTCGATGATGAATACAA
 CTACGCCATTACCAAAGCAAACGCTCTGTGACTGAAAGTTTCGGTGTAAAAGACCACGATCCTCCTTGACGAGTTTGTGTTT
 TCAAAAATGGTGCAATAATTTAAGTGGCATCTTCTCTCCCAACCGGTCTAGCTTCGGAGAGTTCTGGGATGTACCCGAGCT
 GCAAAAATATGTATCCACAGTGAATCTTGGTTGTAAACTTGACCTAAAGACCATTGCACCTCGTCCCCGAAACGCCGAATA
 TAATCCCAAGCGGTTTGCTGCGGTAATCATGAGGATAAGAGGCCACGAAACCACGGCAGTGAATTTCAAGTTCTGGGAAAAT
 GGTGTGCACAGGACCAAGAGTGAAGAACAAGTCCAGACTGGCAGCAAGAAAATATGCTAGAGTTGTACAGAAGTTGGGTTT
 TCCAGCTAAGTTCTTGGACTTCAAGATTCAGAATATGGTGGGAGCTGTGATGTGAAGTTTGTAGCGGGCCGCTGTCCC
 GCAATGCCCGCTGAGTATCTGCTGAGCAGCGGGATCAATGGCAGCTTCTTGGTGGCTGAGAGTGAAGCAGTCTTGCCAGAG
 GGTCCATCTCGCTGAGATACGAAGGGAGGTTGATCCATTAACAGGATCAACACTGCTTCTGATGGCAAGCTCTACGCTCCT
 CCGAGAGCCGTTCAACACCCCTGGCCGAGTTGGTTCATCATCAATCAACGGTGGCCGACGGGCTCATCACACGCTCCAAT
 ATCCAGCCCCAAAGCGCAACAGCCCACTGTCTATGGTGTGTCCCCCAAACCTACGACAAGTGGGAGATGGAGTTTAAACCAT
 ATGGGATCC (SEQ ID NO: 7)

图9A

CCTGGGCATCAAGGCCAACGACACACAGGAGTTCAACCTCAGCGCTTACTTTGAAAGGGCTGCCGACTTC
 ATTGACCAGGCTTTGGCTCAAAAGAAATGGCCGGGTGCTCGTCCACTGCCGGGAAGTTATAGCCCGTCCC
 CAACGCTAGTTATCGCCCTACCTCATGATCGGCAGAAAGATGGACGTCAAGTCTGCCCTGAGCATCGTGAG
 GCAGAACCCGTGAGATCGGCCCCCAACGATGGCTTCCCTGGCCAGCTCTGCCAGCTCAATGACAGACTAGCC
 AAGGATTTGAAGTTGAAACCCCTAGTTTCAACCAAAATCTGCTCGAGATTTCCGTAAGTTAGGCCGTT
 AGCAAAAGGTGTC AAGAGCTGCCATGTTTAGGAAACACACTGTATACTGCTCCAGCATCACAAAGGCACTT
 GTCACAAAGTGTGCCAACACAGTCTGGGCCACTTTAAACCACCCTGGGGAGCACATAAAAGAAAGCTTGC
 CAATTAGGATGTCCTTGTCTCGGATTAATTGCTCGGCTTTACTTAAGGATAATTTTGGTCTTAAAGAAGA
 AGCAGTGAAGCAGGGAATTTATCTAAGCCAGGAGGCCATAATCTCTTCAATTCAGAAAACAGAAAGAACTG
 AAGGC AAAGTACTATCGGGAGCTCGGAAAGGAAATACAGGCTGAAAGAGTTCTGCAGAAAATATTTAAAGT
 CCAAGGAGTCTGTGAGTCAATGCAATAATTACAGACTGACCAGGCTCTCACAGAGACGGAAA AAAAGAA GAA
 AGAGGCACAAGTGAAAGCAGAAAGCTGAAAAGGCTGAAAGCGCAAAGGTTGGCCGGATTCAAAAGGCAGAAC
 GAGCAAATGATGCAGGAGGGAGACTCCATCAGGAAACAAGTGAGACAAAATGGAGATAGCCAAACAAA
 ATTGGCTGGCAGAGCAACAGAAAATGCAGGAAACAACAGATGCAGGAAACAGGCTGCACAGCTCAGCACAAC
 ATTCCAAGCTCAAAAATAGAAGAACGGTAACAGCGTGTTTACAGAGAAATCTAACTCGATGATGAATACAAC
 TACGCCATTAACCAAAGCAAACGCTGTGACTGAAAGTTTCGGTGTAAAAGACCACGATCCTCCTTGACGA
 GTTTTGTTTTCAAAAATGGTGCAATAAATTAAGTGGCATCTTCTCTCCACCGGCTTAGCTTCGGAGAG
 TTCTGGGATTTGTACCGCAGCTGCAAAAATAATGTATCCACAGTGAATCTTGGTTGTAAACTTGACCTAAAG
 ACCAATTGCAC TTCTGTGCCGAAACGCCGAATAATAATCCAAAGCGGTTTGCTGCGGTAATCATGAGGATAA
 GAGAGCCACGAAACCACGGCACTGATTTTCAGTCTGGGAAAATGGTGTGCACAGGAGCCAAAGAGTGAAGA
 ACAGTCCAGACTGGCAGCAAGAAAATAATGCTAGAGTTGTACAGAAAGTTGGGTTTCCAGCTAAGTTCTTG
 GACTTCAAGA (SEQ ID NO: 8)

图9B