



(10) 申请公布号 CN 115279920 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 01

(21) 申请号 202180019123.8

(22) 申请日 2021.01.16

(30) 优先权数据

62/962,711 2020.01.17 US

63/049,063 2020.07.07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.05

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/013776 2021.01.16

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/146659 EN 2021.07.22

(71) 申请人 仁慈生物分析公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·C·塞德拉克 L·T·博尔托林

D·P·塞勒姆

(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限公司

责任公司 11287

专利代理师 沈锦华

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6809 (2006.01)

C12Q 1/6813 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

权利要求书17页 说明书113页 附图49页

(54) 发明名称

用于检测卵巢癌的组合物和方法

(57) 摘要

本公开一方面提供了用于检测卵巢癌(例如,早期检测卵巢癌)的技术。在另一方面,本文提供的技术可用于选择和/或监测和/或评估施用于确定患有或易患卵巢癌的受试者的治疗的功效。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于开发伴随诊断,例如,通过结合治疗测量肿瘤负荷和肿瘤负荷的变化。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于开发伴随诊断,例如,通过鉴定妇女血液样品中与治疗反应相关的生物标记物。

1. 一种方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供或获得来自受试者的血液来源的样品;

(b) 在所述血液来源样品中检测表达第一靶生物标记物特征的细胞外囊泡(“表达第一靶生物标记物特征的细胞外囊泡”),所述第一靶生物标记物特征包含:

至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物和

选自自由以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和囊泡内RNA生物标记物,其中:

所述表面蛋白生物标记物选自CLDN6、AQP5、CLDN16、CLDN3、FOLR1、EpCAM、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合;

所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合;

所述囊泡内RNA生物标记物选自CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;

(c) 将指示所述血液来源的样品中表达所述第一靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平的信息与包括第一参考阈值水平的参考信息进行比较;

(d) 当所述血液来源的样品示出相对于参考所述第一参考阈值水平的分类截止值升高的表达第一靶生物标记物特征的细胞外囊泡水平时,将所述受试者分类为患有或易患卵巢癌。

2. 如权利要求1所述的方法,其中当所述至少一个靶生物标记物选自所述表面蛋白生物标记物中的一个或多个时,所述选定的一个或多个表面蛋白生物标记物和所述至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是不同的。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其中步骤(b)和(c)对至少第二靶生物标记物特征是重复的,并且其中所述分类截止值参考所述第一参考阈值水平和对应于所述至少第二靶生物标记物特征的至少第二参考阈值水平。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是或包含CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

5. 如权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是或包含SLC34A2多肽、FOLR1多肽、MUC16多肽、CLDN3多肽、CLDN6多肽、ALPL多肽、BST2多肽、MSLN多肽、MUC1多肽、PTGS1多肽、sTn糖基化多肽、TACSTD2多肽、EpCAM多肽和/或LRRTM1多肽。

6. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含(i)至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含SCL34A2多肽和/或CLDN6多肽;和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

7. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含(i)至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含SCL34A2多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物FOLR1。

8. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征

包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含SCL34A2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其是或包含MUC16和FOLR1。

9. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物MUC16。

10. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其是或包含MUC16和CLDN6。

11. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含FOLR1多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为FOLR1和CLDN6。

12. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含FOLR1多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为SLC34A2和CLDN3。

13. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为SLC34A2和MUC16。

14. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为SLC34A2和FOLR1。

15. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为FOLR1和MUC16。

16. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为CLDN3和MUC16。

17. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为CLDN3和FOLR1。

18. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含CLDN3多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物FOLR1。

19. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含LRRTM1多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物MUC16。

20. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含ALPL多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物FOLR1。

21. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征

包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含BST2多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

22.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含FOLR1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MSLN。

23.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含FOLR1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

24.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MSLN多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

25.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MSLN多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC1。

26.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物sTn糖基化多肽。

27.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

28.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物FOLR1。

29.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物sTn糖基化多肽。

30.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含PTGS1多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

31.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含SLC34A2多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MUC16。

32.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物FOLR1。

33.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少一个靶生物标记物MSLN。

34.如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征

包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物MUC16。

35. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少一个靶生物标记物sTn糖基化多肽。

36. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和sTn糖基化多肽。

37. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和MUC1。

38. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和MSLN。

39. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和FOLR1。

40. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和MUC1。

41. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和MSLN。

42. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和FOLR1。

43. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含TACSTD2多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC1和MSLN。

44. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和sTn糖基化多肽。

45. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和MSLN。

46. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和 (ii) 至少两个靶生物标记物,其为MUC16和FOLR1。

47. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征

包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和MSLN。

48. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和FOLR1。

49. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC1多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MSLN和FOLR1。

50. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和MUC1。

51. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和MSLN。

52. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为sTn糖基化多肽和FOLR1。

53. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC1和MSLN。

54. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含MUC16多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MSLN和FOLR1。

55. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC16和MUC1。

56. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC16和MSLN。

57. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC16和FOLR1。

58. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC1和MSLN。

59. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物,其是或包含sTn糖基化多肽,和(ii)至少两个靶生物标记物,其为MUC1和FOLR1。

60. 如权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征

包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 sTn 糖基化多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MSLN 和 FOLR1。

61. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MUC16 和 sTn 糖基化多肽。

62. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MUC16 和 MUC1。

63. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MUC16 和 FOLR1。

64. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 sTn 糖基化多肽和 MUC1。

65. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 sTn 糖基化多肽和 FOLR1。

66. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 MSLN 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MUC1 和 FOLR1。

67. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 SLC34A2 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 MUC16 和 MSLN。

68. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 SCL34A2 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 sTn 糖基化多肽和 MUC16。

69. 如权利要求1至5中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含 (i) 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物, 其是或包含 SCL34A2 多肽, 和 (ii) 至少两个靶生物标记物, 其为 sTn 糖基化多肽和 FOLR1。

70. 如权利要求1至69中任一项所述的方法, 其中所述第一和/或第二参考阈值水平通过在来自非癌症受试者群体的可比样品中观察到的表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平来确定。

71. 如权利要求70所述的方法, 其中所述非癌症受试者群体包括以下受试者群体中的一个或多个: 健康妇女受试者、诊断为患有良性肿瘤的妇女受试者以及患有非卵巢相关疾病、病症和/或病状的妇女受试者。

72. 如权利要求1至71中任一项所述的方法, 其中所述血液来源的样品已经经过尺寸排阻色谱以分离 (例如, 直接从所述血液来源的样品) 具有包括细胞外囊泡的关注的大小范围的纳米颗粒。

73. 如权利要求1至72中任一项所述的方法, 其中所述检测步骤包括捕获测定。

74. 如权利要求73所述的方法,其中所述捕获测定涉及使所述血液来源的样品与包含结合到所述至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂接触。

75. 如权利要求74所述的方法,其中所述捕获剂是或包含固体基底,所述固体基底包含与其缀合的靶捕获部分。

76. 如权利要求75所述的方法,其中所述固体基底包含磁珠。

77. 如权利要求74至76中任一项所述的方法,其中所述靶捕获部分是或包含抗体剂。

78. 如权利要求1至77中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括检测测定。

79. 如权利要求1至78中任一项所述的方法,其中所述检测步骤包括捕获测定和检测测定,所述捕获测定在所述检测测定之前进行。

80. 如权利要求78至79中任一项所述的方法,其中当所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含至少一个囊泡内RNA生物标记物时,所述检测测定涉及逆转录qPCR。

81. 如权利要求78至80中任一项所述的方法,其中当所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含至少一个囊泡内蛋白生物标记物时,在所述检测测定之前对所述表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡进行涉及固定和/或透化的处理。

82. 如权利要求78至81中任一项所述的方法,其中当所述第一和/或第二靶生物标记物特征包含至少一个表面蛋白生物标记物和/或囊泡内蛋白生物标记物时,所述检测测定涉及免疫测定(包括例如免疫-PCR和/或邻近连接测定)。

83. 如权利要求82所述的方法,其中所述检测测定涉及邻近连接测定。

84. 如权利要求83所述的方法,其中所述邻近连接测定包括以下步骤:

(a) 将表达所述至少一个胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的所述表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡(“表达细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的细胞外囊泡”)与一组检测探针接触,每个检测探针都针对所述靶生物标记物特征的靶生物标记物,所述组包含至少两个检测探针,从而产生包含所述细胞外囊泡和所述检测探针组的组合。

其中所述检测探针各自包含:

(i) 针对所述靶生物标记物特征的所述靶生物标记物的靶结合部分;以及

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述检测探针的所述单链悬突部分的特征在于它们在所述检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交;

(b) 将所述组合保持在允许所述检测探针组与其在所述细胞外囊泡上的各自靶标结合的条件下,使得所述至少两个检测探针可结合至表达所述靶生物标记物特征的相同的细胞外囊泡以形成双链复合物;

(c) 使所述双链复合物与核酸连接酶接触以产生连接模板;

(d) 检测所述连接模板,其中所述连接模板的存在指示所述表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡在血液来源的样品中的存在;和

(e) 任选地重复步骤a至d以获得至少一个其他靶生物标记物特征。

85. 如权利要求84所述的方法,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对MUC16。

86. 如权利要求84所述的方法,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对

FOLR1。

87. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对MSLN。

88. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对ALPL。

89. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对MUC1。

90. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对sTn糖基化多肽。

91. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对BST2。

92. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对PTGS1。

93. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对SLC34A2。

94. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对TACSTD2。

95. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和FOLR1。

96. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和CLDN6。

97. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和CLDN6。

98. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和CLDN3。

99. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和MUC16。

100. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和MUC16。

101. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和FOLR1。

102. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对ALPL和FOLR1。

103. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对BST2和MUC16。

104. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和MSLN。

105. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和MUC16。

106. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC16。

107. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC1。

108. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC1。

109. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和MUC16。

110. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和FOLR1。

111. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC16。

112. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对PTGS1和MUC16。

113. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和FOLR1。

114. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和FOLR1。

115. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MSLN。

116. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对TACSTD2和MUC16。

117. 如权利要求84所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和TACSTD2。

118. 如权利要求85至117中任一项所述的方法, 其中所述至少两个检测探针的寡核苷酸结构域不同。

119. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对SLC34A2多肽的抗体剂。

120. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对MUC16多肽的抗体剂。

121. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对FOLR1多肽的抗体剂。

122. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对MSLN多肽的抗体剂。

123. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对sTn糖基化多肽的抗体剂。

124. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对MUC1多肽的抗体剂。

125. 如权利要求77至118中任一项所述的方法, 其中所述捕获测定的靶捕获部分是或

包含至少一种针对TACSTD2多肽的抗体剂。

126. 如权利要求77至118中任一项所述的方法,其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对PTGS1多肽的抗体剂。

127. 如权利要求77至118中任一项所述的方法,其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对BST2多肽的抗体剂。

128. 如权利要求77至118中任一项所述的方法,其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对ALPL多肽的抗体剂。

129. 如权利要求77至118中任一项所述的方法,其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对LRRTM1多肽的抗体剂。

130. 如权利要求77至118中任一项所述的方法,其中所述捕获测定的靶捕获部分是或包含至少一种针对CLDN3多肽的抗体剂。

131. 如权利要求1至130中任一项所述的方法,其中进行所述方法以筛查所述受试者的早期卵巢癌、晚期卵巢癌或复发卵巢癌。

132. 如权利要求1至131中任一项所述的方法,其中确定所述受试者具有正常血清CA-125水平。

133. 如权利要求1至132中任一项所述的方法,其中确定所述受试者具有等于或高于正常血清CA-125水平的血清CA-125水平。

134. 如权利要求1至133中任一项所述的方法,其中所述受试者具有以下特征中的至少一个或多个:

(i) 易患卵巢癌(例如,处于平均群体风险(即,没有遗传风险)或具有卵巢癌遗传风险的)的无症状女性(例如妇女);

(ii) 绝经后妇女;

(iii) 具有乳腺癌和/或卵巢癌家族史的女性(例如,妇女)(例如,有一个或多个一级亲属有乳腺癌和/或卵巢癌史的女性(例如,妇女));

(iv) 确定在ATM、BRCA1、BRCA2、CDKN2A、MSH2、MLH1、MSH2、EPCAM、PALB2、STK11、TP53、BARD、CHEK2、MRE11A、RAD50、RAD51C、RAD51D及其组合中具有一个或多个种系突变的女性(例如妇女);

(v) 确定在BRCA1、BRCA2和/或PALB2中具有种系突变的患有乳腺癌的女性(例如妇女);

(vi) 老年妇女,例如65岁或以上;

(vii) 具有一种或多种非特异性卵巢癌症状的女性(例如,妇女),任选地其中至少一种所述非特异性症状类似于肠易激综合征的一种或多种症状;以及

(viii) 推荐进行CA-125/经阴道超声(TVUS)定期筛查的女性(例如妇女);

(ix) 诊断患有影像学证实的附件肿块的女性(例如,妇女);

(x) 在进行降低风险的双侧输卵管卵巢切除术之前处于遗传风险的女性(例如,妇女);

(xi) 患有良性妇科肿瘤的女性(例如,妇女);

(xii) 先前接受过卵巢癌治疗的女性(例如,妇女);以及

(xiii) 具有卵巢癌生活史相关风险的女性(例如,妇女)。

135. 如权利要求1至134中任一项所述的方法,其中所述方法与以下诊断测定中的一种或多种组合使用:

(i) 所述受试者的年度体格检查(例如,包括HPV和/或宫颈癌的巴氏涂片筛查和乳腺癌的乳房X线照片筛查)。

(ii) 血清CA-125和/或TVUS筛查测试;

(iii) 筛查血浆中与癌症相关的循环肿瘤DNA和/或蛋白生物标记物中的基因突变的基因测定;

(iv) 涉及免疫荧光染色鉴定细胞表型和标记物表达,之后扩增并通过下一代测序进行分析的测定;以及

(v) BRCA1和/或BRCA2种系和体细胞突变测定,或涉及无细胞肿瘤DNA、液体活检、血清蛋白和无细胞DNA、OVA1和OVERA测试和/或循环肿瘤细胞的测定。

136. 如权利要求1至135中任一项所述的方法,其中所述卵巢癌为高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌或粘液性卵巢癌。

137. 如权利要求1至136中任一项所述的方法,其中所述卵巢癌为高级别浆液性卵巢癌。

138. 如权利要求137所述的方法,其中所述高级别浆液性卵巢癌处于早期。

139. 如权利要求1至138中任一项所述的方法,其中进行所述方法以监测卵巢癌患者对抗卵巢癌疗法(例如,奥拉帕尼、顺铂、鲁卡帕尼、尼拉帕尼、他拉唑帕尼)的治疗的反应和/或癌症复发/转移。

140. 一种用于检测卵巢癌的试剂盒,所述试剂盒包含:

(a) 捕获剂,其包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分;以及

(b) 一组检测探针,所述组包含至少两个检测探针,每个检测探针针对卵巢癌的靶生物标记物特征的靶生物标记物,其中所述检测探针各自包含:

(i) 针对所述卵巢癌靶生物标记物特征的靶生物标记物的靶结合部分;以及

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述至少两个检测探针的单链悬突部分的特征在于它们在所述至少两个检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交;

其中所述卵巢癌的靶生物标记物特征包括:

至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物和

选自由以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和囊泡内RNA生物标记物,其中:

所述表面蛋白生物标记物选自CLDN6、CLDN3、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合;

所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合;

所述囊泡内RNA生物标记物选自CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合。

141. 如权利要求140所述的试剂盒,其中当所述至少一个靶生物标记物选自所述表面蛋白生物标记物中的一个或多个时,所述选定的一个或多个表面蛋白生物标记物和所述至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽不同。

142. 如权利要求140或141所述的试剂盒,其中所述细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是或包含CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHOLD、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

143. 如权利要求47至49中任一项所述的试剂盒,其中所述细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是或包含SLC34A2多肽、MUC16多肽、EpCAM多肽、FOLR1多肽、CLDN3多肽、CLDN6多肽、ALPL多肽、BST2多肽、MSLN多肽、MUC1多肽、PTGS1多肽、sTn糖基化多肽、TACSTD2多肽和/或LRRTM1多肽。

144. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对所述靶生物标记物特征的相同的靶生物标记物。

145. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MUC16。

146. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含FOLR1。

148. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MSLN。

149. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含ALPL。

150. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MUC1。

151. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含sTn糖基化多肽。

152. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含BST2。

153. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含PTGS1。

154. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含SLC34A2。

155. 如权利要求144所述的试剂盒,其中所述相同的靶生物标记物是或包含TACSTD2。

156. 如权利要求140至155中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的寡核苷酸结构域不同。

157. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对所述靶生物标记物特征的不同的靶生物标记物。

158. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和FOLR1。

159. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和CLDN6。

160. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和CLDN6。

161. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和CLDN3。

162. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和MUC16。

163. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和MUC16。

164. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和FOLR1。

165. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对ALPL和FOLR1。

166. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对BST2和MUC16。

167. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和MSLN。

168. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和MUC16。

169. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC16。

170. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC1。

171. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC1。

172. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和MUC16。

173. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和FOLR1。

174. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC16。

175. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对PTGS1和MUC16。

176. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和FOLR1。

177. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和FOLR1。

178. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MSLN。

179. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对TACSTD2和MUC16。

180. 如权利要求140至143中任一项所述的试剂盒,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和TACSTD2。

181. 如权利要求140至180中任一项所述的方法,其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对SLC34A2多肽的抗体剂。

182. 如权利要求140至180中任一项所述的方法,其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对MUC16多肽的抗体剂。

183. 如权利要求140至180中任一项所述的方法,其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对FOLR1多肽的抗体剂。

184. 如权利要求140至180中任一项所述的方法,其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜

结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对MSLN多肽的抗体剂。

185. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对sTn糖基化多肽的抗体剂。

186. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对MUC1多肽的抗体剂。

187. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对TACSTD2多肽的抗体剂。

188. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对PTGS1多肽的抗体剂。

189. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对BST2多肽的抗体剂。

190. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对ALPL多肽的抗体剂。

191. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对LRRTM1多肽的抗体剂。

192. 如权利要求140至180中任一项所述的方法, 其中所述包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶捕获部分的捕获剂包含至少一种针对CLDN3多肽的抗体剂。

193. 如权利要求140至192中任一项所述的试剂盒, 其还包含至少一种另外的试剂(例如, 连接酶、固定剂和/或透化剂)。

194. 如权利要求140至146或157至161中任一项所述的试剂盒, 其包含:

(a) 包含针对SLC34A2多肽的靶捕获部分的第一捕获剂;

(b) 包含针对MUC16多肽的靶捕获部分的第二捕获剂;

(c) 至少三组检测探针, 其中所述检测探针各自包含:

(i) 针对靶表面蛋白生物标记物的靶结合部分; 和

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域, 所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述至少两个检测探针的单链悬突部分的特征在于它们在所述至少两个检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交;

其中:

第一组中的至少两个检测探针各自针对MUC16靶表面蛋白;

第二组中的至少两个检测探针各自针对FOLR1靶表面蛋白; 和

第三组中的至少两个检测探针分别针对MUC16多肽和FOLR1多肽。

195. 如权利要求140至193中任一项所述的试剂盒, 其包含:

(a) 包含靶捕获部分的第一捕获剂;

(b) 包含靶捕获部分的第二捕获剂;

(c) 至少两组检测探针, 其中所述检测探针各自包含:

(i) 针对靶表面蛋白生物标记物的靶结合部分; 和

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域, 所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述至少两个检测探针的单链悬突部分的特征在于它们在所述至少两个检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交。

196. 如权利要求140至193中任一项所述的试剂盒,其包含:

(a) 包含靶捕获部分的第一捕获剂;

(b) 包含靶捕获部分的第二捕获剂;

(c) 包含靶捕获部分的第三捕获剂;

(d) 至少三组检测探针,其中所述检测探针各自包含:

(i) 针对靶表面蛋白生物标记物的靶结合部分;和

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述至少两个检测探针的单链悬突部分的特征在于它们在所述至少两个检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交。

197. 一种复合物,所述复合物包含:

(a) 一种表达卵巢癌靶生物标记物特征的细胞外囊泡,其中其包含:

至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物和

选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和囊泡内RNA生物标记物,其中:

所述表面蛋白生物标记物选自CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHOLD、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合;

所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合;

所述囊泡内RNA生物标记物选自CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;

其中所述细胞外囊泡固定在固体基底上,所述固体基底包含针对所述细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶捕获部分;

(b) 各自结合到所述细胞外囊泡的第一检测探针和第二检测探针,其中每个检测探针包含:

(i) 针对所述肿瘤靶标生物标记物特征的靶标生物标记物之一的靶标结合部分;和

(ii) 偶联至所述靶结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,

其中所述第一检测探针和所述第二检测探针的单链悬突部分彼此杂交。

198. 如权利要求197所述的复合物,其中当所述至少一个靶生物标记物选自所述表面蛋白生物标记物中的一个或多个时,所述选定的一个或多个表面蛋白生物标记物和所述至少一个细胞外囊泡相关膜结合蛋白生物标记物不同。

199. 如权利要求196或197所述的复合物,其中所述细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物是或包含CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHOLD、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

200. 如权利要求197至199中任一项所述的复合物,其中所述胞外囊泡相关膜结合多肽

生物标记物是或包含SLC34A2多肽、FOLR1多肽、MUC16多肽、EpCAM多肽、CLDN3多肽、CLDN6多肽、ALPL多肽、BST2多肽、MSLN多肽、MUC1多肽、PTGS1多肽、sTn糖基化多肽、TACSTD2多肽和/或LRRTM1多肽。

201. 如权利要求197至200中任一项所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对所述靶生物标记物特征的相同的靶生物标记物。

202. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MUC16。

203. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含FOLR1。

204. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MSLN。

205. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含ALPL。

206. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含MUC1。

207. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含sTn糖基化多肽。

208. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含BST2。

209. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含PTGS1。

210. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含SLC34A2。

211. 如权利要求201所述的复合物,其中所述相同的靶生物标记物是或包含TACSTD2。

212. 如权利要求201至211中任一项所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的寡核苷酸结构域不同。

213. 如权利要求197至200中任一项所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分各自针对所述靶生物标记物特征的不同的靶生物标记物。

214. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和FOLR1。

215. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC16和CLDN6。

216. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和CLDN6。

217. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和CLDN3。

218. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和MUC16。

219. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和MUC16。

220. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对CLDN3和FOLR1。

221. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对ALPL和FOLR1。

222. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对BST2和MUC16。

223. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针

对FOLR1和MSLN。

224. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对FOLR1和MUC16。

225. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC16。

226. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MSLN和MUC1。

227. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC1。

228. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和MUC16。

229. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对MUC1和FOLR1。

230. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MUC16。

231. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对PTGS1和MUC16。

232. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对SLC34A2和FOLR1。

233. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和FOLR1。

234. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和MSLN。

235. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对TACSTD2和MUC16。

236. 如权利要求213所述的复合物,其中所述至少两个检测探针的靶结合部分分别针对sTn糖基化多肽和TACSTD2。

237. 如权利要求197至236中任一项所述的复合物,其中所述固体基底包含磁珠。

238. 如权利要求197至236中任一项所述的复合物,其中所述靶捕获部分是或包含抗体剂。

## 用于检测卵巢癌的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2020年1月17日提交的美国临时申请号62/962,711和于2020年7月7日提交的美国临时申请号63/049,063的权益,所述申请中的每一个的内容在此整体并入本文。

### 背景技术

[0003] 癌症的早期检测大大增加了成功治疗的机会。然而,包括卵巢癌在内的许多癌症仍然缺乏有效的筛查建议。癌症筛查测试的典型挑战包括有限的灵敏度和特异性。假阳性结果率高可能特别令人担忧,因为它会给不想不必要地施用(或接受)可能具有不希望的副作用的抗癌疗法的临床医生和患者带来困难的管理决策。相反,假阴性结果率高无法满足筛查测试的目的,因为错过了需要治疗的患者,从而导致治疗延迟,并因此降低成功的可能性。

### 发明内容

[0004] 本公开尤其提供了用于实现有效卵巢癌筛查的见解和技术。在一些实施方案中,所提供的技术对于检测早期卵巢癌是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术即使在应用于包含无症状个体或由无症状个体组成的群体时也是有效的(例如,由于足够高的灵敏度和/或低的假阳性和/或假阴性结果率)。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含没有发展卵巢癌的遗传风险的个体(例如,无症状个体)或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含有症状个体(例如,遭受一种或多种卵巢癌症状的个体)或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含具有卵巢癌风险的个体(例如,具有卵巢癌的遗传和/或生活史相关风险因素的个体)或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术可以是或包括一种或多种组合物(例如,分子实体或复合物、系统、细胞、集合、组合、试剂盒等)和/或方法(例如,制造、使用、评估等),如对于阅读本文提供的公开的本领域技术人员来说将是清楚的。

[0005] 在一些实施方案中,本公开用某些现有技术(包括例如卵巢癌检测和诊断的某些常规方法)确定问题的根源。例如,本公开认识到许多常规诊断测定(例如,基于无细胞核酸、血清蛋白(例如,是MUC16多肽的一部分的CA-125)和/或细胞外囊泡的批量分析)可能是耗时的、昂贵的和/或缺乏足以提供可靠且全面的诊断评估的灵敏度和/或特异性。在一些实施方案中,本公开尤其提供通过检测个体细胞外囊泡中卵巢癌的靶生物标记物特征的共定位来解决此类问题的技术(包括系统、组合物和方法),所述细胞外囊泡包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、内部蛋白生物标记物和RNA生物标记物。在一些实施方案中,本公开尤其提供了通过使用基于个体细胞外囊泡中至少两个或更多个靶实体(例如,靶生物标记物特征)的相互作用和/或共定位的靶实体检测方法(由申请人开发并描述于均在2020年2月28日提交且名

为“Systems, Compositions, and Methods for Target Entity Detection”的美国申请号 16/805,637 和国际申请 PCT/US2020/020529 中) 检测卵巢癌的此类生物标记物特征来解决此类问题的技术(包括系统、组合物和方法)。

[0006] 在一些实施方案中,本公开尤其提供了以下见解:对无症状个体进行筛查(例如,在出现症状之前或以其他方式在没有出现症状的情况下进行定期筛查)可能是有益的,并且甚至对于卵巢癌的有效管理(例如,成功治疗)是重要的。在一些实施方案中,本公开提供了卵巢癌筛查系统,在一些实施方案中,所述卵巢癌筛查系统可被实施以检测无症状个体(例如,没有卵巢癌遗传风险)中的卵巢癌,包括早期癌症。在一些实施方案中,所提供的技术被实施以实现无症状个体(例如,没有卵巢癌遗传风险)的定期筛查。本公开提供了例如组合物(例如,试剂、试剂盒、组分等)以及提供和/或使用它们的方法,包括涉及对一个或多个个体(例如,无症状个体)进行定期测试的策略。本公开定义了此类系统的有用性,并提供了用于实施它们的组合物和方法。

[0007] 在一些实施方案中,所提供的技术实现对卵巢癌的一个或多个特征(例如,发病、进展、对治疗的反应性、复发等)的检测(例如,早期检测,例如,在一个或多个无症状个体和/或一个或多个群体中),其中灵敏度和/或特异性(例如,假阳性和/或假阴性结果的比率)适用于允许将所提供的技术有用地应用于单次和/或定期(例如,周期性)评估。在一些实施方案中,所提供的技术与妇女的定期体格检查诸如乳房X线照片、HPV 和/或巴氏涂片筛查结合是有用的。在一些实施方案中,所提供的技术可用于与一种或多种治疗方案结合;在一些实施方案中,所提供的技术可改进这样的一种或多种治疗方案的一个或多个特征(例如,根据接受的参数的成功率)。

[0008] 在一些方面,提供了用于将受试者(例如,无症状受试者)分类为患有或易患卵巢癌的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于将受试者(例如,无症状受试者)分类为患有或易患卵巢癌的方法或测定。在一些实施方案中,所提供的方法或测定包括(a)在来自有需要的受试者的血液来源的样品中检测表达卵巢癌的靶生物标记物特征的细胞外囊泡,所述靶生物标记物特征包括:至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和囊泡内RNA生物标记物,其中所述表面蛋白生物标记物选自AQP5、CDH6、CHODL、CLDN3、CLDN6、CLDN16、EpCAM、FOLR1、HTR3A、LEMD1、LRRTM1、MUC16、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合;所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合;并且所述囊泡内RNA(例如mRNA)生物标记物选自CLDN6、CRABP2、KLK7、MIF、PRAME、S100A1及其组合;(b)将指示血液来源的样品中表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡水平的样品信息与包括参考阈值水平的参考信息进行比较;和(c)当所述血液来源的样品示出相对于参考所述参考阈值水平的分类截止值升高水平的表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡时,将所述受试者分类为患有或易患卵巢癌。

[0009] 在一些实施方案中,可对一种或多种另外的靶生物标记物特征进行本文所述的方法或测定。在一些这样的实施方案中,分类截止值可参考对应于另外的靶生物标记物特征的另外的参考阈值水平。

[0010] 在一些实施方案中,用于本文使用的和/或描述的卵巢癌的靶生物标记物特征的

细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含肿瘤特异性生物标记物和/或组织特异性生物标记物(例如,卵巢组织特异性生物标记物)。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含非特异性标记物,例如,其存在于一种或多种非靶肿瘤和/或一种或多种非靶组织中。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物可以是或包含AQP5、CDH6、CHODL、CLDN3、CLDN6、CLDN16、EpCAM、FOLR1、HTR3A、LEMD1、LRRTM1、MUC16、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A和SLC34A2中的一种或多种。

[0011] 在一些实施方案中,细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物可以是或包含SLC34A2多肽、AQP5多肽、MUC16多肽、CLDN3多肽、CLDN6多肽、FOLR1多肽、ALPL多肽、BST2多肽、CD24多肽、MSLN多肽、MUC1多肽、PTGS1多肽、sTn多肽糖基化、TACSTD2多肽和/或LRRTM1多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含SLC34A2多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MUC16多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含FOLR1多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含LRRTM1多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含TACSTD2多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含CD24多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含PTGS1多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MUC1多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含sTn多肽糖基化。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MSLN多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含ALPL多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含BST2多肽。在一些实施方案中,此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含CLDN3多肽。

[0012] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征可包含细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一种另外的靶表面蛋白生物标记物,其在一些实施方案中可以是或包含AQP5、CDH6、CHODL、CLDN3、CLDN6、CLDN16、EpCAM、FOLR1、HTR3A、LEMD1、LRRTM1、MUC16、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A和/或其任何组合。

[0013] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征可包含细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一种靶囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物,其在一些实施方案中可以是或包含CLDN6、CRABP2、KLK7、MIF、PRAME、S100A1及其组合。

[0014] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征可包含细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一种另外的靶囊泡内蛋白生物标记物,其在一些实施方案中可以是或包含CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合。

[0015] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含SCL34A2多肽和/或CLDN6多肽;和至少一种靶生物标记物MUC16。

[0016] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少一种靶生物标记物MUC16。

[0017] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多

肽,其是或包含SLC34A2多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和FOLR1。

[0018] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含SLC34A2多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和FOLR1。

[0019] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含SLC34A2多肽;和至少一种靶生物标记物MUC16。

[0020] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含SLC34A2多肽;和至少一种靶生物标记物FOLR1。

[0021] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和CLDN6。

[0022] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和CLDN3。

[0023] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物FOLR1和CLDN3。

[0024] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和FOLR1。

[0025] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少一种靶生物标记物FOLR1。

[0026] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和MUC16。

[0027] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和FOLR1。

[0028] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和AQP5。

[0029] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含MUC16多肽;和至少两种靶生物标记物FOLR1和AQP5。

[0030] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少一种靶生物标记物MUC16。

[0031] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少一种靶生物标记物FOLR1。

[0032] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物FOLR1和CLDN6。

[0033] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和CLDN3。

[0034] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和FOLR1。

[0035] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和CLDN3。

[0036] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和MUC16。

[0037] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物FOLR1和CLDN3。

[0038] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含FOLR1多肽;和至少两种靶生物标记物FOLR1和AQP5。

[0039] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含LRRTM1多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和MUC16。

[0040] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少一种靶生物标记物FOLR1。

[0041] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少一种靶生物标记物MUC16。

[0042] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少两种靶生物标记物SLC34A2和MUC16。

[0043] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和FOLR1。

[0044] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和CLDN3。

[0045] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽,其是或包含CLDN3多肽;和至少两种靶生物标记物MUC16和CLDN6。

[0046] 在一些实施方案中,用于本文所述的所提供的方法或测定中的参考阈值水平通过在来自非卵巢癌受试者群体的可比样品中观察到的表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平来确定。

[0047] 在一些实施方案中,可使用基于抗体的剂检测包含在靶生物标记物特征中的细胞外囊泡相关膜结合多肽。在一些实施方案中,可使用包含基于抗体的剂的捕获测定检测此种细胞外囊泡相关膜结合多肽。例如,在一些实施方案中,用于检测细胞外囊泡中细胞外囊泡相关膜结合多肽的存在的捕获测定可涉及使包含细胞外囊泡的血液来源的样品与针对此种细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获剂接触。在一些实施方案中,此种捕获剂可包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)的结合部分,所述结合部分可任选地缀合至固体基底。在不受限制的情况下,用于细胞外囊泡相关膜结合多肽的示例性捕获剂可以是或包含固体基底(例如,磁珠)和针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的结合部分(例如,抗体剂)。

[0048] 在一些实施方案中,可使用本领域已知的适当方法检测包括在靶生物标记物特征中的靶生物标记物,所述适当方法可随着待检测分析物的类型(例如,表面蛋白、囊泡内蛋白、囊泡内RNA(例如,mRNA))而变化。例如,阅读本公开的本领域技术人员将理解,在一些实施方案中可使用基于抗体的剂来检测表面蛋白生物标记物和/或囊泡内蛋白生物标记物,而在一些实施方案中,可使用基于核酸的剂(例如,使用定量逆转录PCR)检测囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物。

[0049] 例如,在靶生物标记物是或包含表面蛋白生物标记物和/或囊泡内蛋白标记物的一些实施方案中,可例如在捕获测定(例如,如本文所述的那些)捕获表达细胞外囊泡相关膜结合多肽的细胞外囊泡(例如,如本文使用和/或描述的那些)之后涉及邻近连接测定来

检测此种靶生物标记物。在一些实施方案中,此种邻近连接测定可包括使包含细胞外囊泡的血液来源的样品与一组检测探针接触,每个检测探针针对靶生物标记物,所述组包含至少两个不同的检测探针,使得产生包含所述细胞外囊泡和所述检测探针组的组合,其中所述两个检测探针各自包含:(i) 针对表面蛋白生物标记物和/或囊泡内蛋白生物标记物的结合部分;以及(ii) 偶联至所述结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分。所述检测探针的此类单链悬突部分的特征在于它们在所述检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交。然后将包含所述细胞外囊泡和所述检测探针组的此种组合保持在允许所述检测探针组与其在所述细胞外囊泡上的相应靶标结合的条件下,使得所述检测探针可结合至相同的细胞外囊泡以形成双链复合物。此种双链复合物可通过使双链复合物与核酸连接酶接触产生连接模板;并检测连接模板来检测。此种连接模板的存在指示对卵巢癌的靶生物标记物特征呈阳性的细胞外囊泡的存在。虽然此种邻近连接测定可以执行得更好,例如具有比其他现有邻近连接测定更高的特异性和/或灵敏度,但阅读本公开的本领域技术人员将理解,可替代地使用本领域已知的其他形式的邻近连接测定。

[0050] 在靶生物标记物是或包含囊泡内RNA(例如,mRNA)标记物的一些实施方案中,可涉及核酸检测测定来检测此种靶生物标记物。在一些实施方案中,示例性核酸检测测定可以是或包括逆转录PCR。

[0051] 在靶生物标记物是或包含囊泡内生物标记物(例如,囊泡内蛋白生物标记物和/或囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物)的一些实施方案中,可在检测测定(例如,如本文所述的邻近连接测定)之前涉及样品处理(例如,固定和/或透化)使用于随后检测的一种或多种囊泡内生物标记物暴露来检测此种靶生物标记物。

[0052] 本公开尤其认识到,基于批量样品(例如,细胞外囊泡的批量样品)而不是以单个细胞外囊泡的分辨率对单个卵巢癌相关血清蛋白或多个卵巢癌相关生物标记物的检测通常在确定从其获得样品的受试者是否可能患有或易患卵巢癌方面不能提供足够的特异性和/或灵敏度。本公开尤其提供了解决此种问题的技术(包括系统、组合物和/或方法),包括例如通过具体要求用于检测的个体细胞外囊泡的特征在于存在包含至少一种或多种细胞外囊泡相关膜结合多肽和至少一种或多种靶生物标记物的组合的靶生物标记物特征。在特定实施方案中,本公开教导了要求此类个体细胞外囊泡的特征在于存在(例如,通过表达)卵巢癌的此种靶生物标记物特征的技术,而不包含靶生物标记物特征的细胞外囊泡不产生可检测信号(例如,高于参考水平,例如至少10%或更多,其中在一些实施方案中,参考水平可以是在阴性对照样品(诸如其中不存在包含这种靶生物标记物特征的个体细胞外囊泡的样品)中观察到的水平)。

[0053] 因此,在一些实施方案中,本文提供的技术可用于检测受试者和/或整个受试者群体中卵巢癌的发病或复发。在一些实施方案中,可选择靶生物标记物特征用于检测卵巢癌。在一些实施方案中,可选择靶生物标记物特征用于检测特定类别的卵巢癌,包括但不限于例如高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌卵巢癌和/或粘液性卵巢癌。在一些实施方案中,本文提供的技术可定期(例如,每年)用于筛查人类受试者或整个人类受试者群体的早期卵巢癌或卵巢癌复发。

[0054] 在一些实施方案中,适用本文提供的用于检测卵巢癌的发病或复发的技术的受试

者可以是对无症状人类受试者和/或整个无症状群体。此种无症状受试者可以是具有卵巢癌家族史的受试者、具有使他们处于卵巢癌风险增加的生活史的受试者、绝经后的受试者、先前接受过卵巢癌治疗的受试者、在卵巢癌治疗后处于卵巢癌复发风险的受试者、在卵巢癌治疗后有所缓解的受试者和/或先前或定期接受筛查的存在至少一种卵巢癌生物标记物(例如但不限于CA-125血清蛋白)的受试者。在一些实施方案中,此种无症状受试者可以是确定具有正常血清CA-125水平(例如,低于35U/mL的血清CA-125水平)的受试者。在一些实施方案中,此种无症状受试者可以是确定具有等于或高于正常血清CA-125水平的血清CA-125水平的受试者。替代地,在一些实施方案中,无症状受试者可以是先前未经卵巢癌筛查的受试者、未诊断为卵巢癌的受试者和/或先前未接受卵巢癌治疗的受试者。

[0055] 在一些实施方案中,可基于一种或多种特征(诸如年龄、种族、遗传史、个人史和/或病史(例如,吸烟、酒精、药物、致癌剂、饮食、肥胖、糖尿病、体力活动、光暴露、放射暴露、会阴滑石粉使用、激素替代疗法(HRT)、暴露于诸如病毒的感染性因子和/或职业危害))来选择受试者或受试者群体。

[0056] 在一些实施方案中,本文提供的技术可用于选择针对患有或易患卵巢癌的受试者的疗法。在一些实施方案中,可根据基于本文提供的技术的发现来选择卵巢癌疗法和/或辅助疗法。

[0057] 在一些实施方案中,本文提供的技术可用于监测和/或评估施用于受试者(例如,卵巢癌受试者)的疗法的功效。

[0058] 在一些实施方案中,本公开提供了用于管理患者护理的技术,以用于例如一个或多个个体受试者和/或整个受试者群体。仅举几个实例,在一些实施方案中,本公开提供了可用于筛查(例如,临时或偶然动机的筛查和/或非临时或偶然动机的筛查,例如周期性筛查,诸如年度、半年、两年或以某种其他频率)的技术。例如,在一些实施方案中,所提供的用于临时动机筛查的技术可用于筛查超过某个年龄(例如,超过50、55、60、65、70岁或以上)的一个或多个个体受试者或整个受试者(例如,无症状受试者)群体。在一些实施方案中,所提供的用于偶然动机筛查的技术可用于筛查可能经历了促使筛查如本文所述的卵巢癌的事故或事件的个体受试者。例如,在一些实施方案中,与确定癌症或其易患性的一个或多个指标有关的偶然动机可以是或包括例如基于他们的家族史的事故(例如,近亲诸如血缘亲属先前被诊断为卵巢癌);鉴定与卵巢癌相关的一个或多个风险因素(例如,生活史风险因素,包括但不限于例如吸烟、酒精、饮食、肥胖、职业危害等)和/或遗传测试(例如基因组测序)和/或影像诊断测试(例如超声、计算机断层扫描(CT)和/或磁共振成像(MRI)扫描)的先前偶然发现;发展具有卵巢癌特征的一种或多种体征或症状(例如,可能指示卵巢癌的妇女经期之间异常出血等)。

[0059] 在一些实施方案中,所提供的用于管理患者护理的技术可通知治疗和/或支付(例如,治疗的报销)决定和/或行动。例如,在一些实施方案中,所提供的技术可提供对个体受试者是否具有卵巢癌的发病或复发的一个或多个指标的确定,从而通知医师和/或患者何时根据此类发现开始治疗。另外或替代地,在一些实施方案中,所提供的技术可例如基于特定反应性生物标记物(例如,卵巢癌反应性生物标记物)的发现来通知医师和/或患者治疗选择。在一些实施方案中,所提供的技术可例如基于与卵巢癌相关的一个或多个分子靶标水平的变化的发现来提供对个体受试者是否对当前治疗有反应的确定,从而通知医师和/

或患者此类治疗的功效和/或根据此类发现保持或改变治疗的决定。

[0060] 在一些实施方案中,所提供的技术可通知关于健康保险提供者是否报销(或不报销)例如以下的决定:(1) 筛查本身(例如,报销仅可用于周期性/定期筛查或仅可用于临时和/或偶然动机的筛查);和/或(2) 根据所提供的技术的发现开始、保持和/或改变治疗。例如,在一些实施方案中,本公开提供了与以下有关的方法:(a) 接收如本文所述的筛查结果,并且还接收对筛查和/或特定治疗方案的报销请求;(b) 如果根据适当的时间表或对相关事故的反应对受试者进行筛查,则批准报销筛查;和/或如果治疗方案根据接收的筛查结果代表适当治疗,则批准治疗的报销方案;以及任选地(c) 实现报销或提供报销被拒绝的通知。在一些实施方案中,如果接收的筛查结果检测到代表相关治疗方案的批准的生物标记物(例如,如可能在处方信息标签和/或通过批准的伴随诊断中所述的生物标记物),则根据接收的筛查结果,治疗方案是适当的。替代地或另外,本公开设想允许或促进如本文所述的筛查结果和/或报销决定的报告和/或处理的报告系统(例如,通过一个或多个适当的电子装置和/或一个或多个通信系统实施)。

[0061] 本文提供的一些方面涉及用于所提供的技术的系统和试剂盒。在一些实施方案中,系统或试剂盒可包含针对卵巢癌的肿瘤生物标记物特征的检测剂(例如,本文所述的那些)。在一些实施方案中,此类系统或试剂盒可包含针对存在于与卵巢癌相关的细胞外囊泡(例如,本文使用和/或描述的那些)中的细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获剂;和针对卵巢癌的靶生物标记物特征的一种或多种靶生物标记物的至少一种或多种检测剂,所述靶生物标记物可以是或包含另外的一种或多种表面蛋白生物标记物(例如,如本文使用和/或描述的那些)、一种或多种囊泡内蛋白质生物标记物(例如,如本文使用和/或描述的那些),和/或一种或多种囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物(例如,如本文使用和/或描述的那些)。

[0062] 在一些实施方案中,包括在系统和/或试剂盒中的捕获剂可包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)的结合部分。在一些实施方案中,此种结合部分可缀合至固体基底,其在一些实施方案中可以是或包含固体基底。在一些实施方案中,此种固体基底可以是或包含磁珠。在一些实施方案中,包括在所提供的系统和/或试剂盒中的示例性捕获剂可以是或包含固体基底(例如,磁珠)和针对与其缀合的细胞外囊泡相关膜结合多肽的抗体剂。

[0063] 在靶生物标记物包括表面蛋白生物标记物和/或囊泡内蛋白生物标记物的一些实施方案中,系统和/或试剂盒可包括用于进行邻近连接测定的检测剂(例如,如本文所述的检测剂)。在一些实施方案中,用于进行邻近连接测定的此类检测剂可包含一组检测探针,每个检测探针针对靶生物标记物特征的靶生物标记物,所述组包含至少两个检测探针,其中所述两个检测探针各自包含:(i) 针对靶生物标记物的多肽结合部分;以及(ii) 偶联至所述结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,其中所述检测探针的所述单链悬突部分的特征在于它们在所述检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交。

[0064] 在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含多个(例如,2、3、4、5个或更多个)检测探针组,其中每组包含两个或更多个(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)检测探针。在一些实施方案中,至少一组检测探针可针对卵巢癌的检测。例如,在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含用于检测卵巢癌

的至少一组检测探针和用于检测不同癌症(例如,胰腺癌)的至少一组检测探针。在一些实施方案中,两种或更多种检测探针可针对不同类别的卵巢癌,例如高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌或粘液性卵巢癌。在一些实施方案中,两组或更多组可针对不同阶段的卵巢癌的检测。在一些实施方案中,两组或更多组可针对相同阶段的卵巢癌的检测。

[0065] 在一些实施方案中,所提供的试剂盒中的检测探针可作为容器中的单一混合物提供。在一些实施方案中,多组检测探针可作为独立容器中的单独混合物提供。在一些实施方案中,每个检测探针在独立容器中单独地提供。

[0066] 在靶生物标记物包括囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物的一些实施方案中,此种系统和/或试剂盒可包含用于进行核酸检测测定的检测剂。在一些实施方案中,此种系统和/或试剂盒可包含用于进行定量逆转录PCR的检测剂,例如,所述定量逆转录PCR可包含针对一个或多个囊泡内RNA(例如,mRNA)靶标的引物。

[0067] 在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含至少一种化学试剂,以例如处理样品和/或其中的细胞外囊泡。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含至少一种化学试剂以处理样品中的细胞外囊泡,所述化学试剂包括但不限于例如固定剂、透化剂和/或封闭剂。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含核酸连接酶和/或核酸聚合酶。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含一个或多个引物和/或探针。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含一对或多对引物,例如用于PCR,例如定量PCR(qPCR)反应。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含一个或多个探针,例如像在一些实施方案中可被设计为增加qPCR的特异性的水解探针(例如,TaqMan探针)。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可包含一个或多个多路复用探针,例如当采用同时或并行qPCR反应时可能是有用的(例如,以促进或改进读出)。

[0068] 在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于筛查(例如,定期筛查)和/或个体(例如,无症状或有症状受试者)的其他评估以检测(例如,早期检测)卵巢癌。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于筛查和/或易患卵巢癌的个体(例如,具有已知遗传、环境或经验风险等的个体)的其他评估。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于监测先前接受过治疗的受试者的卵巢癌的复发。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可结合用于患有卵巢癌的受试者的疗法用作伴随诊断。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于监测或评估施用于患有卵巢癌的受试者的疗法的功效。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于为患有卵巢癌的受试者选择疗法。在一些实施方案中,所提供的系统和/或试剂盒可用于为具有与卵巢癌相关的一种或多种症状(例如,非特异性症状)的受试者做出治疗决定和/或选择疗法。

[0069] 通过进行本文所述的方法和/或使用本文所述的系统和/或试剂盒形成的复合物也在本公开的范围。例如,在一些实施方案中,复合物包含:(a)表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡,其中至少两种细胞外囊泡包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物,和囊泡内RNA生物标记物,其中所述表面蛋白生物标记物选自AQP5、CDH6、CHODL、CLDN3、CLDN6、CLDN16、EpCAM、FOLR1、HTR3A、LEMD1、LRRTM1、MUC16、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、

NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合；所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合；并且所述囊泡内RNA（例如mRNA）生物标记物选自CLDN6、CRABP2、KLK7、MIF、PRAME、S100A1及其组合，其中所述细胞外囊泡固定在包含针对此种细胞外囊泡相关膜结合多肽的结合部分的固体基底上。此种复合物还包含针对存在于细胞外囊泡中的靶生物标记物特征的至少一个靶生物标记物的至少两个检测探针，其中每个检测探针结合到此种靶生物标记物，并且各自包含：(i) 针对所述靶生物标记物的结合；以及(ii) 偶联至所述结合部分的寡核苷酸结构域，所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从所述寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分，其中所述检测探针的所述单链悬突部分彼此杂交。

[0070] 在一些实施方案中，存在于形成复合物的细胞外囊泡中的细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物可包含AQP5、CDH6、CHOLD、CLDN3、CLDN6、CLDN16、EpCAM、FOLR1、HTR3A、LEMD1、LRRTM1、MUC16、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A中的一种或多种及其组合。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含SLC34A2多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MUC16多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含CLDN6多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含FOLR1多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含LRRTM1多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含TACSTD2多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MUC1多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含sTn多肽糖基化。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含MSLN多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含ALPL多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含BST2多肽。在一些实施方案中，此种细胞外囊泡相关膜结合多肽可以是或包含CLDN3多肽。

[0071] 下文和权利要求书中更详细地描述本公开所涵盖的这些和其他方面。

## 附图说明

[0072] 图1是说明剖析个体细胞外囊泡(EV)的示例性工作流程的示意图。所述图示出了使用尺寸排阻色谱法(SEC)从血浆中纯化EV和免疫亲和捕获显示出特定膜结合蛋白标记物的EV(图A)；使用根据本文所述的一些实施方案的靶实体检测测定检测捕获的EV上的共定位靶标记物(例如，囊泡内蛋白质或表面蛋白质)(图B)。

[0073] 图2是说明根据本文所述的一些实施方案的靶实体检测测定的示意图。在一些实施方案中，靶实体检测测定使用检测探针的组合，所述组合对癌症的检测具有特异性。在一些实施方案中，将包括针对靶蛋白1(例如，癌症标记物1)的第一检测探针和针对靶蛋白2(例如，癌症标记物2)的第二检测探针的双链体系添加到包含生物实体(例如，细胞外囊泡)的样品中。在一些实施方案中，检测探针各自包含偶联至寡核苷酸结构域的靶结合部分(例如，针对靶蛋白的抗体剂)，所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突。当第一检测探针和第二检测探针的不同靶结合部分(例如，分别针对靶蛋白1和靶蛋白2的抗体剂)紧密接近同一生物实体(例如，细胞外囊泡)定位使得相应的

单链悬突彼此杂交,从而允许它们的寡核苷酸结构域发生连接时,产生检测信号。例如,对照实体(例如,来自健康受试者样品的生物实体)不表达靶蛋白1(例如,癌症标记物1)和靶蛋白2(例如,癌症标记物2)中的一个或两个,因此不能产生信号检测。然而,当来自癌症(例如,卵巢癌)样品的生物实体表达靶蛋白1和靶蛋白2,并且靶蛋白以彼此足够短的距离存在于同一生物实体(例如,细胞外囊泡)中时,产生检测信号。

[0074] 图3示出了在不同细胞系衍生的细胞外囊泡样品中,来自例如使用图1或2中所示的测定的连接样品的qPCR检测的实验数据。在一些实施方案中,靶实体检测测定包括用于捕获基于SLC34A2标记物的细胞外囊泡的剂(“SLC34A2捕获”)以及例如涉及至少两个检测探针的示例性双链体系统,每个检测探针包含偶联至不同的寡核苷酸结构域的MUC16结合部分(例如,抗MUC16抗体),所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突(“MUC16+MUC16抗体探针”)。图A示出了对卵巢癌细胞系EV(阳性细胞系)与非卵巢癌细胞系EV(阴性细胞系)的检测进行比较的qPCR数据的图。图B示出了使用阴性对照细胞系(例如,非卵巢癌细胞系)作为基线的相应平均 $\Delta C_t$ 值。

[0075] 图4是一组示出了卵巢囊腺癌(OC)患者血浆样品研究中包括的患者的入口统计的图。(图A)通过示例性测定评估的女性患者群组的年龄和群组规模概述。(图B)来自良性肿块患者的女性血浆样品的年龄和群组规模概述。

[0076] 图5是一组示出了患者年龄与来自卵巢癌患者(图A)和良性肿块患者(图B)的样品中的CA-125水平的相关性的图。

[0077] 图6是按照主要卵巢癌亚型示出了卵巢癌患病率的饼图。“其他”是指无法分类为单一亚型的混合癌或移行癌。参见,例如,Gilks等人,2008,塞德曼等人,2003,2004,出于本文所述的目的和附加信息,它们各自以引用方式整体并入本文。

[0078] 图7是一组示出用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获器的双链体系统(例如,如图1或2中所述)的卵巢癌的示例性测定的性能的图。图A是指来自各种卵巢癌亚型的综合数据。图B示出了在两个不同截止值处对最常见的卵巢癌亚型即高级别浆液性卵巢癌的良好检测。截止值1与99.8%的特异性有关,并且截止值2与98%的特异性有关。对于指定的截止值,显示了对所注卵巢癌阶段的相应灵敏度。

[0079] 图8是示出用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获器的双链体系统(例如,如图1或2中所述)的子宫内膜样卵巢癌的示例性测定的性能的图。它示出了在两个不同截止值处对第二常见的卵巢癌亚型即子宫内膜样卵巢癌的良好检测。截止值1与99.8%的特异性有关,并且截止值2与98%的特异性有关。

[0080] 图9是示出在两个不同截止值处用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获的双链体系统(例如,如图1中所述)的低级别浆液性卵巢癌的示例性测定的性能的图。截止值1与99.8%的特异性有关,并且截止值2与98%的特异性有关。

[0081] 图10是示出在两个不同截止值处用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获的双链体系统(例如,如图1或2中所述)的透明细胞卵巢癌的示例性测定的性能的图。截止值1与99.8%的特异性有关,并且截止值2与98%的特异性有关。

[0082] 图11是示出在两个不同截止值处用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获的双链体系统(例如,如图1或2中所述)的粘液性卵巢癌的示例性测定的性能的图。截止值1与99.8%的特异性有关,并且截止值2与98%的特异性有关。

[0083] 图12示出了相对于血清CA-125水平的用于检测涉及基于具有MUC16+MUC16抗体探针的SLC34A2捕获的双链体系统(例如,如图1或2中所述)的卵巢癌亚型的示例性测定的读出。图A示出了在测定信号和血清CA-125水平之间没有观察到相关性。通过将正态分布拟合到健康对照患者群体的Ct值(通过示例性测定获得)并取此分布的平均值加上2.879个标准差,得到截止值1,其中所有健康患者中的99.8%的Ct值将在截止值1之上。图B是用于使用与图A中所示的血清CA-125值相对的从图A中所示的示例性测定确定的Ct值来区分卵巢癌患者和良性妇科肿瘤患者(图4A中描述的患者群组)的接受者操作特征(ROC)曲线。良性妇科肿瘤包括,例如,子宫内膜样囊肿、卵泡囊肿、粘液性囊腺瘤、成熟畸胎瘤、平滑肌瘤和浆液性囊腺瘤。此外,评估了几种卵巢癌亚型,包括高级别浆液性、低级别浆液性、粘液性、子宫内膜样和透明细胞样。

[0084] 图13是一组示出了与当前护理标准(血清CA-125和经阴道超声(TVUS))相比,用于检测阶段I和II高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)的示例性测定的性能的数据。对特异性(图A和D)、灵敏度(图B和E)和阳性预测值(图C和F)进行比较,以筛查处于HGSOC的遗传风险(图A、B和C)和平均风险(图D、E和F)的妇女。在一些情况下,处于遗传风险和平均风险的妇女的患病率分别为1%和0.057%。血清CA-125和TVUS的性能参数取自Buys等人,2011,出于本文所述的目的,所述文献以引用方式并入本文。

[0085] 图14是一组示出了检测来自相对于阴性对照细胞系的卵巢癌细胞系的EV中的MIF mRNA的图。(图A)使用RT-qPCR检测批量EV中的MIF mRNA。(图B)与批量EV相比,检测使用抗EpCAM功能化珠捕获的EV中的MIF mRNA。

[0086] 图15是说明根据本文所述的一些实施方案的靶实体检测测定的示意图。所述图示出了示例性三链体靶实体检测系统,其中在一些实施方案中,可将三个或更多个检测探针(每个针对靶蛋白)添加到包含生物实体(例如,细胞外囊泡)的样品中。在一些实施方案中,检测探针各自包含偶联至寡核苷酸结构域的靶结合部分(例如,针对靶蛋白的抗体剂),所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突。当所有三个或更多个检测探针的相应单链悬突彼此杂交以形成线性双链复合物,并且双链复合物的至少一条链发生连接时,产生检测信号,从而允许检测所得的连接产物。

[0087] 图16是包含四个检测探针的双链复合物的非限制性实例,所述检测探针通过它们各自的单链悬突的杂交以线性排列彼此连接。

[0088] 图17是说明本文所述的示例性实施方案的靶实体检测测定的示意图。在一些实施方案中,将多个检测探针(每个针对不同的靶标)添加到包含生物实体(例如,细胞外囊泡)的样品中。在一些实施方案中,检测探针各自包含偶联至寡核苷酸结构域的靶结合部分(例如,抗体剂),所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突。当所有检测探针都紧密接近同一生物实体(例如,细胞外囊泡或分析物)定位使得相应的单链悬突杂交以形成线性双链复合物,并且所得的线性双链复合物的至少一条链发生连接时,产生检测信号,从而允许检测连接产物。

[0089] 图18描绘了442个卵巢癌样品(I/II期和III/IV期)中相对于所有17,382个健康组织样品的四种示例性表面蛋白生物标记物的转录物表达,其中包括(图A)SLC34A2、(图B)MUC16、(图C)FOLR1,和(图D)CLDN6。

[0090] 图19描绘了两种示例性正交生物标记物组合的性能。图18中注明的转录物表达截

止值应用于(图A) SLC34A2+MUC16和(图B) FOLR1+CLDN6,所述截止值分别将71%和75%的卵巢癌样品从超过99.9%的健康组织样品中区分开来。(图C) 维恩图示出当使用如图A和B中所示的两种生物标记物组合来表征癌症患者样品时,识别出的卵巢癌患者的百分比高于截止值(91%)。这示出了使用两种或更多种生物标记物组合可增加卵巢癌检测测定的灵敏度(例如,如本文所述)。

[0091] 图20描绘了初步生物标记物组合结果。(图A) 描述了混合健康血浆和混合卵巢癌血浆样品中初步生物标记物组合筛查(筛查了112种组合)的结果。每个数据点代表一个独特的生物标记物组合,红色数据点在图B中示出。(图B) 七种示例性生物标记物组合的混合健康血浆和混合卵巢癌血浆之间的测定信号差异。

[0092] 图21描述了多个正交生物标记物组合的使用以及测定灵敏度的相关改进。组合1 (SLC34A2捕获,MUC16+MUC16 pliq-PCR检测探针读出) 和组合2 (SLC34A2捕获,FOLR1+FOLR1 pliq-PCR检测探针读出) 分别能够区分卵巢癌群体与健康对照和良性肿瘤群组。两个截止值均设置为达到99.5%的特异性。

[0093] 图22描绘了本文描述的示例性测定的性能,所述测定涉及区分对照受试者(例如,健康妇女受试者和/或患有良性妇科肿瘤和/或炎症病状(包括例如克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的受试者)和卵巢癌患者的个体示例性生物标记物组合。示例性个体生物标记物组合包括:

| [0094] | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|--------|---------|----------|----------|
|        | SLC34A2 | MUC16    | MUC16    |
|        | SLC34A2 | FOLR1    | FOLR1    |
|        | SLC34A2 | MUC16    | FOLR1    |
|        | MUC16   | MUC16    | MUC16    |
|        | MUC16   | MUC16    | FOLR1    |
|        | MUC16   | MUC16    | CLDN3    |
|        | MUC16   | FOLR1    | CLDN3    |
|        | MUC16   | MUC16    | CLDN6    |
|        | MUC16   | FOLR1    | FOLR1    |
|        | LRRTM1  | MUC16    | MUC16    |

[0095] 图23描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对SLC34A2的捕获剂和一组至少两个各自针对MUC16的检测探针)。通过选择(i) 偏离健康对照受试者和患有炎症病状的受试者的平均值2.93个标准差(例如,排除分布中99.83%的健康受试者)或(ii) 来自健康对照受试者的最大测定信号中限制性较小的来确定截止值。在一些实施方案中,与健康对照受试者和/或患有炎症病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的受试者相比,良性卵巢肿瘤样品可能较少关注脱靶信号。因此,在一些此种实施方式中,可能不包括良性卵巢肿瘤样品以确定截止值。

[0096] 图24描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0097] 图25描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合

(例如,针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0098] 图26描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对MUC16的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0099] 图27描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0100] 图28描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0101] 图29描绘了本文所述的示例性测定的性能,每个测定都涉及示例性生物标记物组合。(图A)针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对MUC16的第二检测探针;(图B)针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针;(图C)针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针。

[0102] 图30描绘了涉及示例性生物标记物组合的示例性测定(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)可检测有正常血清CA-125(例如,低于35U/mL)的卵巢癌患者,并且可区分许多有升高的血清CA-125的非卵巢癌患者(例如患有良性妇科肿瘤的患者)和卵巢癌患者。

[0103] 图31描绘了涉及示例性生物标记物组合的示例性测定(例如,针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对MUC16的第二检测探针)可检测有正常血清CA-125(例如,低于35U/mL)的卵巢癌患者,并且可区分许多有升高的血清CA-125的非卵巢癌患者(例如患有良性妇科肿瘤的患者)和卵巢癌患者。

[0104] 图32描绘了涉及示例性生物标记物组合的示例性测定(例如,针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针)可检测有正常血清CA-125(例如,低于35U/mL)的卵巢癌患者,并且可区分许多有升高的血清CA-125的非卵巢癌患者(例如患有良性妇科肿瘤的患者)和卵巢癌患者。

[0105] 图33描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对CLDN3的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0106] 图34描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对CLDN6的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0107] 图35描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对MUC16的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对CLDN3的第二检测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0108] 图36描绘了本文所述的示例性测定的性能,所述测定涉及示例性生物标记物组合(例如,针对LRRTM1的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对MUC16的第二检

测探针)。如图23中所述确定截止值。

[0109] 图37描绘了用于区分I-IV期卵巢癌患者和健康患者的一系列接受者操作特征(ROC)曲线。使用由分别在图23-28和图33-36中所示的示例性测定确定的Ct值生成曲线。(图A)描绘了当使用SLC34A2捕获探针和MUC16+MUC16 pliq-PCR检测探针时曲线下面积(AUC)为0.92的示例性ROC曲线,(图B)描绘了当使用SLC34A2捕获探针和FOLR1+FOLR1 pliq-PCR检测探针时AUC为0.87的示例性ROC曲线,(图C)描绘了当使用SLC34A2捕获探针和MUC16+FOLR1 pliq-PCR检测探针时AUC为0.90的示例性ROC曲线,(图D)描绘了当使用MUC16捕获探针和MUC16+MUC16pliq-PCR检测探针时AUC为0.91的示例性ROC曲线,(图E)描绘了当使用MUC16捕获探针和MUC16+FOLR1 pliq-PCR检测探针时AUC为0.91的示例性ROC曲线,(图F)描绘了当使用MUC16捕获探针和MUC16+CLDN3 pliq-PCR检测探针时AUC为0.84的示例性ROC曲线,(图G)描绘了当使用MUC16捕获探针和MUC16+CLDN6 pliq-PCR检测探针时AUC为0.90的示例性ROC曲线,(图H)描绘了当使用MUC16捕获探针和FOLR1+FOLR1 pliq-PCR检测探针时AUC为0.90的示例性ROC曲线,(图I)描绘了当使用MUC16捕获探针和FOLR1+CLDN3 pliq-PCR检测探针时AUC为0.67的示例性ROC曲线,(图J)描绘了当使用LRRTM1捕获探针和MUC16+MUC16pliq-PCR检测探针时AUC为0.78的示例性ROC曲线。

[0110] 图38描述了多个正交生物标记物特征组合的使用以及测定灵敏度中的相关改进。组合1(SLC34A2捕获探针,以及MUC16+MUC16 pliq-PCR检测探针)和组合2(MUC16捕获探针,以及MUC16+FOLR1 pliq-PCR检测探针)分别能够区分卵巢癌群体与健康对照和良性肿瘤群组。两个截止值均设置为达到99.5%的特异性。

[0111] 图39描述了多个正交生物标记物特征组合的使用以及测定灵敏度中的相关改进。组合1(SLC34A2捕获探针,以及FOLR1+FOLR1 pliq-PCR检测探针)和组合2(MUC16捕获探针,以及MUC16+FOLR1 pliq-PCR检测探针)分别能够区分卵巢癌群体与健康对照和良性肿瘤群组。两个截止值均设置为达到99.5%的特异性。

[0112] 某些定义

[0113] 施用:如本文所用,术语“施用(administering/administration)”通常是指将组合物施用于受试者,以实现将是组合物或包含在组合物中的剂递送到靶位点或待治疗的位点。本领域普通技术人员将了解在适当的情况下可用于施用于受试者(例如人)的多种途径。例如,在一些实施方案中,施用可为胃肠外的。在一些实施方案中,施用可为口服的。在一些实施方案中,施用可仅涉及单剂量。在一些实施方案中,施用可涉及应用固定数量的剂量。在一些实施方案中,施用可涉及间歇性(例如,在时间上分开的多个剂量)和/或周期性(例如,由相同的时间段分开的单独剂量)给药的给药。在一些实施方案中,施用可涉及连续给药(例如,灌注)至少一段选定的时间。

[0114] 扩增:术语“扩增(amplification和amplify)”是指导致核酸分子的量和/或水平相对于其初始量和/或水平增加的模板依赖性过程。模板依赖性过程一般是涉及引物分子的模板依赖性延伸的过程,其中新合成的核酸链的序列由众所周知的互补碱基配对规则决定(参见例如,Watson,J.D.等人于:Molecular Biology of the Gene,第4版,W.A.Benjamin,Inc.,Menlo Park,Calif.(1987),出于本文所述的目的,所述文献以引用方式并入本文)。

[0115] 抗体剂:如本文所用,术语“抗体剂”是指与特定抗原特异性结合的剂。在一些实施

方案中,术语涵盖包括足以赋予特异性结合的免疫球蛋白结构元件的任何多肽或多肽复合物。示例性抗体剂包括但不限于单克隆抗体或多克隆抗体。在一些实施方案中,抗体剂可包括作为小鼠、兔、灵长类动物或人抗体特征的一个或多个恒定区序列。在一些实施方案中,抗体剂可包括如本领域已知的人源化、灵长类化、嵌合等的一个或多个序列元件。在许多实施方案中,术语“抗体剂”用于指用于在替代呈现中利用抗体结构和功能特征的本领域已知或开发的构建体或形式中的一种或多种。例如,实施方案中,根据本发明使用的抗体剂的形式选自但不限于完整的IgA、IgG、IgE或IgM抗体;双特异性抗体或多特异性抗体(例如,Zybodies®等);抗体片段,诸如Fab片段、Fab'片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、Fd'片段、Fd片段和分离的互补决定区(CDR)或其组;单链Fv;多肽-Fc融合;单结构域抗体(例如,鲨鱼单结构域抗体,诸如IgNAR或其片段);骆驼抗体;掩蔽抗体(例如,Probodies®);小模块免疫药物(“SMIPs<sup>TM</sup>”);单链或串联双抗体(TandAb®);VHH;Anticalins®;Nanobodies®微体;BiTE®;锚蛋白重复蛋白或DARPINs®;Avimers®;DART;TCR样抗体;Adnectins®;Affilins®;Trans-bodies®;Affibodies®;TrimerX®;微蛋白;Fynomers®、Centyrins®、KALBITOR®和Affimer®s。在一些实施方案中,抗体可能缺少在天然产生时具有的共价修饰(例如,聚糖的附接)。在一些实施方案中,抗体可含有共价修饰(例如,聚糖、有效载荷[例如,可检测部分、治疗部分、催化部分等]或其他侧基[例如,聚乙二醇等]的附着)。在许多实施方案中,抗体剂是或包含其氨基酸序列包括本领域技术人员识别为互补决定区(CDR)的一个或多个结构元件的多肽;在一些实施方案中,抗体剂是或包含其氨基酸序列包含与在参考抗体中发现的CDR基本相同的至少一个CDR(例如,至少一个重链CDR和/或至少一个轻链CDR)的多肽。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为它示出与参考CDR至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为它示出与参考CDR至少95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为它示出与参考CDR至少95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为与参考CDR相比,所包括的CDR内的至少一个氨基酸被删除、添加或取代,但是所包括的CDR具有与参考CDR的氨基酸序列以其他方式相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为与参考CDR相比,所包括的CDR内的1-5个氨基酸被删除、添加或取代,但是所包括的CDR具有与参考CDR以其他方式相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为与参考CDR相比,所包括的CDR内的至少一个氨基酸被取代,但是所包括的CDR具有与参考CDR的氨基酸序列以其他方式相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所包括的CDR与参考CDR基本相同,因为与参考CDR相比,所包括的CDR内的1-5个氨基酸被删除、添加或取代,但是所包括的CDR具有与参考CDR以其他方式相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体剂是或包含其氨基酸序列包括本领域技术人员识别为免疫球蛋白可变结构域的结构元件的多肽。在一些实施方案中,抗体剂是具有与免疫球蛋白结合结构域同源或大体同源的结合结构域的多肽蛋白。

[0116] 技术人员可使用本领域已知的方法和可商购获得的服务和试剂盒来制备抗体剂。

例如,制备单克隆抗体的方法是本领域众所周知的,并且包括杂交瘤技术和噬菌体展示技术。适用于本公开的其他抗体描述于例如以下出版物中:Antibodies A Laboratory Manual,第二版.Edward A.Greenfield.Cold Spring Harbor Laboratory Press (2013年9月30日);Making and Using Antibodies:A Practical Handbook,第二版.编者Gary C.Howard和Matthew R.Kaser.CRC Press (2013年7月29日);Antibody Engineering:Methods and Protocols,第二版(Methods in Molecular Biology).Patrick Chames.Humana Press (2012年8月21日);Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology).编者Vincent Ossipow和Nicolas Fischer.Humana Press (2014年2月12日);和Human Monoclonal Antibodies:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology).Michael Steinitz.Humana Press (2013年9月30日)。

[0117] 抗体可通过标准技术产生,例如通过用适当的多肽或其一个或多个部分进行免疫,或通过使用噬菌体展示文库。如果需要多克隆抗体,则用带有一个或多个所需表位的免疫原性多肽对所选宿主动物(例如,小鼠、兔、山羊、马、鸡等)进行免疫,所述免疫原性多肽任选地半抗原化到另一多肽。根据宿主物种,可使用各种佐剂来增加免疫反应。此类佐剂包括但不限于弗氏、矿物凝胶(诸如氢氧化铝)和表面活性物质(诸如溶血卵磷脂、普洛尼克多元醇(pluronic polyol)、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚)。收集来自免疫动物的血清,并根据已知程序进行处理。如果含有针对所需表位的多克隆抗体的血清含有针对其他抗原的抗体,则可通过免疫亲和色谱法或本领域已知的任何其他方法来纯化多克隆抗体。用于生产和加工多克隆抗血清的技术是本领域众所周知的。

[0118] 大约或约:如本文所用,当应用于一个或多个关注的值时,术语“大约”或“约”是指与所述参考值类似的值。一般来讲,熟悉上下文的本领域技术人员将理解所述上下文中“约”或“大约”所涵盖的相关差异程度。例如,在一些实施方案中,术语“大约”或“约”可涵盖在参考值的25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围。

[0119] 适体:如本文所用,术语“适体”通常是指与特定靶分子(例如,表位)结合的核酸分子或肽分子。在一些实施方案中,核酸适体可由核苷酸序列描述,并且长度通常为约15-60个核苷酸。核酸适体可以是或包含单链和/或双链结构。在一些实施方案中,核酸适体可以是或包含DNA。在一些实施方案中,核酸适体可以是或包含RNA。不希望受任何理论束缚,设想适体中的核苷酸链形成分子内相互作用,所述分子内相互作用将分子折叠成复杂的三维形状,并且此三维形状允许适体与其靶分子的表面紧密结合。在一些实施方案中,肽适体可被描述为具有由蛋白质支架展示的一个或多个可变序列肽环。肽适体可从组合文库中分离出来,并且通常随后通过定向突变或多轮可变区诱变和选择进行改进。鉴于存在于所有可能的核苷酸和/或肽序列的范畴中的分子形状的非凡多样性,可获得用于广泛分子靶标的适体,包括蛋白质和小分子。除了高特异性之外,适体通常对其靶标具有非常高的亲和力(例如,对于蛋白质或多肽的亲和力在皮摩尔至低纳摩尔范围内)。因为适体通常是合成分子,所以适体适于进行各种修饰,这可以优化它们在特定应用中的功能。

[0120] 关联:如果一个事件或实体的存在、水平和/或形式与另一个事件或实体的存在、水平和/或形式相关,则两个事件或实体彼此“关联”,如本文所用的术语。例如,如果特定生

生物学现象(例如,特定生物标记物的表达)的存在与卵巢癌(例如,特定类型的卵巢癌和/或卵巢癌阶段)的发病和/或易患性(例如,在相关人群中)相关,则认为特定生物学现象与卵巢癌关联。

[0121] 生物实体:在适当的情况下,如本领域技术人员将从上下文中清楚的那样,术语“生物实体”可用于指存在于例如在一些实施方案中来源于或获自受试者的生物样品中的实体或组分,所述生物样品在一些实施方案中可以是或包含细胞或生物体,诸如动物或人,或在一些实施方案中可以是或包含生物组织或流体。在一些实施方案中,生物实体是或包含细胞或微生物,或其部分、提取物或组分(包括例如,由细胞或微生物分泌的细胞内组分和/或分子)。例如,在一些实施方案中,生物实体是或包含细胞。在一些实施方案中,生物实体是或包含细胞外囊泡。在一些实施方案中,生物实体是或包含生物分析物(例如,代谢物、碳水化合物、蛋白质或多肽、酶、脂质、细胞器、细胞因子、受体、配体及其任何组合)。在一些实施方案中,存在于样品中的生物实体处于天然状态(例如,蛋白质或多肽保持在天然存在的构象结构中)。在一些实施方案中,例如通过从样品中分离或来源于天然存在的生物实体来处理生物实体。例如,可用一种或多种化学剂处理生物实体,使得利用本文提供的技术进行检测更为理想。仅作为实例,生物实体可为与固定剂(例如但不限于甲醇和/或甲醛)接触以使存在于细胞或细胞外囊泡中的蛋白质和/或肽形成交联的细胞或细胞外囊泡。在一些实施方案中,生物实体呈分离的或纯的形式(例如,从体液样品(例如像血液、血清、血浆样品等)中分离)。在一些实施方案中,生物实体可存在于复杂基质(例如,体液样品(例如像血液、血清或血浆样品等))中。

[0122] 生物标记物:术语“生物标记物”通常是指其存在、水平、程度、类型和/或形式与特定的生物事件或关注的状态相关的实体、事件或特征,因此被认为是所述事件或状态的“标记物”。仅举几个实例,在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含针对特定疾病状态或针对特定疾病、病症或病状可能发展、发病或复发的可能性的标记物。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含针对特定疾病或治疗结果或其可能性的标记物。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含针对特定组织(例如但不限于脑、乳腺、结肠、卵巢和/或与女性生殖系统相关的其他组织、胰腺、前列腺和/或与男性生殖系统相关的其他组织、肝脏、肺和皮肤)的标记物。在一些实施方案中,针对特定组织的此种标记物可对健康组织具有特异性,对患病组织具有特异性,或在一些实施方案中可存在于正常健康组织和患病组织(例如,肿瘤)中;阅读本公开的本领域技术人员将理解每种此类生物标记物的适当上下文。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含癌症特异性标记物(例如,对特定癌症具有特异性的标记物)。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含非特异性癌症标记物(例如,存在于至少两种或更多种癌症中的标记物)。在一些实施方案中,非特异性癌症标记物可以是或包含针对癌症的通用标记物(例如,通常存在于癌症中的标记物,无论组织类型如何),或在一些实施方案中,针对特定组织(例如但不限于脑、乳腺、结肠、卵巢和/或与女性生殖系统相关的其他组织、胰腺、前列腺和/或与男性生殖系统相关的其他组织、肝脏、肺和皮肤)的癌症的标记物。因此,在一些实施方案中,生物标记物是预测性的;在一些实施方案中,生物标记物是预后的;在一些实施方案中,生物标记物是相关生物事件或关注的状态的诊断物。生物标记物可以是或包含任何化学类别的实体,并且可以是或包含实体的组合。例如,在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含核酸、多肽、脂质、碳水化合物、小分子、无机

剂(例如,金属或离子)或其组合。在一些实施方案中,生物标记物是或包含特定分子、复合物或结构的一部分;例如,在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含表位。在一些实施方案中,生物标记物是与卵巢癌关联的细胞外囊泡的表面标记物(例如,表面蛋白标记物)。在一些实施方案中,生物标记物是囊泡内的(例如,存在于细胞外囊泡内的蛋白质或RNA标记物)。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含遗传或表观遗传特征。在一些实施方案中,生物标记物可以是或包含基因表达特征。在一些实施方案中,适合根据本公开使用的“生物标记物”可指存在于靶标记物中的分子实体(例如,表位)的存在、水平和/或形式。例如,在一些实施方案中,作为分子实体(例如,表位)的两个或更多个“生物标记物”可存在于相同的靶标记物(例如,标记物蛋白,诸如存在于细胞外囊泡中的表面蛋白)上。

[0123] 血液来源的样品:如本文所用,术语“血液来源的样品”是指来源于有需要的受试者的血液样品(即,全血样品)的样品。血液来源的样品的实例包括但不限于血浆(包括例如新鲜冷冻血浆)、血清、血液部分、血浆部分、血清部分、包含红细胞(RBC)、血小板、白细胞等的血液部分,以及包括其部分的细胞裂解物(例如,细胞(诸如红细胞、白细胞等)可被收获并裂解以获得细胞裂解物)。在一些实施方案中,与本文所述的方法、系统和/或试剂盒一起使用的血液来源的样品是血浆样品。

[0124] 癌症:术语“癌症”在本文中一般用于指其中关注的组织的细胞表现出相对异常、不受控制和/或自主生长,使得它们表现出特征为细胞增殖显著失去控制的异常生长表型的疾病或病状。在一些实施方案中,癌症可包含癌前(例如,良性)、恶性、转移前、转移性和/或非转移性细胞。本公开提供了用于检测卵巢癌的技术。

[0125] 分类截止值:如本文所用,术语“分类截止值”是指例如通过在群体的两个或多个子集(例如,正常健康受试者和患有炎症病状的受试者与肺癌受试者)之间定义一条或多条分界线,用于预测受试者患疾病或病状(例如,肺癌)的风险的水平、值或分数,或一组值,或指标。在一些实施方案中,可参考本文所述的靶生物标记物特征的至少一个参考阈值水平(例如,参考截止值),任选地结合其他适当的变量,例如年龄、生活史相关风险因素、遗传因素、受试者的身体和/或医疗状况来确定分类截止值。在分类基于单一靶生物标记物特征(例如,如本文所述)的一些实施方案中,分类截止值可与单一靶生物标记物特征预先确定的参考阈值(例如,截止值)相同。在分类基于两个或更多个靶生物标记物特征的一些实施方案中,分类截止值可参考两个或更多个参考阈值(例如,截止值),每个参考阈值是针对相应的靶生物标记物特征单独预先确定的,并且任选地并入一个或多个适当的变量,例如年龄、生活史相关风险因素、遗传因素、受试者的身体和/或医疗状况。在一些实施方案中,可通过参考本文所述的靶生物标记物特征的至少一个参考阈值水平(例如,参考截止值),任选地结合其他适当的变量,例如年龄、生活史相关风险因素、遗传因素、受试者的身体和/或医疗状况的计算机算法介导的分析来确定分类截止值。

[0126] 紧密接近:如本文所用,术语“紧密接近”是指两个检测探针(例如,成对的两个检测探针)之间的距离足够近,使得预期检测探针之间的相互作用(例如,通过各自的寡核苷酸结构域)可能发生。例如,在一些实施方案中,当两个检测探针在特定条件下(例如,当检测探针结合到细胞外囊泡中的相应靶标时)彼此足够紧密接近时,它们在一段时间内彼此相互作用(例如,通过各自的寡核苷酸结构域)的概率为至少50%或更多,包括例如至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多。在一些实施方案中,当两个检测探针彼此足够

紧密接近时,它们之间的距离可在大约0.1-1000nm,或0.5-500nm,或1-250nm之间的范围内。在一些实施方案中,当两个检测探针彼此足够紧密接近时,它们之间的距离可在大约0.1-10nm之间或大约0.5-5nm之间的范围内。在一些实施方案中,当两个检测探针彼此足够紧密接近时,它们之间的距离可小于100nm或更短,包括例如小于90nm、小于80nm、小于70nm、小于60nm、小于50nm、小于40nm、小于30nm、小于20nm、小于10nm、小于5nm、小于1 nm或更短。在一些实施方案中,当两个检测探针彼此足够紧密接近时,它们之间的距离可在大约40-1000nm或40nm-500nm之间的范围内。

[0127] 相当为:如本文所用,术语“相当的”是指两种或更多种剂、实体、情况、条件组等,它们可能彼此不相同,但是足够类似以允许在它们之间进行比较,使得本领域技术人员将理解,可基于观察到的差异或类似性合理地得出结论。在一些实施方案中,可比较的条件组、环境、个体或群体的特征在于多个基本上相同的特征和一个或少量的不同特征。本领域普通技术人员将理解,在上下文中,在任何给定情况下,两种或更多种此类剂、实体、情况、条件组等被认为是相当的需要何种程度的同一性。例如,本领域普通技术人员将理解,当以足够数量和类型的基本相同的特征为特征时,环境、个体或群体组彼此可比,以保证合理结论,即在不同的环境、个体或群体组的情况下获得的结果或观察到的现象的差异是由那些变化的特征的变化引起或指示的。

[0128] 互补:如本文所用,术语“互补”用于指通过碱基配对规则相关的寡核苷酸杂交。例如,序列“C-A-G-T”与序列“G-T-C-A”互补。互补性可为部分的或全部的。因此,只要部分互补性允许寡核苷酸杂交,任何程度的部分互补性都旨在包括在术语“互补性”的范围内。部分互补性是其中根据碱基配对规则,一个或多个核酸碱基不匹配。核酸之间的全部或完全互补性是其中每个核酸碱基在碱基配对规则下与另一个碱基匹配。

[0129] 检测:术语“检测”在本文中广泛使用以包括确定存在或不存在表达卵巢癌的靶生物标记物特征的细胞外囊泡或指示此种细胞外囊泡的任何形式的测量的适当手段。因此,“检测”可包括确定、测量、评估或测定以任何方式对应于靶生物标记物特征的一部分的关注的实体(例如,表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物或囊泡内RNA生物标记物)的存在或不存在、水平、量和/或位置。在一些实施方案中,“检测”可包括确定、测量、评估或定量指示关注的实体的测量形式(例如,指示表面蛋白质生物标记物和/或囊泡内蛋白质生物标记物的连接模板,或指示囊泡内mRNA的PCR扩增产物)。包括定量和定性确定、测量或评估,包括半定量。此类确定、测量或评估可以是相对的,例如当相对于对照参考或绝对检测关注的实体(例如,表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物或囊泡内RNA生物标记物)或指示其的测量形式时。因此,当术语“定量”用在定量关注的实体(例如,表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白质生物标记物或囊泡内RNA生物标记物)或指示其的测量形式的上下文中时,可指绝对或相对定量。绝对定量可通过将关注的实体(例如,表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物或囊泡内RNA生物标记物)的检测水平或指示其的测量形式与已知的对照标准相关联(例如,通过生成标准曲线)来完成。替代地,相对定量可通过比较两个或更多个不同的关注的实体(例如,不同的表面蛋白生物标记物,或囊泡内蛋白生物标记物,或囊泡内RNA生物标记物)之间的检测水平或量来完成,以提供两个或更多个不同的关注的实体中的每个的相对定量,即相对于彼此。

[0130] 检测标记:如本文所用,术语“检测标记”是指可检测的任何元素、分子、官能团、化

合物、片段或部分。在一些实施方案中,单独地提供或使用检测标记。在一些实施方案中,关联(例如,结合)另一种剂提供和/或使用检测标记。检测标记的实例包括但不限于:各种配体、放射性核素(例如, $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{19}\text{F}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{135}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{187}\text{Re}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{89}\text{Zr}$ 等)、荧光染料、化学发光剂(诸如,例如吖啶酯、稳定的二氧杂环丁烷等)、生物发光剂、光谱可分辨的无机荧光半导体纳米晶体(即,量子点)、金属纳米颗粒(例如,金、银、铜、铂等)纳米簇、顺磁性金属离子、酶、比色标记(诸如,例如染料、胶体金等)、生物素、地高辛、半抗原以及抗血清或单克隆抗体可用的蛋白质。

[0131] 检测探针:术语“检测探针”通常是指针对特定靶标的检测和/或扩增的探针。在一些实施方案中,检测探针是定量探针,其提供表示特定靶标水平的指标。根据本公开,检测探针是指包含直接或间接偶联至寡核苷酸结构域的靶结合实体的组合物,其中靶结合实体特异性结合相应的靶标(例如,分子靶标),并且其中寡核苷酸结构域的至少一部分被设计成允许与针对不同靶标的另一检测探针的寡核苷酸结构域的一部分杂交。在许多实施方案中,适合根据本公开使用的寡核苷酸结构域包含双链部分和至少一个单链悬突。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域可包含双链部分和位于双链部分的每一端的单链悬突。

[0132] 双链:如本文所用,在寡核苷酸结构域的上下文中,术语“双链”被本领域技术人员理解为以氢键螺旋排列存在的一对寡核苷酸,其通常与例如核酸(诸如DNA)相关。除了双链寡核苷酸的100%互补形式之外,如本文所用的术语“双链”还意指包括错配(例如,部分互补性)和/或作为凸起、环或发夹的结构特征的那些形式。

[0133] 双链复合物:如本文所用,术语“双链复合物”通常是指包含至少两个或更多个(包括例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)检测探针(例如,如本文提供和/或使用的)的复合物,每个检测探针针对靶标(其可为相同的靶标或不同的靶标),通过检测探针的互补单链悬突的杂交以线性排列彼此连接或偶联。在一些实施方案中,此种双链复合物可包含细胞外囊泡,其中检测探针各自的靶结合部分同时结合到细胞外囊泡。

[0134] 表位:如本文所用,术语“表位”包括由免疫球蛋白(例如,抗体或受体)结合组分或适体特异性识别的任何部分。在一些实施方案中,表位由抗原上的多个化学原子或基团组成。在一些实施方案中,当抗原采用相关三维构象时,此类化学原子或基团暴露于表面。在一些实施方案中,当抗原采用此种构象时,此类化学原子或基团在空间上在物理上彼此接近。在一些实施方案中,当抗原采用替代构象(例如,线性化)时,至少一些此类化学原子或基团在物理上彼此分离。

[0135] 细胞外囊泡:如本文所用,术语“细胞外囊泡”通常是指细胞外的囊泡,例如由细胞分泌的囊泡。分泌囊泡的实例包括但不限于外泌体、微囊泡、微粒、核外粒体、原癌小体和凋亡小体。不希望受理论束缚,外泌体是内吞起源的纳米尺寸囊泡(例如,在40nm和120nm之间),其可通过多囊泡内体(MVE)的界膜向内出芽形成,而微囊泡通常从细胞表面出芽,并且它们的大小可在50nm和1000nm之间变化。在一些实施方案中,细胞外囊泡是或包含外泌体和/或微囊泡。在一些实施方案中,包含细胞外囊泡的样品基本上不含凋亡小体。在一些实施方案中,包含细胞外囊泡的样品可包含从一个或多个组织(例如,癌性组织和/或非癌性或健康组织)脱落或衍生的细胞外囊泡。在一些实施方案中,样品中的细胞外囊泡可从卵巢癌肿瘤脱落或衍生;在一些实施方案中,细胞外囊泡从非卵巢癌肿瘤脱落或衍生。在一些实

施方案中,细胞外囊泡从健康组织脱落或衍生。在一些实施方案中,细胞外囊泡从良性妇科肿瘤脱落或衍生。在一些实施方案中,细胞外囊泡从具有与卵巢癌相关的症状(例如,非特异性症状)的受试者的组织脱落或衍生。

[0136] 细胞外囊泡相关膜结合多肽:如本文所用,此种术语是指存在于细胞外囊泡的膜中的多肽。在一些实施方案中,此种多肽可为肿瘤特异性的。在一些实施方案中,此种多肽可为组织特异性的(例如,卵巢组织特异性的)。在一些实施方案中,此种多肽可为非特异性的,例如,其存在于一种或多种非靶肿瘤和/或一种或多种非靶组织中。

[0137] 杂交:如本文所用,术语“杂交(hybridizing/hybridize/hybridization)”、“退火(annealing/anneal)”在提及使用核酸链通过碱基配对与互补链结合以形成杂交复合物的任何过程配对互补核酸时可互换使用。杂交和杂交强度(例如,核酸之间的结合强度)受各种因素影响,包括例如核酸之间的互补程度、所涉及条件的严格性、所形成的杂交复合物的解链温度(T)以及核酸内的G:C比率。

[0138] 囊泡内蛋白生物标记物:如本文所用,术语“囊泡内蛋白生物标记物”是指指示存在于生物实体(例如,细胞或细胞外囊泡)内的多肽的状态(例如,存在、水平和/或活性)的标记物。在许多实施方案中,囊泡内蛋白生物标记物与细胞外囊泡相关或存在于细胞外囊泡内。

[0139] 囊泡内RNA生物标记物:如本文所用,术语“囊泡内RNA生物标记物”是指指示存在于生物实体(例如,细胞或细胞外囊泡)内的RNA(例如,mRNA)的状态(例如,存在和/或水平)的标记物。在许多实施方案中,囊泡内RNA生物标记物与细胞外囊泡相关或存在于细胞外囊泡内。

[0140] 连接酶:如本文所用,术语“连接酶”或“核酸连接酶”是指用于连接核酸的酶。在一些实施方案中,连接酶是用于将多核苷酸的3'端连接到多核苷酸的5'端的酶。在一些实施方案中,连接酶是用于进行粘端连接的酶。在一些实施方案中,连接酶是用于进行平端连接的酶。在一些实施方案中,连接酶是或包含DNA连接酶。

[0141] 生活史相关风险因素:如本文所用,术语“生活史风险因素”是指个体在他们的生活中的行为、经历、病史和/或暴露,所述行为、经历、病史和/或暴露可能直接或间接增加此类病状(例如,卵巢癌)的个体风险,相比于在他们的生活中没有此类行为、经历、病史和/或暴露的个体。在一些实施方案中,生活史相关风险因素的非限制性实例包括吸烟、酒精、药物、致癌剂、饮食、肥胖、糖尿病、多囊卵巢综合征(PCOS)、子宫内膜异位症、盆腔炎(PID)、未产妇/不孕症、无口服避孕药使用史/短期史、体力活动、光暴露、放射暴露、会阴滑石粉使用、激素替代疗法(HRT)、暴露于诸如病毒的感染性因子和/或职业危害(Reid等人,2017;出于本文所述的目的,所述文献以引用方式并入本文)。本领域技术人员认识到,上述生活史相关的导致癌症(例如,卵巢癌)易感性的风险因素列表并不是详尽的,而是不断发展的。

[0142] 连接:如本文所用,术语“连接(ligate/ligating/ligation)”是指本领域已知的用于连接两个寡核苷酸或多核苷酸的方法或组合物。连接可以是或包括粘端连接或平端连接。在一些实施方案中,所提供的技术中涉及的连接是或包括粘端连接。在一些实施方案中,连接是指将多核苷酸的3'端连接到多核苷酸的5'端。在一些实施方案中,通过使用核酸连接酶促进连接。

[0143] 非癌症受试者:如本文所用,术语“非癌症受试者”一般是指未患有非良性卵巢癌

的受试者。例如,在一些实施方案中,非癌症受试者为健康女性受试者(例如,健康妇女受试者)。在一些实施方案中,非癌症受试者是年龄低于55岁的健康女性受试者(例如,健康妇女受试者)。在一些实施方案中,非癌症受试者是年龄为55岁或以上的健康女性受试者(例如,健康妇女受试者)。在一些实施方案中,非癌症受试者是患有非卵巢相关健康疾病、病症或病状的女性受试者(例如,妇女受试者)。在一些实施方案中,非癌症受试者是患有良性卵巢肿瘤(例如,在输卵管中和/或卵巢上观察到的良性肿块)的女性受试者(例如,妇女受试者)。

[0144] 核酸/寡核苷酸:如本文所用,术语“核酸”是指具有至少10个或更多个核苷酸的聚合物。在一些实施方案中,核酸是或包含DNA。在一些实施方案中,核酸是或包含RNA。在一些实施方案中,核酸是或包含肽核酸(PNA)。在一些实施方案中,核酸是或包含单链核酸。在一些实施方案中,核酸是或包含双链核酸。在一些实施方案中,核酸包含单链和双链部分。在一些实施方案中,核酸包含含有一个或多个磷酸二酯键联的主链。在一些实施方案中,核酸包含含有磷酸二酯键联和非磷酸二酯键联的主链。例如,在一些实施方案中,核酸可包含含有一个或多个硫代磷酸酯或5'-N-亚磷酰胺键联和/或一个或多个肽键的主链,例如,如在“肽核酸”中。在一些实施方案中,核酸包含一个或多个或所有天然残基(例如,腺嘌呤、胞嘧啶、脱氧腺苷、脱氧胞苷、脱氧鸟苷、脱氧胸苷、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶)。在一些实施方案中,核酸包含一个或多个或所有非天然残基。在一些实施方案中,非天然残基包含核苷类似物(例如,2-氨基腺苷、2-硫代胸苷、肌苷、吡咯并嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C-5丙炔基-胞苷、C-5丙炔基-尿苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷-氧代腺苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、6-0-甲基鸟嘌呤、2-硫代胞苷、甲基化碱基、插入的碱基及其组合)。在一些实施方案中,与天然残基中的糖相比,非天然残基包含一种或多种修饰的糖(例如,2'-氟核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖和己糖)。在一些实施方案中,核酸具有编码功能基因产物诸如RNA或多肽的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸具有包含一个或多个内含子的核苷酸序列。在一些实施方案中,核酸可通过从天然来源分离、酶促合成(例如,通过基于互补模板的聚合,例如在体内或体外)、在重组细胞或系统中复制或化学合成来制备。在一些实施方案中,核酸为至少3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、15,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500或20,000个或更多个残基或核苷酸长。

[0145] 核苷酸:如本文所用,术语“核苷酸”是指其领域公认的含义。当使用多个核苷酸作为大小(例如寡核苷酸的大小)的指示时,一定数量的核苷酸是指单链上的核苷酸(例如寡核苷酸)的数量。

[0146] 患者:如本文所用,术语“患者”是指患有疾病或病症或病状或处于疾病或病症或病状的风险的任何生物体。典型的患者包括动物(例如,哺乳动物,诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人)。在一些实施方案中,患者为人。在一些实施方案中,患者患有或易患

一种或多种疾病或病症或病状。在一些实施方案中,患者表现出疾病或病症或病状的一种或多种症状。在一些实施方案中,患者已被诊断为患有一种或多种疾病或病症或病状。在一些实施方案中,适用于所提供的技术的疾病或病症或病状是或包括癌症,或一种或多种肿瘤的存在。在一些实施方案中,患者正在接受或已经接受某些疗法以诊断和/或治疗疾病、病症或病状。

[0147] 多肽:如本文所用,术语“多肽”通常具有至少三个或更多个氨基酸的聚合物的领域公认的含义。本领域普通技术人员将理解,术语“多肽”旨在足够通用,以便不仅涵盖具有本文所述的完整序列的多肽,而且还涵盖表示此类完整多肽的功能性、生物活性或特征性片段、部分或结构域(例如,保留至少一种活性的片段、部分或结构域)的多肽。在一些实施方案中,多肽可含有L-氨基酸、D-氨基酸或两者和/或可含有本领域已知的多种氨基酸修饰或类似物中的任一种。有用的修饰包括例如末端乙酰化、酰胺化、甲基化等。在一些实施方案中,多肽可包含天然氨基酸、非天然氨基酸、合成氨基酸及其组合(例如,可以是或包含拟肽)。

[0148] 预防(prevent/prevention):如本文所用,当与疾病、病症和/或病状的发生相关联时,“预防(prevent/prevention)”是指降低发展疾病、病症和/或病状的风险和/或延迟疾病、病症或病状的一个或多个特征或症状的发作。当疾病、病症或病状的发作已延迟预定时间段时,可认为预防是完全的。

[0149] 引物:如本文所用,术语“引物”是指当置于诱导与核酸链互补的引物延伸产物的合成的条件下(例如,在核苷酸和诱导剂(诸如DNA聚合酶)的存在下以及在合适的温度和pH下)时能够充当合成起始点的寡核苷酸。引物优选为单链以最大化扩增效率。引物必须足够长以在诱导剂的存在下引发延伸产物的合成。引物的确切长度可取决于许多因素,例如温度。

[0150] 多考:如本文所用,“参考”描述了与之进行比较的标准或对照。例如,在一些实施方案中,将关注的剂、动物、个体、群体、样品、序列或值与参考或对照的剂、动物、个体、群体、样品、序列或值进行比较。在一些实施方案中,测试和/或确定参考或对照与所关注的测试或确定基本上同时进行。在一些实施方案中,参考或对照是历史参考或对照,任选地体现在有形介质中。在一些实施方案中,在靶标的参考水平的上下文中的参考或对照是指正常健康受试者或正常健康受试者群体中的靶标水平。在一些实施方案中,在靶标的参考水平的上下文中的参考或对照是指治疗前受试者体内的靶标水平。通常,如本领域技术人员所理解的,参考或对照是在与评估中的那些相当的状况或情况下确定或表征的。当存在足够的类似性来证明对特定的可能参考或对照的依赖和/或比较时,本领域技术人员将理解。

[0151] 风险:从上下文中可以理解,疾病、病症和/或病状的“风险”是指特定个体发展疾病、病症和/或病状的可能性。在一些实施方案中,风险表示为百分比。在一些实施方案中,风险为0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%至100%。在一些实施方案中,风险表示为相对于与参考样品或参考样品组相关的风险的风险。在一些实施方案中,参考样品或参考样品组具有疾病、病症、病状和/或事件的已知风险。在一些实施方案中,参考样品或参考样品组来自与特定个体相当的个体。在一些实施方案中,相对风险为0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大。

[0152] 样品:如本文所用,术语“样品”通常是指从关注的来源获得或衍生的材料的等分

试样。在一些实施方案中,样品是从关注的生物来源(例如,组织或生物体或细胞培养物)获得或衍生的。在一些实施方案中,关注的来源可以是或包括细胞或生物体,诸如动物或人。在一些实施方案中,关注的来源是或包括生物组织或流体。在一些实施方案中,生物组织或流体可以是或包含羊水、房水、腹水、胆汁、骨髓、血液、母乳、脑脊液、耳垢、乳糜、食糜(chime)、精液(ejaculate)、内淋巴、渗出物、粪便、胃酸、胃液、淋巴、粘液、心包液、外淋巴、腹膜液、胸膜液、脓液、泪水、唾液、皮脂、精液(semen)、血清、包皮垢、痰、滑液、汗液、眼泪、尿液、阴道分泌物、玻璃体液、呕吐物和/或其组合或一个或多个组分。在一些实施方案中,生物流体可以是或包含细胞内液、细胞外液、囊泡内液(血浆)、间质液、淋巴液和/或跨细胞液。在一些实施方案中,生物组织或样品可通过例如抽吸、活检(例如,细针或组织活检)、拭子(例如,口腔、鼻、皮肤或阴道拭子)、刮擦、手术、洗涤或灌洗(例如,支气管肺泡、导管、鼻、眼、口腔、子宫、阴道或其他洗涤或灌洗)获得。在一些实施方案中,生物样品是或包含液体活检。在一些实施方案中,生物样品是或包含从个体获得的细胞。在一些实施方案中,样品是通过任何适当的方式直接从关注的来源获得的“原始样品”。在一些实施方案中,从上下文中将清楚,术语“样品”是指通过处理原始样品(例如,通过去除其中的一种或多种组分和/或通过向其中添加一种或多种剂)获得的制剂。例如,样品是通过使用半透膜或基于亲和力的方法(诸如基于抗体的方法)处理以将关注的生物实体与其他非靶实体分离的制剂。例如,此种“经处理的样品”在一些实施方案中可包含细胞外囊泡,而在一些实施方案中,可包含从样品中提取的核酸和/或蛋白质等。在一些实施方案中,可通过使原始样品经受一种或多种技术(诸如核酸的扩增或逆转录、某些组分的分离和/或纯化等)来获得经处理的样品。

[0153] 选择性或特异性:当在本文中用于提及具有活性的剂时,术语“选择性”或“特异性”将被本领域技术人员理解为意指所述剂区分潜在的靶实体、状态或细胞。例如,在一些实施方案中,如果在存在一个或多个竞争性替代靶标的情况下,剂优先与其靶标结合,则称所述剂“特异性”结合其靶标。在许多实施方案中,特异性相互作用取决于靶实体的特定结构特征(例如,表位、裂口、结合位点)的存在。应当理解,特异性不必是绝对的。在一些实施方案中,可相对于一个或多个其他潜在靶实体(例如,竞争者)的靶结合部分的特异性来评估特异性。在一些实施方案中,相对于参考特异性结合部分的特异性评估特异性。在一些实施方案中,相对于参考非特异性结合部分的特异性评估特异性。在一些实施方案中,靶结合部分在与其靶实体结合的条件下不可检测地结合到竞争性替代靶标。在一些实施方案中,与一个或多个竞争性替代靶标相比,靶结合部分以更高的结合速率、更低的解离速率、增加的亲和力、减少的解离和/或增加的稳定性与其靶实体结合。

[0154] 小分子:如本文所用,术语“小分子”意指低分子量有机和/或无机化合物。一般来讲,“小分子”是大小小于约5千道尔顿(kD)的分子。在一些实施方案中,小分子小于约4kD、3kD、约2kD或约1kD。在一些实施方案中,小分子小于约800道尔顿(D)、约600D、约500D、约400D、约300D、约200D或约100D。在一些实施方案中,小分子小于约2000g/mol、小于约1500g/mol、小于约1000g/mol、小于约800g/mol或小于约500g/mol。在一些实施方案中,小分子不是聚合物。在一些实施方案中,小分子不包括聚合部分。在一些实施方案中,小分子不是蛋白质或多肽(例如,不是寡肽或肽)。在一些实施方案中,小分子不是多核苷酸(例如,不是寡核苷酸)。在一些实施方案中,小分子不是多糖。在一些实施方案中,小分子不包含多

糖(例如,不是糖蛋白、蛋白聚糖、糖脂等)。在一些实施方案中,小分子不是脂质。在一些实施方案中,小分子具有生物活性。在一些实施方案中,合适的小分子可通过诸如以下的方法来鉴定:筛查化合物的大文库(Beck-Sickinger&Weber(2001) *Combinational Strategies in Biology and Chemistry* (John Wiley&Sons,Chichester,Sussex));通过核磁共振的结构-活性关系(Shuker等人(1996) "Discovering high-affinity ligands for proteins:SAR by NMR." *Science* 274:1531-1534);编码的自组装化学文库(Melkko等人(2004) "Encoded self-assembling chemical libraries." *Nature Biotechnol.* 22:568-574);DNA模板化学(Gartner等人(2004) "DNA-templated organic synthesis and selection of a library of macrocycles." *Science* 305:1601-1605);动态组合化学(Ramstrom&Lehn(2002) "Drug discovery by dynamic combinatorial libraries." *Nature Rev. Drug Discov.* 1:26-36);拴系(Arkin&Wells(2004) "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions:progressing towards the dream." *Nature Rev. Drug Discov.* 3:301-317);以及速度筛查(Muckenschnabel等人(2004) "SpeedScreen:label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-throughput screening for the discovery of orphan protein ligands." *Anal. Biochem.* 324:241-249)。在一些实施方案中,小分子可具有纳摩尔范围内的靶标的解离常数。

[0155] 特异性结合:如本文所用,术语“特异性结合”是指在发生结合的环境中区分可能的结合配偶体的能力。当存在其他潜在靶标时,与一个特定靶标相互作用的靶结合部分被称为“特异性结合”与其相互作用的靶标。在一些实施方案中,通过检测或确定靶结合部分与其配偶体之间的缔合程度来评估特异性结合;在一些实施方案中,通过检测或确定靶结合部分-配偶体复合物的解离程度来评估特异性结合;在一些实施方案中,通过检测或确定靶结合部分竞争其配偶体与另一实体之间的替代相互作用的能力来评估特异性结合。在一些实施方案中,通过在一定浓度范围内进行此类检测或确定来评估特异性结合。

[0156] 癌症阶段:如本文所用,术语“癌症阶段”是指对癌症(例如,卵巢癌)进展水平的定性或定量评估。在一些实施方案中,用于确定癌症阶段的标准可包括但不限于以下中的一项或多项:癌症在体内的位置、肿瘤大小、癌症是否已扩散至淋巴结、癌症是否已扩散到体内的一个或多个不同部位等。在一些实施方案中,可使用AJCC分阶段系统对癌症进行分阶段。AJCC分阶段系统是由美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer)开发的用于描述癌症患者中疾病进展的程度的分类系统,所述系统部分地利用了TNM评分系统:肿瘤大小、受影响的淋巴结、转移。在一些实施方案中,可使用部分涉及TNM评分系统的分类系统对癌症进行分阶段,根据所述系统,T是指主要肿瘤(通常称为原发性肿瘤)的大小和程度;N是指附近有癌症的淋巴结数量;并且M是指癌症是否已转移。在一些实施方案中,癌症可被称为阶段0(存在异常细胞但未扩散到附近组织,也称为原位癌,或CIS;CIS不是癌症,但它可能变成癌症)、阶段I至阶段III(存在癌症;数字越大,肿瘤越大,并且扩散到附近组织的程度越高)或阶段IV(癌症已扩散到身体的远处部位)。在一些实施方案中,癌症可被指定为选自以下组成的组的阶段:原位(存在异常细胞但未扩散到附近组织);局部(癌症仅限于它开始的地方,没有扩散的迹象);区域性(癌症已扩散到附近的淋巴结、组织或器官);远处(癌症已经扩散到身体的远处部位);以及未知(没有足够的信息来确定阶段)。

[0157] 受试者：如本文所用，术语“受试者”是指从其获得样品的生物体，以例如用于实验、诊断、预防和/或治疗目的。典型的受试者包括动物（例如，哺乳动物，诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物、家养宠物等）和人。在一些实施方案中，受试者是人类女性受试者，例如，人类妇女受试者。在一些实施方案中，受试者患有卵巢癌。在一些实施方案中，受试者易患卵巢癌。在一些实施方案中，受试者表现出卵巢癌的一种或多种症状或特征。在一些实施方案中，受试者表现出卵巢癌的一种或多种非特异性症状。在一些实施方案中，受试者不表现出卵巢癌的任何症状或特征。在一些实施方案中，受试者是具有卵巢癌的易感性所特有的一个或多个特征或者患有卵巢癌的风险的人。在一些实施方案中，受试者是患者。在一些实施方案中，受试者是施用和/或已施用诊断和/或治疗的个体。在一些实施方案中，受试者是确定具有附件肿块的女性受试者（例如，妇女受试者）。在一些实施方案中，受试者是无症状受试者。此种有症状的受试者可以是处于平均群体风险或具有遗传风险的女性受试者（例如，妇女受试者）。例如，此种无症状受试者可以是具有癌症家族史的受试者、先前接受过癌症治疗的受试者、在癌症治疗后处于癌症复发风险的受试者、在癌症治疗后有所缓解的受试者和/或先前或定期筛查至少一种癌症生物标记物的存在的受试者。替代地，在一些实施方案中，无症状受试者可以是先前未经癌症筛查的受试者、未诊断为癌症的受试者和/或先前未接受癌症治疗的受试者。在一些实施方案中，适用于所提供的技术的受试者是基于诸如以下的一个或多个特征选择的个体：年龄、种族、遗传史、病史、个人史（例如，吸烟、酒精、药物、致癌剂、饮食、肥胖、身体活动、光暴露、放射暴露、暴露于诸如病毒的感染性因子和/或职业危害）。

[0158] 患有：“患有”疾病、病症和/或病状的个体已被诊断为患有和/或表现出疾病、病症和/或病状的一种或多种症状。

[0159] 表面多肽或表面蛋白：如在本文中可互换使用的，术语“表面多肽”、“表面蛋白”和“膜结合多肽”是指具有存在于生物实体（例如，细胞、细胞外囊泡等）的膜表面中和/或其上的一个或多个结构域或区域的多肽或蛋白质。在一些实施方案中，表面蛋白可包含跨越生物实体（例如，细胞、细胞外囊泡等）的质膜和/或与其相关的一个或多个结构域或区域。在一些实施方案中，表面蛋白可包含跨越生物实体（例如，细胞、细胞外囊泡等）的质膜和/或与其相关并且还从囊泡内和/或囊泡内空间突出的一个或多个结构域或区域。在一些实施方案中，表面蛋白可包含例如通过一个或多个非肽键与生物实体（例如，细胞、细胞外囊泡等）的质膜相关的一个或多个结构域或区域。在一些实施方案中，表面蛋白可包含锚定到生物实体（例如，细胞、细胞外囊泡等）的质膜任一侧的一个或多个结构域或区域。在一些实施方案中，表面蛋白与细胞外囊泡相关或存在于细胞外囊泡内。在一些实施方案中，表面多肽或膜结合多肽可与卵巢癌相关细胞外囊泡（例如，从患有或易患卵巢癌的受试者的血液或血液来源的样品获得或衍生的细胞外囊泡）相关或存在于其内。如本领域技术人员将理解的，检测细胞外囊泡上/内的表面多肽或表面蛋白的至少一部分的存在可促进卵巢癌相关细胞外囊泡与来自受试者的生物样品（例如，血液或血液来源的样品）的分开和/或分离。在一些实施方案中，检测表面多肽或表面蛋白的存在可以是或包括检测此种表面多肽或表面蛋白的囊泡内部分（例如，囊泡内表位）。在一些实施方案中，检测表面多肽或表面蛋白的存在可以是或包括检测此种表面多肽或表面蛋白的跨膜部分。在一些实施方案中，检测表面多肽或表面蛋白的存在可以是或包括检测此种表面多肽或表面蛋白的囊泡外部分。

[0160] 表面蛋白生物标记物:如本文所用,术语“表面蛋白生物标记物”是指指示生物实体(例如,细胞或细胞外囊泡)的表面蛋白(例如,如本文所述)的状态(例如,存在、水平和/或活性)的标记物。在一些实施方案中,表面蛋白是指具有位于生物实体(例如,细胞或细胞外囊泡)的膜表面内或表面上的一个或多个结构域或区域的多肽或蛋白质。在一些实施方案中,表面蛋白生物标记物可以是或包含存在于膜内侧(囊泡内)或外侧(囊泡外)的表位。在一些实施方案中,表面蛋白生物标记物与细胞外囊泡相关或存在于细胞外囊泡中。

[0161] 易患:“易患”疾病、病症和/或病状的个体是比公众成员有更高风险发展所述疾病、病症和/或病状的人。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状的个体可能未被诊断为患有所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状的个体可表现出所述疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状的个体可不表现出所述疾病、病症和/或病状的症状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状的个体会发展所述疾病、病症和/或病状。在一些实施方案中,易患疾病、病症和/或病状的个体不会发展所述疾病、病症和/或病状。

[0162] 靶结合部分:一般来讲,术语“靶结合部分”和“结合部分”在本文中可互换使用以指结合关注的靶标(例如,关注的分子靶标,诸如生物标记物或表位)的任何实体或部分。在许多实施方案中,关注的靶结合部分是与其靶标(例如,靶生物标记物)特异性结合的部分,因为它将其靶标与特定相互作用环境中的其他潜在结合配偶体区分开来。一般来讲,靶结合部分可以是或包含任何化学类别的实体或部分(例如,聚合物、非聚合物、小分子、多肽、碳水化合物、脂质、核酸等)。在一些实施方案中,靶结合部分是单个化学实体。在一些实施方案中,靶结合部分是在相关条件下通过非共价相互作用彼此缔合的两个或更多个离散化学实体的复合物。例如,本领域技术人员将理解,在一些实施方案中,靶结合部分可包含“通用”结合部分(例如,生物素/抗生物素蛋白/链霉抗生物素和/或类别特异性抗体中的一种)和与通用结合部分的配偶体连接的“特异性”结合部分(例如,具有特定分子靶标的抗体或适体)。在一些实施方案中,此种方法可允许通过不同特异性结合部分与通用结合部分配偶体的连接来模块化组装多个靶结合部分。

[0163] 靶生物标记物特征:如本文所用,术语“靶生物标记物特征”是指(例如,至少2个或更多个,包括例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个、至少30个或更多个)生物标记物的组合,所述组合与特定生物事件或关注的状态相关,使得本领域技术人员将理解,其可适当地被认为是所述事件或状态的“特征”。仅举几个实例,在一些实施方案中,靶生物标记物特征可与特定疾病或疾病状态相关,和/或与特定疾病、病症或病状可能发展、发生或复发的可能性相关。在一些实施方案中,靶生物标记物特征可与特定疾病或治疗结果或其可能性相关。在一些实施方案中,靶生物标记物特征可与特定癌症和/或其阶段相关。在一些实施方案中,靶生物标记物特征可与卵巢癌和/或其阶段和/或其亚型相关。在一些实施方案中,靶生物标记物特征包含(例如,至少2个或更多个,包括例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个、至少30个或更多个)生物标记物的组合,它们一起对卵巢癌或其亚型和/或其疾病阶段具有特异性,尽管此种组合中的一个或多个生物

标记物可针对对卵巢癌不具有特异性的靶标(例如,表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和/或囊泡内RNA)。例如,在一些实施方案中,靶生物标记物特征可包含对卵巢癌或其阶段和/或亚型具有特异性的至少一种生物标记物(即,卵巢癌特异性靶标),并且还可包含不一定或完全对卵巢癌具有特异性的生物标记物(例如,也可在一些或所有生物实体(例如像细胞、细胞外囊泡等)上发现,所述生物实体不是癌性的、不是相关癌症的和/或不属于关注的特定阶段和/或亚型)。也就是说,如阅读本说明书的本领域技术人员将理解的,只要在靶生物标记物特征中使用的生物标记物的组合是或包含多个生物标记物,所述生物标记物一起对关注的相关靶生物实体(例如,关注的卵巢癌细胞或卵巢癌细胞分泌的细胞外囊泡)具有特异性(即,充分区分用于检测的相关靶生物实体(例如,关注的卵巢癌细胞或卵巢癌细胞分泌的细胞外囊泡)与用于检测的其他不受关注的生物实体),根据本公开的某些实施方案,生物标记物的此种组合是有用的靶生物标记物特征。

[0164] 治疗剂:如在本文中互换使用的,短语“治疗剂”或“疗法”是指当施用于受试者或患者时具有治疗效果和/或引发所需生物学和/或药理学效果的剂或干预。在一些实施方案中,治疗剂或疗法是可用于减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发作、降低其严重性和/或降低其发病率的任何物质。在一些实施方案中,治疗剂或疗法是可执行以减轻、缓解、抑制、呈现、延迟疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发作、降低其严重性和/或降低其发病率的医学干预(例如,手术、放射、光照疗法)。

[0165] 阈值水平(例如,截止值):如本文所用,术语“阈值水平”是指用作获得关于测量结果(例如,在测定中获得的测量结果)的信息和/或对其进行分类的参考的水平。例如,在一些实施方案中,阈值水平(例如,截止值)意指在定义群体的两个子集(例如,正常和/或非卵巢癌与卵巢癌)之间的分界线的测定中测量的值。因此,等于或高于阈值水平的值定义了群体的一个子集,并且低于阈值水平的值定义了群体的另一个子集。阈值水平可基于一个或多个对照样品或跨越对照样品群体来确定。可在进行关注的测量之前、同时或之后确定阈值水平。在一些实施方案中,阈值水平可为值的范围。

[0166] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treat、treatment或treating)”是指用于部分或完全减轻、改善、缓解、抑制、预防、延迟疾病、病症和/或病状的一种或多种症状或特征的发作、降低其严重程度和/或降低其发病率的任何方法。可向未表现出疾病、病症和/或病状迹象的受试者施用治疗。在一些实施方案中,可向仅表现出疾病、病症和/或病状的早期迹象的受试者施用治疗,例如为了降低发展与疾病、病症和/或病状相关的病理的风险的目的。在一些实施方案中,可向处于疾病、病症和/或病状的晚期阶段的受试者施用治疗。

[0167] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如,电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或如本领域中通常完成的或如本文所述来进行。前述技术和程序一般可根据本领域众所周知的常规方法进行,并且如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所述。参见例如,Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)), 其出于本文所述的目的以引用的方式并入本文。

## 具体实施方式

[0168] 2018年美国估计有14,070人死于卵巢癌(Torre等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。这些死亡中的大部分是由于诊断较晚;卵巢癌如果在其最早阶段被发现,估计5年存活率为93%,而如果在其最晚阶段被发现,估计5年存活率为26%(Torre等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。鉴于HGSOC占有卵巢癌死亡的70%至80%,而其他亚型发展较慢并且当使用现有技术时容易过度诊断,因此检测高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)尤为重要(Temkin等人,2017;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。不幸的是,尽管是所有癌症中妇女的第五大杀手(Howlader等人,2019;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文),但没有针对平均风险妇女的推荐的卵巢癌筛查测试。虽然目前通过血清CA-125和/或经阴道超声(TVUS)筛查许多处于遗传风险和/或可能经历一种或多种卵巢癌症状(例如,腹腔积液(腹水)、一般胃肠道功能障碍、便秘、肠梗阻、恶心、呕吐、腹泻、胃肠道反流、腹部体积增大、泌尿系统症状、腹胀、腹部和/或骨盆疼痛、疲劳和/或呼吸短促)的妇女,但这些测试对于筛查来说不是最佳的,因为它们对I期和II期疾病的灵敏度低(约20%)并且特异性差。例如,前列腺癌、肺癌、结肠直肠癌和卵巢癌筛查随机试验发现血清CA-125和TVUS增加了不必要的手术次数,并且没有为平均风险妇女提供死亡率益处(Buys等人,2011年;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。尽管表现不佳,但血清CA-125和TVUS目前是用以对患有非特异性盆腔疼痛(可能潜在指示卵巢癌)的绝经后妇女进行分类的常用筛查工具。

[0169] 本公开尤其用某些现有技术(包括例如卵巢癌检测和诊断的某些常规方法)鉴定问题的根源。例如,本公开认识到许多常规诊断测定(例如,基于无细胞核酸、血清蛋白(例如,CA-125)和/或细胞外囊泡的批量分析)可能是耗时的、昂贵的和/或缺乏足以提供可靠且全面的诊断评估的灵敏度和/或特异性的。在一些实施方案中,本公开提供了解决此类问题的技术(包括系统、组合物和方法),尤其通过基于生物信息学分析鉴定预测对卵巢癌表现出高灵敏度和特异性的生物标记物组合。在一些实施方案中,本公开提供通过检测个体细胞外囊泡中卵巢癌的靶生物标记物特征的共定位(例如,通过生物信息学分析鉴定)来解决此类问题的技术(包括系统、组合物和方法),所述细胞外囊泡包含至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:存在于与卵巢癌相关的细胞外囊泡中的表面蛋白生物标记物、内部蛋白生物标记物和RNA生物标记物。在一些实施方案中,本公开尤其提供了通过使用基于个体细胞外囊泡中靶生物标记物特征的相互作用和/或共定位的靶实体检测方法(由申请人开发并描述于均在2020年2月28日提交且名为“Systems,Compositions,and Methods for Target Entity Detection”的美国申请号16/805,637和国际申请PCT/US2020/020529中)检测卵巢癌的此类生物标记物特征来解决此类问题的技术(包括系统、组合物和方法)。前述各公开内容全文以引用的方式并入本文。

[0170] 本公开尤其提供了用于实现有效卵巢癌筛查(例如,用于卵巢癌的早期检测)的见解和技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于可能正在经历与卵巢癌相关的一种或多种症状的妇女中的卵巢癌早期检测的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于处于卵巢癌遗传风险的妇女中的卵巢癌早期检测的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于可能处于遗传风险和/或正在经历与卵巢癌相关的一种或多种症状的绝经后妇女中的卵巢癌早期检测的技术。在一些实施方案中,本公开提供了用于筛查处于早期高级别浆液性卵

巢癌 (HGSOC) 的遗传风险或平均风险的妇女的技术。HGSOC是最常见和最致命的卵巢癌亚型,其中84%的病例在晚期被检测到 (Torre等人,2018年,其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,所提供的技术对于检测早期卵巢癌是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术即使在应用于包含无症状或有症状个体或由所述个体组成的群体时也是有效的 (例如,由于足够高的灵敏度和/或低的假阳性和/或假阴性结果率)。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含没有发展卵巢癌的遗传风险的个体 (例如,无症状或有症状个体) 或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含具有发展卵巢癌的遗传风险的个体 (例如,无症状或有症状个体) 或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术在应用于包含易患卵巢癌的个体 (例如,具有已知遗传、环境或经验风险等的个体) 或由所述个体组成的群体时是有效的。在一些实施方案中,所提供的技术可以是或包括一种或多种组合物 (例如,分子复合物、系统、集合、组合、试剂盒等) 和/或方法 (例如,制造、使用、评估等),如对于阅读本文提供的公开的本领域技术人员来说将是清楚的。

[0171] 在一些实施方案中,所提供的技术实现对卵巢癌的一个或多个特征 (例如,发病、进展、对治疗的反应性、复发等) 的检测 (例如,早期检测,例如,在一个或多个无症状个体和/或一个或多个群体中),其中灵敏度和/或特异性 (例如,假阳性和/或假阴性结果的比率) 适用于允许将所提供的技术有用地应用于单次和/或定期 (例如,周期性) 评估。在一些实施方案中,所提供的技术与妇女的定期体格检查诸如乳房X线照片、HPV和/或巴氏涂片筛查结合是有用的。在一些实施方案中,所提供的技术与一种或多种筛查方法 (例如,用于卵巢癌) 诸如CA-125测量 (例如,CA-125血清水平测量) 和/或TVUS结合是有用的。在一些实施方案中,所提供的技术可用于与一种或多种治疗方案结合;在一些实施方案中,所提供的技术可改进这样的一种或多种治疗方案的一个或多个特征 (例如,根据接受的参数的成功率)。

[0172] 在一些实施方案中,本公开尤其提供了以下见解:对无症状个体进行筛查 (例如,在出现症状之前或以其他方式在没有出现症状的情况下进行定期筛查) 可能是有益的,并且甚至对于卵巢癌的有效管理 (例如,成功治疗) 是重要的。在一些实施方案中,本公开提供了卵巢癌筛查系统,在一些实施方案中,所述卵巢癌筛查系统可被实施以检测无症状个体 (例如,没有卵巢癌遗传风险) 中的卵巢癌,包括早期癌症。在一些实施方案中,所提供的技术被实施以实现对无症状个体 (例如,有或没有卵巢癌遗传风险) 的定期筛查。在一些实施方案中,所提供的技术被实施以实现对有症状个体 (例如,有或没有卵巢癌遗传风险) 的定期筛查。本公开提供了例如组合物 (例如,试剂、试剂盒、组分等) 以及提供和/或使用它们的方法,包括涉及对一个或多个个体 (例如,无症状个体) 进行定期测试的策略。本公开定义了此类系统的有用性,并提供了用于实施它们的组合物和方法。

#### [0173] I. 卵巢癌检测

[0174] 今天,没有任何类型的卵巢癌筛查测试被FDA批准用于平均风险的无症状妇女,而在美国,患卵巢癌的平均终生风险为1.3%,相当于78名妇女中有1人。美国的总体卵巢癌患病率为每10,000名55至74岁妇女中5.7人 (Buys等人,2011;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。2018年,美国诊断出大约22,240例新增卵巢癌病例和14,070例卵巢癌死亡病例 (Torre等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。其中,年龄和绝经状

态已被鉴定为卵巢癌的风险因素,其中最初表现的平均年龄大约为68岁。

[0175] 上皮性卵巢癌亚型占有卵巢癌的90%。上皮癌分为浆液性(52%)、子宫内膜样(10%)、粘液性(6%)或透明细胞(6%), (Torre等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。大多数浆液性癌在III期(51%)或IV期(29%)被诊断出来,此时5年生存率分别为42%和26%,表明需要早期筛查测试。生殖细胞和性索间质肿瘤占非上皮癌的大部分,但分别仅占有卵巢癌的3%和2%。卵巢癌影响所有种族的妇女。

[0176] 卵巢癌的最强风险因素是乳腺癌或卵巢癌家族史。一级亲属有卵巢癌史的妇女患浸润性上皮性卵巢癌的风险增加大约50%,一级亲属患有乳腺癌的妇女患浸润性上皮性卵巢癌的风险增加10%。大约18%的上皮性卵巢癌病例,尤其是高级别浆液性癌,据估计是由于导致风险升高的遗传突变。在有卵巢癌家族史的妇女中,BRCA1和BRCA2突变占有卵巢癌病例的近40%。在具有BRCA1或BRCA2突变的妇女中,到80岁时患卵巢癌的风险分别为44%和17%。上皮性卵巢癌的罕见中等外显基因突变包括涉及范可尼贫血/BRCA通路的基因,诸如PALB2、BARD1、BRIP1、RAD51C和RAD51D,例如,如Matulonis等人,2016所述,其出于本文所述目的以引用的方式并入本文。林奇综合征家族的特征是DNA错配修复基因(例如MLH1、MSH2、MSH6或PMS2)中的种系突变。患有林奇综合征的妇女到70岁时患卵巢癌(通常是非浆液性上皮性肿瘤)的风险大约为8%,而在一般群体中的风险为0.7%(Torre等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。其他参与DNA修复的基因(诸如CHEK2、MRE11A、RAD50、ATM和TP53)中的遗传突变也可能增加患卵巢癌的风险。如全基因组关联研究所示,其他常见的低外显等位基因也可能与上皮性卵巢癌易感性有关。此种基因和基因座包括:WNT4、RSP01、BCL2L11、HOXD3、HAGLR、TIPARP、SYNPO2、TERT、GPX6、CHMP4C、LINC00824、COL15A1、SMC2-AS1、MLLT10、INCENP、RCCD1、ATAD5、HNF1B、PLEKHM1、SKAP1、ANKLE1、GATAD2A、Cytobands和SNPs2q13 rs752590、4q32.3rs4691139、9p22 rs3814113、9q34.2rs635634、10p11.21 rs1192691和/或19q13.2rs688187 (Reid等人,2017;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

[0177] 预计未来几年,被鉴定为具有遗传风险的年轻妇女人数将会增加。胰腺癌NCCN指南于2019年12月更新以包括建议对所有患者进行ATM、BRCA1、BRCA2、CDKN2A、MSH2、MLH1、MSH2、EPCAM、PALB2、STK11和TP53的种系突变测试。鉴于此基因列表与赋予导致卵巢癌遗传风险的基因重叠,可能会有更多胰腺癌患者的女儿将意识到她们自己患胰腺癌和卵巢癌的遗传风险,将她们从一般风险类别移动到遗传风险类别。此外,最近一项针对乳腺癌患者的成本效益研究得出结论,对美国和英国的所有乳腺癌患者进行BRCA1和/或BRCA2和PALB2的种系突变筛查具有成本效益(Sun,等人,2019;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。将对所有患有乳腺癌的妇女实施种系基因检测纳入实践指南将鉴定其他突变风险携带者,这些携带者的女儿也处于乳腺癌和卵巢癌的遗传风险。目前,没有推荐的妇女(例如,没有遗传风险)卵巢癌筛查测试。在某些实施方案中,本公开尤其提供了需要开发可用于提供卵巢癌风险评估的卵巢癌液体活检测定(例如,如本文所述)的见解。在某些实施方案中,本文所述的测定和/或技术可提供相对于参考阈值(例如,如本文所述)的评分。在某些实施方案中,这样的评分可以是或包括卵巢癌风险评分。在一些实施方案中,这样的评分可以与其他一种或多种卵巢癌筛查评估结合使用,例如像但不限于CA-125测量(例如,CA-125血清水平测量和/或TVUS)和/或提供整体评估的一种或多种卵巢癌相关风险因素。

[0178] 前列腺癌、肺癌、结肠直肠癌和卵巢癌筛查试验 (PLCO) 评估了使用经阴道超声 (TVUS) 和肿瘤标记物 CA-125 中的固定切点 ( $\geq 35 \text{U/mL}$ ) 进行早期检测, 在长达 19 年的随访后, 并未观察到卵巢癌死亡率降低。英国卵巢癌筛查合作试验评估了与并入 CA-125 水平变化的风险算法组合的 TVUS, 并发现 15 年后平均风险妇女的死亡率降低。尽管存在争议, 但美国预防服务工作组 (USPSTF) 继续建议不要在一般群体中筛查卵巢癌, 推断有足够的证据表明每年筛查不会降低卵巢癌死亡率, 并且可能导致重大危害, 主要是对未患卵巢癌的妇女的手术干预。

[0179] 在某些实施方案中, 本公开尤其提供了以下见解: 需要开发用于筛查具有卵巢癌遗传风险的妇女和/或可能经历一种或多种卵巢癌相关症状的妇女的卵巢癌液体活检测定。在某些实施方案中, 本公开内容提供了一种见解, 即需要开发用于筛查有症状或无症状妇女的卵巢癌液体活检测定, 例如在其他筛查方法 (例如 TVUS) 之前。在某些实施方案中, 本公开内容提供了一种见解, 即需要开发用于筛查无症状妇女的卵巢癌液体活检测定, 例如在其他筛查方法例如 TVUS 之前。在某些实施方案中, 本公开提供了一种见解, 即需要开发用于筛查具有卵巢癌平均风险的妇女的卵巢癌液体活检测定。在某些实施方案中, 本公开提供了一种见解, 即需要开发用于筛查具有卵巢癌生活史相关风险的妇女的卵巢癌液体活检测定。在某些实施方案中, 本公开提供了一种见解, 即需要开发用于筛查绝经后妇女 (例如, 可能正在经历卵巢癌相关的一种或多种症状的绝经后妇女) 的卵巢癌液体活检测定。尽管是所有癌症中妇女的第五大杀手 (Howlader 等人, 2019; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文), 但目前没有推荐用于平均风险妇女的卵巢癌筛查工具, 而目前的对处于遗传风险的妇女和/或可能经历卵巢癌症状的妇女进行 I 期和 II 期疾病的护理筛查测定的标准 (例如, TVUS 和血清标记物 CA-125 水平) 表现出低灵敏度 (约 20%) 和低特异性 (NCCN, 2019; Buys 等人, 2011; 其出于本文所述目的各自以引用的方式并入本文)。这些低的灵敏度和特异性对有效和及时的诊断造成了阻碍。鉴于有平均风险的妇女的卵巢癌发病率, 测试特异性不足 (例如,  $< 99.5\%$ ) 导致假阳性结果数量超过真阳性多于一个数量级。这给医疗保健系统和接受筛查的妇女带来了沉重负担, 因为假阳性结果会导致额外的测试、不必要的手术和情绪/身体困扰 (Buys 等人, 2011; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

[0180] 在一些实施方案中, 本公开提供了一种见解, 即特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是: (1) 最小化假阳性的数量的超高特异性 ( $> 98\%$ ), 和 (2) 对于 I 期和 II 期卵巢癌 (即, 当预后最有利时) 的高灵敏度 ( $> 40\%$ )。例如, 在一些实施方案中, 特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是  $> 98\%$  的特异性和  $> 50\%$  的灵敏度, 例如对于 I 期和 II 期卵巢癌。在一些实施方案中, 特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是  $> 98\%$  的特异性和  $> 60\%$  的灵敏度, 例如对于 I 期和 II 期卵巢癌。在一些实施方案中, 特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是  $> 98\%$  的特异性和  $> 70\%$  的灵敏度, 例如对于 I 期和 II 期卵巢癌。在一些实施方案中, 特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是  $> 99.5\%$  的特异性和  $> 65\%$  的灵敏度, 例如对于 I 期和 II 期卵巢癌。在一些实施方案中, 特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是  $> 99.5\%$  的特异性和  $> 60\%$  的灵敏度, 例如对于 I 期和 II 期卵巢癌。

[0181] 在一些实施方案中, 本公开提供了一种见解, 即与通过一组生物标记物组合来实施的卵巢癌筛查测试相比, 涉及多于一组生物标记物组合 (例如, 如本文所述的至少两种正交生物标记物组合) 的卵巢癌筛查测试可增加此种测定的灵敏度。例如, 在一些实施方案

中,涉及至少两种正交生物标记物组合的卵巢癌筛查测试可实现至少98%的特异性和至少50%的灵敏度。在一些实施方案中,涉及至少两种正交生物标记物组合的卵巢癌筛查测试可实现至少98%的特异性和至少60%的灵敏度。

[0182] 在一些实施方案中,本公开提供了一种见解,即特别有用的卵巢癌筛查测试的特征可以是以经济合理的成本获得可接受的阳性预测值(PPV)。PPV是患者在测试呈阳性后患有疾病的可能性,并且PPV受灵敏度、特异性和/或疾病患病率的影响。临床医生对筛查卵巢癌所需的最低PPV的共识是10% (Nossov等人,2008;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。PPV为10%时,对每一个真阳性将有九个假阳性。这些假阳性给医疗保健系统和接受筛查的妇女带来了沉重负担,因为这些假阳性导致额外的测试、不必要的手术以及情绪和身体困扰(Buys等人,2011;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,本文所述的测定(具有对于有卵巢癌遗传风险的妇女至少为98%的特异性截止值,或者具有对于经历卵巢癌相关的一种或多种症状的妇女至少为99.5%的特异性截止值)对于实现大于10%或更高(包括,例如大于15%、大于20%或大于25%或更高)的PPV的早期卵巢癌检测特别有用。

[0183] 在一些实施方案中,本文所述的测定可用于实现大于2%或更高(包括,例如大于3%、大于4%、大于5%、大于6%、大于7%、大于8%、大于9%、大于10%、大于15%、大于20%或大于25%或更高)的PPV的早期卵巢癌检测。在一些此类实施方案中,本文所述的测定可实现至少95%或更高(例如,对于处于卵巢癌遗传风险的妇女至少为98%的特异性截止值,或具有对于经历一种或多种卵巢癌相关的症状的妇女至少99.5%的特异性截止值)的特异性截止值。

[0184] 已经针对卵巢癌液体活检测定研究了几种不同的生物标记物类别,包括循环肿瘤DNA(ctDNA)、循环肿瘤细胞(CTC)、批量蛋白质和细胞外囊泡(EV)。相对于ctDNA和CTC,EV由于其在血流中的丰度和稳定性而特别有希望,这表明EV对早期癌症的灵敏度有所提高。此外,EV含有源自同一细胞的货物(即,蛋白质、RNA、代谢物),从而提供优于批量蛋白质测量的特异性。虽然已经研究了EV的诊断效用,但大部分工作都与批量EV测量或低通量单EV分析有关。

[0185] II.提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征

[0186] 本公开尤其提供了卵巢癌的各种靶生物标记物或其组合(例如,靶生物标记物特征)。此种被预测对卵巢癌表现出高灵敏度和特异性的靶生物标记物特征通过多管齐下的生物信息学分析和生物学方法被发现,例如,在一些实施方案中,所述方法涉及不同数据集的计算分析,例如在一些实施方案中,所述数据集包括测序数据、表达数据、质谱、组织学、翻译后修饰数据和/或通过机器学习和/或计算建模的体外和/或体内实验数据中的一个或多个。

[0187] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包括至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,存在于与卵巢癌相关的细胞外囊泡中的表面多肽)和选自由以下组成的组的至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)靶生物标记物:一个或多个表面蛋白生物标记物、一个或多个囊泡内蛋白生物标记物和一个或多个囊泡内RNA生物标记物,使得此种细胞外囊泡相关膜结合多肽和此种靶生物标记物的组合呈现卵巢癌的靶生物标记物特征,所述组合提供(a)最小化假阳性数量

的高特异性(例如,大于98%或更高,诸如大于99%,或大于99.5%),和(b)对预后最有利的I期和II期卵巢癌的高灵敏度(例如,大于40%、大于50%、大于60%、大于70%、大于80%)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,存在于与卵巢癌相关的细胞外囊泡中的表面多肽)和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:一个或多个表面蛋白生物标记物、一个或多个囊泡内蛋白生物标记物和一个或多个囊泡内RNA生物标记物,使得此种细胞外囊泡相关膜结合多肽和此种靶生物标记物的组合呈现卵巢癌的靶生物标记物特征,所述组合提供至少15%或更高、至少20%或更高、至少25%或更高和/或至少30%或更高的阳性预测值(PPV)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,存在于与卵巢癌相关的细胞外囊泡中的表面多肽)和选自以下组成的组的至少一个靶生物标记物:一个或多个表面蛋白生物标记物、一个或多个囊泡内蛋白生物标记物和一个或多个囊泡内RNA生物标记物,使得此种细胞外囊泡相关膜结合多肽和此种靶生物标记物的组合呈现卵巢癌的靶生物标记物特征,所述组合提供大于2%或更高,包括例如大于3%、大于5%、大于7%、大于10%、大于15%或更高、大于20%或更高、大于25%或更高和/或大于30%或更高的阳性预测值(PPV)。

[0188] 在一些实施方案中,本公开内容认识到,在某些实施方案中,对具有不同卵巢风险水平的妇女的灵敏度和特异性率可根据主治医师的风险承受能力和/或关注的医联体提出的指导而变化。在某些实施方案中,具有卵巢癌遗传风险的妇女可在99.5%的特异性率和70%的灵敏度或98%的特异性率和80%的灵敏度下得到最佳对待。在某些实施方案中,绝经后无症状的妇女可在99.5%的特异性率和70%的灵敏度或98%的特异性率和80%的灵敏度下得到最佳对待。在某些实施方案中,绝经后有症状的妇女可在99.5%的特异性率和70%的灵敏度或98%的特异性率和80%的灵敏度下得到最佳对待。在某些实施方案中,具有生活史风险的妇女可在99.5%的特异性率和70%的灵敏度或98%的特异性率和80%的灵敏度下得到最佳对待。在一些实施方案中,本文所述的用于检测有症状妇女的卵巢癌的技术和/或测定可具有比检测无症状妇女的卵巢癌更低的灵敏度和/或特异性要求。在一些实施方案中,本文所述的用于检测有症状妇女的卵巢癌的测定可具有低于99.5%特异性的设定特异性率,包括例如低于99%的灵敏度、低于95%、低于90%或低于85%的特异性率。在一些实施方案中,本文所述的用于检测有症状妇女的卵巢癌的测定可具有低于80%灵敏度的设定灵敏度率,包括例如低于70%或低于60%的灵敏度率。

[0189] 在一些实施方案中,包括在卵巢癌的靶生物标记物特征中的细胞外囊泡相关膜结合多肽是或包含水通道蛋白-5(AQP5)多肽、钙粘蛋白-6(CDH6)多肽、软骨凝集蛋白(CHODL)多肽、密蛋白-3(CLDN3)多肽、密蛋白-6(CLDN6)多肽、密蛋白-16(CLDN16)多肽、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、叶酸受体 $\alpha$ (FOLR1)多肽、5-羟色胺受体3A(HTR3A)多肽、含LEM结构域1(LEMD1)多肽、富含亮氨酸重复跨膜神经蛋白1(LRRTM1)多肽、粘蛋白16(MUC16)多肽、钠依赖性磷酸转运蛋白2B(SLC34A2)多肽、碱性磷酸酶(ALPL)多肽、骨髓基质细胞抗原2(BST2)多肽、小细胞肺癌簇4抗原(CD24)多肽、间皮素(MSLN)多肽、粘蛋白1(MUC1)多肽、前列腺素内过氧化物合酶1(PTGS1)多肽、ST14跨膜丝氨酸蛋白酶蛋白裂解酵素(ST14)多肽、癌症相关sialyl-Thompsons-nouvelle(Tn)(sTn)多肽糖基化、肿瘤相关钙信号转导2(TACSTD2)多肽、基底细胞粘附分子(BCAM)多肽、CD74抗原(CD74)多肽、淋巴细胞抗原6家族

成员E (LY6E) 多肽、溶质载体家族2成员1 (SLC2A1) 多肽、C-X-C基序趋化因子受体4 (CXCR4) 多肽、盘状结构域受体酪氨酸激酶1 (DDR1) 多肽、肝配蛋白B1 (EFNB1) 多肽、缺口 (notch) 受体3 (NOTCH3) 多肽、神经丛素B1 (PLXNB1) 多肽、丝氨酸肽酶抑制剂kunitz型2 (SPINT2) 多肽、TNF受体超家族成员12A (TNFRSF12A) 多肽或其组合。

[0190] 在一些实施方案中,包括在卵巢癌的靶生物标记物特征中的靶生物标记物是或包含选自以下组成的组的表面蛋白生物标记物:水通道蛋白-5 (AQP5) 多肽、钙粘蛋白-6 (CDH6) 多肽、软骨凝集蛋白 (CHODL) 多肽、密蛋白-3 (CLDN3) 多肽、密蛋白-6 (CLDN6) 多肽、密蛋白-16 (CLDN16) 多肽、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、叶酸受体1 (FOLR1) 多肽、5-羟色胺受体3A (HTR3A) 多肽、含LEM结构域1 (LEMD1) 多肽、富含亮氨酸重复跨膜神经元蛋白1 (LRRTM1) 多肽、粘蛋白16 (MUC16) 多肽、钠依赖性磷酸转运蛋白2B (SLC34A2) 多肽、碱性磷酸酶 (ALPL) 多肽、骨髓基质细胞抗原2 (BST2) 多肽、小细胞肺癌簇4抗原 (CD24) 多肽、间皮素 (MSLN) 多肽、粘蛋白1 (MUC1) 多肽、前列腺素内过氧化物合酶1 (PTGS1) 多肽、ST14跨膜丝氨酸蛋白酶蛋白裂解酵素 (ST14) 多肽、癌症相关sialyl-Tn (sTn) 多肽糖基化、肿瘤相关钙信号转导2 (TACSTD2) 多肽、基底细胞粘附分子 (BCAM) 多肽、CD74抗原 (CD74) 多肽、淋巴细胞抗原6家族成员E (LY6E) 多肽、溶质载体家族2成员1 (SLC2A1) 多肽、C-X-C基序趋化因子受体4 (CXCR4) 多肽、盘状结构域受体酪氨酸激酶1 (DDR1) 多肽、肝配蛋白B1 (EFNB1) 多肽、缺口 (notch) 受体3 (NOTCH3) 多肽、神经丛素B1 (PLXNB1) 多肽、丝氨酸肽酶抑制剂kunitz型2 (SPINT2) 多肽、TNF受体超家族成员12A (TNFRSF12A) 多肽或其组合。

[0191] 在一些实施方案中,包括在卵巢癌的靶生物标记物特征中的胞外囊泡相关膜结合多肽是或包含水通道蛋白-5 (AQP5) 多肽、钙粘蛋白-6 (CDH6) 多肽、软骨凝集蛋白 (CHODL) 多肽、密蛋白-3 (CLDN3) 多肽、密蛋白-6 (CLDN6) 多肽、密蛋白-16 (CLDN16) 多肽、上皮细胞粘附分子 (EpCAM)、叶酸受体 $\alpha$  (FOLR1) 多肽、5-羟色胺受体3A (HTR3A) 多肽、含LEM结构域1 (LEMD1) 多肽、富含亮氨酸重复跨膜神经元蛋白1 (LRRTM1) 多肽、粘蛋白16 (MUC16) 多肽、钠依赖性磷酸转运蛋白2B (SLC34A2) 多肽或其组合。

[0192] 在一些实施方案中,靶生物标记物特征可包括如表1中描述的组合的靶标,其中靶标可用在捕获探针和/或检测探针中。在一些实施方案中,靶生物标记物特征可包括如表1中描述的捕获探针的靶标和至少一个或多个(包括,例如至少两个或更多个)检测探针(例如,检测探针1和/或检测探针2)的靶标。仅举例来说,在一些实施方案中,靶生物标记物特征可包括ALPL(表1中描述的捕获探针的靶标)、sTn(表1中描述的检测探针1或2的靶标)和FOLR1(表1中描述的检测探针1或2的靶标)。在一些实施方案中,靶生物标记物特征可包括如表1中描述的捕获探针和检测探针的组合的靶标。

[0193] 表1示例性靶生物标记物特征探针组合。

[0194]

| 组合 | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|----|---------|----------|----------|
| 1  | ALPL    | sTn      | sTn      |
| 2  | ALPL    | FOLR1    | FOLR1    |
| 3  | BST2    | FOLR1    | FOLR1    |
| 4  | BST2    | MSLN     | MSLN     |
| 5  | BST2    | sTn      | sTn      |
| 6  | BST2    | MUC16    | MUC16    |
| 7  | FOLR1   | MUC1     | MUC1     |
| 8  | FOLR1   | TACSTD2  | TACSTD2  |
| 9  | FOLR1   | FOLR1    | MUC16    |
| 10 | FOLR1   | FOLR1    | MSLN     |
| 11 | FOLR1   | SLC2A1   | SLC2A1   |
| 12 | FOLR1   | FOLR1    | BST2     |
| 13 | FOLR1   | SLC34A2  | FOLR1    |
| 14 | FOLR1   | FOLR1    | TACSTD2  |
| 15 | FOLR1   | FOLR1    | CD24     |
| 16 | FOLR1   | FOLR1    | SLC2A1   |
| 17 | FOLR1   | FOLR1    | sTn      |
| 18 | FOLR1   | FOLR1    | ALPL     |
| 19 | FOLR1   | MUC16    | FOLR1    |
| 20 | FOLR1   | sTn      | sTn      |
| 21 | FOLR1   | MSLN     | MSLN     |
| 22 | FOLR1   | MUC16    | MUC16    |
| 23 | FOLR1   | FOLR1    | MUC1     |
| 24 | MSLN    | SLC34A2  | MSLN     |
| 25 | MSLN    | MSLN     | sTn      |
| 26 | MSLN    | MSLN     | BST2     |

[0195]

| 组合 | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|----|---------|----------|----------|
| 27 | MSLN    | MSLN     | TACSTD2  |
| 28 | MSLN    | sTn      | sTn      |
| 29 | MSLN    | TACSTD2  | TACSTD2  |
| 30 | MSLN    | FOLR1    | MSLN     |
| 31 | MSLN    | MSLN     | SLC2A1   |
| 32 | MSLN    | MUC1     | MSLN     |
| 33 | MSLN    | MSLN     | CD24     |
| 34 | MSLN    | MUC16    | MSLN     |
| 35 | MSLN    | MSLN     | MUC16    |
| 36 | MSLN    | FOLR1    | FOLR1    |
| 37 | MSLN    | MUC16    | MUC16    |
| 38 | MSLN    | MUC1     | MUC1     |
| 39 | MSLN    | SLC2A1   | SLC2A1   |
| 40 | MUC1    | MUC1     | sTn      |
| 41 | MUC1    | MUC16    | MUC16    |
| 42 | MUC1    | FOLR1    | FOLR1    |
| 43 | MUC1    | MUC16    | MUC1     |
| 44 | MUC1    | sTn      | sTn      |
| 45 | MUC1    | FOLR1    | MUC1     |
| 46 | MUC1    | MUC1     | MSLN     |
| 47 | MUC1    | MSLN     | MSLN     |
| 48 | MUC1    | MUC1     | MUC16    |
| 49 | MUC16   | SLC34A2  | MUC16    |
| 50 | MUC16   | MUC16    | TACSTD2  |
| 51 | MUC16   | MUC16    | SLC2A1   |
| 52 | MUC16   | MUC1     | MUC1     |
| 53 | MUC16   | MUC16    | MSLN     |
| 54 | MUC16   | TACSTD2  | TACSTD2  |
| 55 | MUC16   | MSLN     | MSLN     |
| 56 | MUC16   | MUC16    | sTn      |
| 57 | MUC16   | sTn      | sTn      |
| 58 | MUC16   | FOLR1    | FOLR1    |

[0196]

| 组合 | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|----|---------|----------|----------|
| 59 | MUC16   | MUC16    | MUC1     |
| 60 | MUC16   | MUC16    | FOLR1    |
| 61 | MUC16   | MUC16    | MUC16    |
| 62 | MUC16   | MUC16    | BST2     |
| 63 | MUC16   | MUC16    | CD24     |
| 64 | MUC16   | SLC2A1   | SLC2A1   |
| 65 | PTGS1   | FOLR1    | FOLR1    |
| 66 | PTGS1   | sTn      | sTn      |
| 67 | PTGS1   | MSLN     | MSLN     |
| 68 | PTGS1   | MUC16    | MUC16    |
| 69 | SLC34A2 | SLC2A1   | SLC2A1   |
| 70 | SLC34A2 | MSLN     | MSLN     |
| 71 | SLC34A2 | sTn      | sTn      |
| 72 | SLC34A2 | FOLR1    | FOLR1    |
| 73 | SLC34A2 | MUC16    | MUC16    |
| 74 | sTn     | TACSTD2  | TACSTD2  |
| 75 | sTn     | TACSTD2  | sTn      |
| 76 | sTn     | MUC16    | sTn      |
| 77 | sTn     | CD24     | sTn      |
| 78 | sTn     | ALPL     | sTn      |
| 79 | sTn     | SLC34A2  | sTn      |
| 80 | sTn     | BST2     | sTn      |
| 81 | sTn     | SLC2A1   | sTn      |
| 82 | sTn     | SLC2A1   | SLC2A1   |
| 83 | sTn     | MUC16    | MUC16    |
| 84 | sTn     | MUC16    | sTn      |
| 85 | sTn     | MUC1     | sTn      |
| 86 | sTn     | FOLR1    | FOLR1    |
| 87 | sTn     | MUC1     | MUC1     |
| 88 | sTn     | FOLR1    | sTn      |
| 89 | sTn     | MSLN     | sTn      |
| 90 | sTn     | MSLN     | MSLN     |

[0197]

| 组合  | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|-----|---------|----------|----------|
| 91  | TACSTD2 | FOLR1    | TACSTD2  |
| 92  | TACSTD2 | TACSTD2  | MUC16    |
| 93  | TACSTD2 | FOLR1    | FOLR1    |
| 94  | TACSTD2 | MUC16    | TACSTD2  |
| 95  | TACSTD2 | MSLN     | TACSTD2  |
| 96  | TACSTD2 | TACSTD2  | sTn      |
| 97  | TACSTD2 | MSLN     | MSLN     |
| 98  | TACSTD2 | MUC16    | MUC16    |
| 99  | TACSTD2 | sTn      | sTn      |
| 100 | SLC34A2 | SLC34A2  | SLC34A2  |
| 101 | SLC34A2 | SLC34A2  | MUC16    |
| 102 | SLC34A2 | SLC34A2  | FOLR1    |
| 103 | SLC34A2 | SLC34A2  | CLDN3    |
| 104 | SLC34A2 | SLC34A2  | CLDN6    |
| 105 | SLC34A2 | SLC34A2  | AQP5     |
| 106 | SLC34A2 | MUC16    | MUC16    |
| 107 | SLC34A2 | MUC16    | FOLR1    |
| 108 | SLC34A2 | MUC16    | CLDN3    |
| 109 | SLC34A2 | MUC16    | CLDN6    |
| 110 | SLC34A2 | MUC16    | AQP5     |
| 111 | SLC34A2 | FOLR1    | FOLR1    |
| 112 | SLC34A2 | FOLR1    | CLDN3    |
| 113 | SLC34A2 | FOLR1    | CLDN6    |
| 114 | SLC34A2 | FOLR1    | AQP5     |
| 115 | SLC34A2 | CLDN3    | CLDN3    |
| 116 | SLC34A2 | CLDN3    | CLDN6    |
| 117 | SLC34A2 | CLDN3    | AQP5     |
| 118 | SLC34A2 | CLDN6    | CLDN6    |
| 119 | SLC34A2 | CLDN6    | AQP5     |
| 120 | SLC34A2 | AQP5     | AQP5     |
| 121 | MUC16   | SLC34A2  | SLC34A2  |
| 122 | MUC16   | SLC34A2  | MUC16    |

[0198]

| 组合  | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|-----|---------|----------|----------|
| 123 | MUC16   | SLC34A2  | FOLR1    |
| 124 | MUC16   | SLC34A2  | CLDN3    |
| 125 | MUC16   | SLC34A2  | CLDN6    |
| 126 | MUC16   | SLC34A2  | AQP5     |
| 127 | MUC16   | MUC16    | MUC16    |
| 128 | MUC16   | MUC16    | FOLR1    |
| 129 | MUC16   | MUC16    | CLDN3    |
| 130 | MUC16   | MUC16    | CLDN6    |
| 131 | MUC16   | MUC16    | AQP5     |
| 132 | MUC16   | FOLR1    | FOLR1    |
| 133 | MUC16   | FOLR1    | CLDN3    |
| 134 | MUC16   | FOLR1    | CLDN6    |
| 135 | MUC16   | FOLR1    | AQP5     |
| 136 | MUC16   | CLDN3    | CLDN3    |
| 137 | MUC16   | CLDN3    | CLDN6    |
| 138 | MUC16   | CLDN3    | AQP5     |
| 139 | MUC16   | CLDN6    | CLDN6    |
| 140 | MUC16   | CLDN6    | AQP5     |
| 141 | MUC16   | AQP5     | AQP5     |
| 142 | FOLR1   | SLC34A2  | SLC34A2  |
| 143 | FOLR1   | SLC34A2  | MUC16    |
| 144 | FOLR1   | SLC34A2  | FOLR1    |
| 145 | FOLR1   | SLC34A2  | CLDN3    |
| 146 | FOLR1   | SLC34A2  | CLDN6    |
| 147 | FOLR1   | SLC34A2  | AQP5     |
| 148 | FOLR1   | MUC16    | MUC16    |
| 149 | FOLR1   | MUC16    | FOLR1    |
| 150 | FOLR1   | MUC16    | CLDN3    |
| 151 | FOLR1   | MUC16    | CLDN6    |
| 152 | FOLR1   | MUC16    | AQP5     |
| 153 | FOLR1   | FOLR1    | FOLR1    |
| 154 | FOLR1   | FOLR1    | CLDN3    |

[0199]

| 组合  | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|-----|---------|----------|----------|
| 155 | FOLR1   | FOLR1    | CLDN6    |
| 156 | FOLR1   | FOLR1    | AQP5     |
| 157 | FOLR1   | CLDN3    | CLDN3    |
| 158 | FOLR1   | CLDN3    | CLDN6    |
| 159 | FOLR1   | CLDN3    | AQP5     |
| 160 | FOLR1   | CLDN6    | CLDN6    |
| 161 | FOLR1   | CLDN6    | AQP5     |
| 162 | FOLR1   | AQP5     | AQP5     |
| 163 | CLDN3   | SLC34A2  | SLC34A2  |
| 164 | CLDN3   | SLC34A2  | MUC16    |
| 165 | CLDN3   | SLC34A2  | FOLR1    |
| 166 | CLDN3   | SLC34A2  | CLDN3    |
| 167 | CLDN3   | SLC34A2  | CLDN6    |
| 168 | CLDN3   | SLC34A2  | AQP5     |
| 169 | CLDN3   | MUC16    | MUC16    |
| 170 | CLDN3   | MUC16    | FOLR1    |
| 171 | CLDN3   | MUC16    | CLDN3    |
| 172 | CLDN3   | MUC16    | CLDN6    |
| 173 | CLDN3   | MUC16    | AQP5     |
| 174 | CLDN3   | FOLR1    | FOLR1    |
| 175 | CLDN3   | FOLR1    | CLDN3    |
| 176 | CLDN3   | FOLR1    | CLDN6    |
| 177 | CLDN3   | FOLR1    | AQP5     |
| 178 | CLDN3   | CLDN3    | CLDN3    |
| 179 | CLDN3   | CLDN3    | CLDN6    |
| 180 | CLDN3   | CLDN3    | AQP5     |
| 181 | CLDN3   | CLDN6    | CLDN6    |
| 182 | CLDN3   | CLDN6    | AQP5     |
| 183 | CLDN3   | AQP5     | AQP5     |
| 184 | LRRTM1  | SLC34A2  | SLC34A2  |
| 185 | LRRTM1  | SLC34A2  | MUC16    |
| 186 | LRRTM1  | SLC34A2  | FOLR1    |

[0200]

| 组合  | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|-----|---------|----------|----------|
| 187 | LRRTM1  | SLC34A2  | CLDN3    |
| 188 | LRRTM1  | SLC34A2  | CLDN6    |
| 189 | LRRTM1  | SLC34A2  | AQP5     |
| 190 | LRRTM1  | MUC16    | MUC16    |
| 191 | LRRTM1  | MUC16    | FOLR1    |
| 192 | LRRTM1  | MUC16    | CLDN3    |
| 193 | LRRTM1  | MUC16    | CLDN6    |
| 194 | LRRTM1  | MUC16    | AQP5     |
| 195 | LRRTM1  | FOLR1    | FOLR1    |
| 196 | LRRTM1  | FOLR1    | CLDN3    |
| 197 | LRRTM1  | FOLR1    | CLDN6    |
| 198 | LRRTM1  | FOLR1    | AQP5     |
| 199 | LRRTM1  | CLDN3    | CLDN3    |
| 200 | LRRTM1  | CLDN3    | CLDN6    |
| 201 | LRRTM1  | CLDN3    | AQP5     |
| 202 | LRRTM1  | CLDN6    | CLDN6    |
| 203 | LRRTM1  | CLDN6    | AQP5     |
| 204 | LRRTM1  | AQP5     | AQP5     |

[0201] 在一些实施方案中,如表1中描述的可能对卵巢癌检测特别有用(例如,具有更高的灵敏度、特异性和/或PPV)的某些生物标记物组合可使用进展期(例如,晚期例如,III期和/或IV期)卵巢癌样品池和健康对照样品池作为参考进行初始轮筛查。在一些实施方案中,可使用早期卵巢癌样品池(例如,I期和/或II期,任选地通过低或高CA-125含量区分)、良性妇科肿瘤血浆样品池(例如,如本文所述)、非卵巢癌样品池(例如,如本文所述)和/或其任何组合进一步测试选择的组合。在一些实施方案中,可通过计算健康样品池和卵巢癌样品池之间的测定信号差异(例如,基于Ct)来确定生物标记物组合性能。

[0202] 在一些实施方案中,可用大于组间变异性的 $\Delta C_t$ 的选择某些用于卵巢癌检测的生物标记物组合。例如,在一些实施方案中,具有大于2.0(对应于四倍差值)或1.0(对应于两倍差值)的 $\Delta C_t$ 的生物标记物组合被认为提供了特别有效的诊断效用(例如,提供大于组间变异性的信号)。参见例如实施例7,其提供了本文所述的某些组合的示例性分析。

[0203] 在一些实施方案中,包括在卵巢癌的靶生物标记物特征中的靶生物标记物是或包含选自自由以下组成的组的囊泡内蛋白质生物标记物:细胞视黄酸结合蛋白2(CRABP2)多肽、激肽释放酶-7(KLK7)多肽、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)多肽、黑素瘤中优先表达抗原(PRAME)多肽、S100钙结合蛋白A1(S100A1)多肽及其组合。

[0204] 在一些实施方案中,包括在卵巢癌的靶生物标记物特征中的靶生物标记物是或包含选自自由以下组成的组的囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物:CLDN6 RNA、CRABP2 RNA、

KLK7 RNA、MIF RNA、PRAME RNA、S100A1 RNA及其组合。

[0205] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)表面蛋白生物标记物(例如,本文所述的那些)。在一些此类实施方案中,细胞外囊泡相关膜结合多肽和至少一个表面蛋白生物标记物是相同的。例如,在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是MUC16多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是MUC16多肽)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是FOLR1多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是FOLR1多肽)。

[0206] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征的至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和至少一个表面蛋白生物标记物是不同的。例如,在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是或包含FOLR1多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是或包含CLDN3多肽、CLDN6多肽和/或SLC34A2多肽)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是或包含MUC16多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是或包含CLDN3多肽、CLDN6多肽和/或FOLR1多肽)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是或包含SLC34A2多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是或包含MUC16多肽和/或FOLR1多肽)。在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽(其是或包含LRRTM1多肽),和至少一个表面蛋白生物标记物(其是或包含MUC16多肽)。

[0207] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)囊泡内蛋白生物标记物(例如,本文所述的那些)。在一些此类实施方案中,一个或多个细胞外囊泡相关膜结合多肽和一个或多个囊泡内蛋白生物标记物可由相同的基因编码,而前者在细胞外囊泡的膜中表达,并且后者在细胞外囊泡内表达。在一些此类实施方案中,一个或多个细胞外囊泡相关膜结合多肽和一个或多个囊泡内蛋白生物标记物可由不同的基因编码。

[0208] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,本文所述的那些)和至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8个或更多个)囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物(例如,本文所述的那些)。在一些此类实施方案中,一个或多个细胞外囊泡相关膜结合多肽和一个或多个囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物可由相同的基因编码。在一些此类实施方案中,一个或多个细胞外囊泡相关膜结合多肽和一个或多个囊泡内RNA(例如,mRNA)生物标记物可由不同的基因编码。

[0209] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶标生物标记物特征可以是或包含如表3-5中所述的组合的靶标。在某些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征是区分晚期卵巢癌样品与对照样品(例如,与健康样品相比,与良性妇科肿瘤样品相比,和/或其他癌症样品相比;参见例如,表3-5)的特征。在某些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征是区分早期卵巢癌样品(例如,具有低和/或高血清CA-125)与对照样品(例如,与健康样品相比,与良性妇

科肿瘤样品相比,和/或与其他癌症样品相比;参见例如,表3-5)的特征。在一些实施方案中,针对卵巢癌的靶生物标记物特征的检测的测定可包括如表3-5中所述的捕获和检测探针的组合。

[0210] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和一个MUC16多肽(作为靶表面蛋白生物标记物)。

[0211] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和一个FOLR1多肽(作为靶表面蛋白生物标记物)。

[0212] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0213] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和一个MUC16多肽(作为靶表面蛋白生物标记物)。

[0214] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN6多肽。

[0215] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含SLC34A2多肽和FOLR1多肽。

[0216] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN3多肽。

[0217] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和CLDN3多肽。

[0218] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0219] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含AQP5多肽。

[0220] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和AQP5多肽。

[0221] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和CLDN6多肽。

[0222] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含SLC34A2多肽和CLDN3多肽。

[0223] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细

胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含SLC34A2多肽和MUC16多肽。

[0224] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0225] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0226] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和CLDN3多肽。

[0227] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和AQP5多肽。

[0228] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含CLDN6多肽。

[0229] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0230] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN3多肽。

[0231] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个LRRTM1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0232] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0233] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含SLC34A2多肽和MUC16多肽。

[0234] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN3多肽。

[0235] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0236] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细

胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0237] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN3多肽。

[0238] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN3多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和CLDN6多肽。

[0239] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个CLDN6多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0240] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个ALPL多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0241] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个BST2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0242] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽。

[0243] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个FOLR1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0244] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0245] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽。

[0246] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含SLC2A1多肽。

[0247] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含sTn糖基化多肽。

[0248] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1 6多肽。

[0249] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0250] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含sTn糖基化多肽。

[0251] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个PTGS1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0252] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽。

[0253] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽。

[0254] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽。

[0255] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少一个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含sTn糖基化多肽。

[0256] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和sTn糖基化多肽。

[0257] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和sTn糖基化多肽。

[0258] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和sTn糖基化多肽。

[0259] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和sTn糖基化多肽。

[0260] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MUC1多肽。

[0261] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MSLN多肽。

[0262] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0263] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和MSLN多肽。

[0264] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和FOLR1多肽。

[0265] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个TACSTD多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和FOLR1多肽。

[0266] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和sTn糖基化多肽。

[0267] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MSLN多肽。

[0268] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0269] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和sTn糖基化多肽。

[0270] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和sTn糖基化多肽。

[0271] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC1多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和FOLR1多肽。

[0272] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和sTn糖基化多肽。

[0273] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和sTn糖基化多肽。

[0274] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和sTn糖基化多肽。

[0275] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和MSLN多肽。

[0276] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和FOLR1多肽。

[0277] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MUC16多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和FOLR1多肽。

[0278] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MUC1多肽。

[0279] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MSLN多肽。

[0280] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0281] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和MSLN多肽。

[0282] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和FOLR1多肽。

[0283] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个sTn糖基化多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MSLN多肽和FOLR1多肽。

[0284] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和sTn糖基化多肽。

[0285] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MUC1多肽。

[0286] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和FOLR1多肽。

[0287] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和sTn糖基化多肽。

[0288] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和sTn糖基化多肽。

[0289] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个MSLN多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC1多肽和FOLR1多肽。

[0290] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和MSLN多肽。

[0291] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含MUC16多肽和sTn糖基化多肽。

[0292] 在一些实施方案中,卵巢癌的靶生物标记物特征包含至少一个SLC34A2多肽(作为细胞外囊泡相关膜结合多肽)和至少两个靶表面蛋白生物标记物,其可以是或包含FOLR1多肽和sTn糖基化多肽。

[0293] 在一些实施方案中,可通过野生型形式的蛋白质和/或RNA(例如,mRNA)表达水平来检测和/或测量所提供的生物标记物中的任何一个。

[0294] 在一些实施方案中,可通过突变型形式的蛋白质和/或RNA(例如,mRNA)表达水平来检测和/或测量所提供的生物标记物中的任何一个。因此,在一些实施方案中,可以包括对所提供的生物标记物(例如,蛋白质和/或RNA,例如像mRNA)的突变型特异性检测。

[0295] 如本文所提到的,在一些实施方案中,生物标记物是或包含一种或多种多肽或蛋白质的特定形式(例如,替代形式、截短形式、修饰形式诸如糖基化、磷酸化、脂化形式等)。在一些实施方案中,此种形式的检测检测以该形式存在的多个(并且,在一些实施方案中,基本上所有)多肽(例如,含有特定修饰,诸如像特定糖基化,例如sialyl-Tn(sTn)糖基化,例如含有与GalNAc $\alpha$ -O-Ser/Thr连接的唾液酸 $\alpha$ -2,6的截短的O-聚糖)。

[0296] 因此,在一些实施方案中,表面蛋白生物标记物可以是或包含糖基化部分(例如,sTn部分)。汤普森-努维尔(Thompson-nouvelle)(Tn)抗原是被认为与多种肿瘤有关的O-连接聚糖。Tn是添加到Ser或Thr上作为主要O-连接糖基化途径的第一步的单个 $\alpha$ -连接GalNAc。在一些实施方案中,表面蛋白生物标记物可以是或包含肿瘤相关的翻译后修饰。在一些实施方案中,此种翻译后修饰可以是或包括肿瘤特异性糖基化模式,诸如具有在初始GalNAc(例如,Tn)处异常截短的聚糖的粘蛋白或其组合。

[0297] 在一些实施方案中,生物标记物是或包含多肽的截短形式。例如,在一些实施方案中,MUC16生物标记物是MUC16蛋白的截短形式。

[0298] III. 检测所提供的卵巢癌的标记物和/或靶生物标记物特征的示例性方法

[0299] 一般来讲,本公开提供了在包含来自有需要的受试者的细胞外囊泡的血液衍生样品中分析和/或评估靶生物标记物特征所根据的技术;在一些实施方案中,基于此类分析和/或评估做出诊断或治疗决定。

[0300] 在一些实施方案中,检测靶生物标记物特征的方法包括用于检测作为蛋白质的靶生物标记物特征的一个或多个所提供的标记物的方法。检测一个或多个所提供的标记物的示例性基于蛋白质的方法包括但不限于邻近连接测定、质谱(MS)和免疫测定,诸如免疫沉淀;蛋白质印迹;ELISA;免疫组化;免疫细胞化学;流式细胞术;和免疫PCR。在一些实施方案中,免疫测定可为化学发光免疫测定。在一些实施方案中,免疫测定可为高通量和/或自动

化免疫测定平台。

[0301] 在一些实施方案中,在样品中检测作为蛋白质的一个或多个所提供的标记物的方法包括使样品与针对关注的所提供的标记物的一种或多种抗体剂接触。在一些实施方案中,此类方法还包括使样品与一个或多个检测标记接触。在一些实施方案中,抗体剂用一个或多个检测标记进行标记。

[0302] 在一些实施方案中,检测关注的生物标记物和针对关注的生物标记物的抗体剂之间的结合包括确定一种或多种检测剂的吸光度值或发射值。例如,吸光度值或发射值指示由细胞外囊泡表达的关注的生物标记物的量和/或浓度(例如,较高的吸光度指示由细胞外囊泡表达的关注的生物标记物的水平较高)。在一些实施方案中,检测剂的吸光度值或发射值高于阈值。在一些实施方案中,检测剂的吸光度值或发射值为阈值的至少1.3倍、至少1.4倍、至少1.5倍、至少1.6倍、至少1.7倍、至少1.8倍、至少1.9倍、至少2.0倍、至少2.5倍、至少3.0倍、至少3.5倍或更大。在一些实施方案中,阈值是在对照组或参考组(例如,非癌症受试者)群体中确定的。

[0303] 在一些实施方案中,检测一个或多个所提供的标记物的方法包括用于检测作为核酸的一个或多个所提供的标记物的方法。检测一个或多个所提供的标记物的示例性基于核酸的方法包括但不限于进行核酸扩增方法,诸如聚合酶链反应(PCR)、逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、转录介导的扩增(TMA)、连接酶链反应(LCR)、链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。在一些实施方案中,检测一个或多个所提供的标记物的基于核酸的方法包括检测一个或多个核酸探针与编码关注的生物标记物的一个或多个核苷酸之间的杂交。在一些实施方案中,核酸探针各自与编码关注的生物标记物的一个或多个核苷酸中的一个的至少一部分互补。在一些实施方案中,编码关注的生物标记物的核苷酸包括DNA(例如,cDNA)。在一些实施方案中,编码关注的生物标记物的核苷酸包括RNA(例如,mRNA)。

[0304] 在一些实施方案中,检测一个或多个所提供的标记物的方法涉及邻近连接免疫定量聚合酶链反应(pliq-PCR)。与其他技术相比,pliq-PCR在分析EV方面可具有某些优点。例如,pliq-PCR可具有比其他标准免疫测定(诸如ELISA)高三个数量级的灵敏度(Darmanis等人,2010;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,pliq-PCR反应可被设计成具有超低LOD,这使得能够检测到痕量水平的肿瘤来源的EV,例如低至1000EV/mL。

[0305] 在一些实施方案中,用于检测一个或多个所提供的标记物的方法可涉及用于检测EV的其他技术,包括例如纳米胞质外泌体(nPLEX)传感器(Im等人,2014;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)和集成磁-电化学外泌体(iMEX)传感器(Jeong等人,2016;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文),所述技术分别报告了约 $10^3$ 的LOD和约 $10^4$ 的EV(Shao等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

[0306] 在一些实施方案中,用于检测细胞外囊泡中的一个或多个所提供的生物标记物的方法可基于批量EV样品分析。

[0307] 在一些实施方案中,用于检测细胞外囊泡中一个或多个所提供的生物标记物的方法可基于分析单独的EV(例如,单个EV谱测定),这在下面的标题为“用于分析个体细胞外囊泡(EV)的示例性方法”的部分中进一步讨论。

[0308] 在一些实施方案中,在检测根据本公开的一个或多个所提供的生物标记物之前,

样品中的细胞外囊泡可捕获或固定在固体基底上。在一些实施方案中,细胞外囊泡可通过非特异性相互作用(包括例如吸附)捕获在固体基底表面上。在一些实施方案中,细胞外囊泡可选择性地捕获在固体基底表面上。例如,在一些实施方案中,固体基底表面可涂覆有特异性结合细胞外囊泡的剂(例如,特异性靶向例如与卵巢癌相关的细胞外囊泡的抗体剂)。在一些实施方案中,固体基底表面可涂覆有亲和结合对的成员,并且待捕获的关注的实体(例如,细胞外囊泡)可缀合至亲和结合对的互补成员。在一些实施方案中,示例性亲和结合对包括例如但不限于生物素和抗生物素蛋白样分子,诸如链霉亲和素。如本领域技术人员将理解的,其他适当的亲和结合对也可用于促进将关注的实体捕获到固体基底表面上。在一些实施方案中,关注的实体可通过施加电流而捕获到固体基底表面上,例如,如描述于Ibsen等人ACS Nano.,11:6641-6651(2017)和Lewis等人ACS Nano.,12:3311-3320(2018),两者出于本文所述目的以引用的方式并入本文,并且两者都描述了使用交流电动微阵列芯片装置从未稀释的人血液或血浆样品中分离细胞外囊泡。

[0309] 固体基底可以适合于捕获细胞外囊泡并且不干扰下游处理、加工和/或检测的形式提供。例如,在一些实施方案中,固体基底可以是或包含珠(例如,磁珠)。在一些实施方案中,固体基底可以是或包含表面。例如,在一些实施方案中,此种表面可为测定室(包括例如管、孔、微孔、板、过滤器、膜、基质等)的捕获表面。因此,在一些实施方案中,本文所述的方法包括在检测样品中提供的生物标记物之前,将细胞外囊泡捕获或固定到固体基底上。

[0310] 在一些实施方案中,在将细胞外囊泡捕获到固体基底表面上之前,可处理样品,以例如去除不需要的实体,诸如细胞碎片或细胞。例如,在一些实施方案中,可对此种样品进行离心,以例如去除细胞碎片、细胞和/或其他颗粒。另外或替代地,在一些实施方案中,可对此种样品进行基于尺寸排阻的纯化或过滤。各种基于尺寸排阻的纯化或过滤是本领域已知的,并且本领域技术人员将理解,在一些情况下,可基于特定分子量或粒径截止值对样品进行离心柱纯化。本领域技术人员还将理解,可例如基于细胞外囊泡的大小来选择用于纯化目的的适当分子量或粒径截止值。例如,在一些实施方案中,尺寸排阻分离方法可应用于包含细胞外囊泡的样品以分离具有某一尺寸(例如,大于30nm且不超过1000nm或大于70nm且不超过200nm)的细胞外囊泡的一部分。通常,细胞外囊泡的直径可在30nm至几微米的范围内。参见例如,Chuo等人,“Imaging extracellular vesicles:current and emerging methods”Journal of Biomedical Sciences 25:91(2018)(其出于本文所述目的以引用的方式并入本文),其提供不同细胞外囊泡(EV)亚型的大小信息:迁移小体(0.5 $\mu$ m至3 $\mu$ m)、微囊泡(0.1 $\mu$ m至1 $\mu$ m)、原癌小体(1 $\mu$ m至10 $\mu$ m)、外泌颗粒(exomere)( $<50$ nm)、小外泌体(60nm至80nm)和大外泌体(90nm至120nm)。在一些实施方案中,大小范围为约30nm至1000nm的纳米颗粒可被分离(例如,在一些实施方案中,通过一种或多种尺寸排阻分离方法)用于检测测定。在一些实施方案中,特定EV亚型可被分离(例如,在一些实施方案中,通过一种或多种尺寸排阻分离方法)用于检测测定。

[0311] 在一些实施方案中,可在检测卵巢癌的靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物之前处理样品中的细胞外囊泡。可进行不同的样品处理和/或制备以例如稳定待检测的细胞外囊泡中的靶标(例如,靶生物标记物),和/或促进靶标(例如,囊泡内蛋白质和/或RNA,诸如mRNA)暴露于检测测定(例如,如本文所述),和/或减少非特异性结合。此类样品处理和/或制备的实例是本领域已知的,并且包括但不限于交联分子靶标(例如,固

定)、使生物实体(例如,细胞或细胞外囊泡)透化和/或封闭非特异性结合位点。

[0312] 在一个方面,本公开提供了一种用于检测卵巢癌的靶生物标记物特征是否存在于来自有需要的受试者的生物样品中的方法,所述生物样品在一些实施方案中可为包含细胞外囊泡的血液来源的样品。在一些实施方案中,此种方法包括(a)在生物样品诸如来自受试者的血液来源的样品(例如,血浆样品)中检测表达卵巢癌的靶生物标记物特征的关注的生物实体(包括例如细胞外囊泡);以及(b)将指示生物样品(例如,血液来源的样品)中表达靶生物标记物特征的关注的生物实体(例如,细胞外囊泡)的水平的样品信息与包括参考阈值水平的参考信息进行比较。在一些实施方案中,参考阈值水平对应于在来自参考受试者(例如,非癌症受试者)群体的可比样品中表达此种靶生物标记物特征的关注的生物实体(例如,细胞外囊泡)的水平。在一些实施方案中,示例性非癌症受试者包括健康女性受试者(例如,特定年龄范围(例如,低于55岁或高于55岁)的健康女性受试者)、患有非卵巢相关健康疾病、病症或病状的女性受试者(包括,例如,患有非卵巢癌诸如肺癌、结肠直肠癌等的女性受试者,或患有炎症肠疾病或病症的女性受试者),患有良性卵巢肿瘤(例如,在输卵管和/或卵巢上观察到良性肿块)的女性受试者,及其组合。

[0313] 在一些实施方案中,在用于本文所述的测定之前,预先筛查样品的某些特征。在一些实施方案中,符合某些预筛查标准的样品比不符合预筛查标准的样品更适合用于诊断应用。例如,在一些实施方案中,使用已知标准目视检查样品外观,例如,样品是否正常、溶血(红色)、黄疸(黄色)和/或脂血(混浊)。在一些实施方案中,然后可按照已知的标准等级(例如,1、2、3、4、5)对样品进行分级并记录结果。在一些实施方案中,目视检查样品的溶血(例如,血红素)并以1-5的等级分级,其中目视检查与已知浓度相关,例如,其中1表示大约0mg/dL,2表示大约50mg/dL,3表示大约150mg/dL,4表示大约250mg/dL,5表示大约525mg/dL。在一些实施方案中,目视检查样品的黄疸水平(例如,胆红素)并以1-5的等级分级,其中目视检查与已知浓度相关,例如,其中1表示大约0mg/dL,2表示大约1.7mg/dL,3表示大约6.6mg/dL,4表示大约16mg/dL,5表示大约30mg/dL。在一些实施方案中,目视检查样品的浊度(例如脂质)并以1-5的等级评定,其中目视检查与已知浓度相关,例如,其中1表示大约0mg/dL,2表示大约125mg/dL,3表示大约250mg/dL,4表示大约500mg/dL,5表示大约1000mg/dL。

[0314] 在一些实施方案中,在一个或多个量度上得分低于某个水平的样品(例如,等于或低于4分)可用于如本文所述的测定中。在一些实施方案中,在一个或多个量度上得分低于某个水平的样品(例如,等于或低于3分)可用于如本文所述的测定中。在一些实施方案中,在一个或多个量度上得分低于某个水平的样品(例如,等于或低于2分)可用于如本文所述的测定中。在一些实施方案中,在所有三个量度(例如,溶血、黄疸、脂血)上得分低于某个水平的样品(例如,等于或低于2分)可用于如本文所述的测定中。在一些实施方案中,预筛查标准诸如溶血、胆红素和/或脂血的低目视检查分数(例如,等于或低于2分)可能对在如本文所述的测定中产生的诊断特性(例如,Ct值)没有明显影响(例如,不相关)。

[0315] 在一些实施方案中,当样品示出相对于参考阈值水平升高水平的表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡(例如,本文所述的那些)时,确定样品具有表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡(例如,本文所述的那些)。在一些实施方案中,如果与参考阈值水平相比,样品的水平为至少30%或更高,包括例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更高,则确定样品对表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡呈阳性。在

一些实施方案中,如果与参考阈值水平相比,样品的水平为至少2倍或更高,包括例如至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少750倍、至少1000倍、至少2500倍、至少5000倍或更高,则确定样品对表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡呈阳性。

[0316] 在一些实施方案中,二元分类系统可用于确定样品是否对表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡呈阳性。例如,在一些实施方案中,如果样品的水平处于或高于参考阈值水平,例如截止值,则确定样品对表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡呈阳性。在一些实施方案中,这样的参考阈值水平(例如,截止值)可通过选择偏离从对照受试者获得的平均值一定数量的标准偏差来确定,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望灵敏度和/或特异性。在一些实施方案中,这样的参考阈值水平(例如,截止值)可通过选择偏离从对照受试者获得的最大测定信号一定数量的标准偏差来确定,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望灵敏度和/或特异性。在一些实施方案中,这样的参考阈值水平(例如,截止值)可通过选择以下限制性较小的一个来确定:(i) 偏离从对照受试者获得的平均值的一定数量的标准偏差,或(ii) 偏离从对照受试者获得的最大测定信号相差一定数量的标准偏差,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望灵敏度和/或特异性。在一些实施方案中,用于确定参考阈值水平(例如,截止值)的对照受试者可包括但不限于健康受试者、患有炎性病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的受试者、患有良性妇科肿瘤的受试者及其组合。在一些实施方案中,健康受试者和患有炎性病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的受试者包括在参考阈值水平(例如,截止值)的确定中。在一些实施方案中,患有良性妇科肿瘤的受试者不包括在参考阈值水平(例如,截止值)的确定中。在一些实施方案中,参考阈值(例如,截止值)可通过选择偏离(i) 从对照受试者获得的平均值,或(ii) 从对照受试者获得的最大测定信号至少1.5个标准差(SD)或更高(包括,例如,至少1.6、至少1.7、至少1.8、至少1.9、至少2、至少2.1、至少2.2、至少2.3、至少2.4、至少2.5、至少2.6、至少2.7、至少2.8、至少2.9、至少3、至少3.1、至少3.2、至少3.3、至少3.4、至少3.5、至少3.6或更高的SD)来确定,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望特异性(例如,至少95%或更高的特异性[包括,例如,至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的特异性],诸如在一些实施方案中至少99.8%的特异性)。在一些实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可通过选择偏离(i) 从对照受试者获得的平均值,或(ii) 从对照受试者获得的最大测定信号至少2.9个SD(例如,至少2.93个SD)来确定,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望特异性(例如,至少99%或更高的特异性)。在一些实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可通过选择偏离(i) 从对照受试者获得的平均值,或(ii) 从对照受试者获得的最大测定信号中限制性较小的至少2.9个SD(例如,至少2.93个SD)来确定,使得可实现卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)的期望特异性(例如,至少99%或更高的特异性)。在一些实施方案中,这种参考阈值水平(例如,截止值)可基于靶生物标记物在正常健康组织中与在卵巢癌样品中的表达水平(例如,转录物水平)来确定,从而可实现关注的特异性和/或灵敏度(例如,如本文所述)。在一些实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可以根据例如卵巢癌阶段和/或亚型和/或患者特征(例如,患者年龄、绝经状态、卵巢癌的风险因素(例如,遗传风险与平均风险、生活史相关风险因素))、有症状/无症状状态及其组合而变化。

[0317] 在一些实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可基于健康女性受试者(例如,特定年龄范围的)和任选的患有炎性病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的女性受试者的对数正态分布和实现关注的特异性(例如,至少95%或更高的特异性[包括例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的特异性],诸如在一些实施方案中为至少99.8%的特异性)所需的标准偏差(SD)的数量的选择(例如,至少1.5个SD、至少1.6个SD、至少1.7个SD、至少1.8个SD、至少1.9个SD、至少2个SD、至少2.1个SD、至少2.2个SD、至少2.3个SD、至少2.4个SD、至少2.5个SD、至少2.6个SD、至少2.7个SD、至少2.8个SD、至少2.9个SD、至少3个SD、至少3.1个SD、至少3.2个SD、至少3.3个SD、至少3.4个SD、至少3.5个SD、至少3.6个SD或更高的SD)来确定,例如,基于卵巢癌或其亚型患病率。本公开尤其还提供了用于确定受试者是否患有或易患卵巢癌的技术。例如,在一些实施方案中,当来自有需要的受试者的血液来源的样品示出表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平处于或高于参考阈值水平,例如,截止值(例如,如根据本公开确定的),则受试者被分类为患有或易患卵巢癌。在一些此类实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可基于健康女性受试者(例如,特定年龄范围的)和任选的患有炎性病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的女性受试者的对数正态分布和实现关注的特异性(例如,至少95%或更高的特异性[包括例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的特异性],诸如在一些实施方案中为至少99.8%的特异性)所需的标准偏差(SD)的数量的选择(例如,至少1.5个SD、至少1.6个SD、至少1.7个SD、至少1.8个SD、至少1.9个SD、至少2个SD、至少2.1个SD、至少2.2个SD、至少2.3个SD、至少2.4个SD、至少2.5个SD、至少2.6个SD、至少2.7个SD、至少2.8个SD、至少2.9个SD、至少3个SD、至少3.1个SD、至少3.2个SD、至少3.3个SD、至少3.4个SD、至少3.5个SD、至少3.6个SD或更高的SD)来确定,例如,基于卵巢癌或其亚型患病率。在一些此类实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可基于靶生物标记物特征的单独靶生物标记物在正常健康组织中与在卵巢癌样品中的表达水平(例如,转录物水平)来确定,从而可实现关注的特异性和/或灵敏度(例如,如本文所述)。在一些实施方案中,参考阈值水平(例如,截止值)可以根据例如卵巢癌阶段和/或亚型和/或患者特征(例如,患者年龄、绝经状态、卵巢癌的风险因素(例如,遗传风险与平均风险、生活史相关风险因素))、有症状/无症状状态及其组合而变化。

[0318] 在一些实施方案中,当来自有需要的受试者的血液来源的样品示出相对于参考阈值水平升高水平的表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡时,则将受试者分类为患有或易患卵巢癌。在一些实施方案中,当有需要的受试者的血液来源的样品示出与参考阈值水平相比,表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平为至少30%或更高,包括例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更高时,将所述受试者归类为患有或易患卵巢癌。在一些实施方案中,当有需要的受试者的血液来源的样品示出与参考阈值水平相比,表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平为至少2倍或更高,包括例如至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少250倍、至少500倍、至少750倍、至少1000倍或更高时,将所述受试者归类为患有或易患卵巢癌。当来自有需要的受试者的血液来源的样品示出与参考阈值水平相当的水平(例如,在10%至20%内)时,则将受试者归类为不太可能患有或不太可能易患卵巢癌。在一些此类实

施方案中,参考阈值水平对应于在来自参考受试者(例如,非癌症受试者)群体的可比样品中表达靶生物标记物特征的细胞外囊泡的水平。在一些实施方案中,示例性非癌症受试者包括健康女性受试者(例如,特定年龄范围(例如,低于55岁或高于55岁)的健康女性受试者)、患有非卵巢相关健康疾病、病症或病状的女性受试者(包括,例如,患有非卵巢癌诸如肺癌、结肠直肠癌等的女性受试者,或患有炎性肠疾病或病症的女性受试者),患有良性卵巢肿瘤(例如,在输卵管和/或卵巢上观察到良性肿块)的女性受试者,及其组合。

[0319] IV. 用于分析个体细胞外囊泡(EV)的示例性方法

[0320] 在一些实施方案中,用于分析个体细胞外囊泡的测定(例如,单个EV谱测定)可用于检测卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物。例如,在一些实施方案中,此种测定可涉及(i)通过靶向卵巢癌的靶生物标记物特征的一个或多个提供的标记物的捕获测定和(ii)此种卵巢癌的靶生物标记物特征的至少一个或多个另外提供的标记物的检测测定,其中此种捕获测定在此种检测测定之前进行。

[0321] 在一些实施方案中,进行捕获测定以从有需要的受试者的血液或血液来源的样品(例如,血浆样品)中选择性地捕获肿瘤相关细胞外囊泡(例如,卵巢肿瘤相关细胞外囊泡)。在一些实施方案中,进行捕获测定以选择性捕获具有特定大小范围和/或一个或多个特定特征的细胞外囊泡,例如与卵巢癌相关的细胞外囊泡。在一些此类实施方案中,在捕获测定之前,可对血液或血液来源的样品进行预处理以去除非细胞外囊泡,包括例如但不限于可溶性蛋白质和干扰实体,例如像细胞碎片。例如,在一些实施方案中,使用尺寸排阻色谱法从受试者的血液或血液来源的样品中纯化细胞外囊泡。在一些此类实施方案中,可使用尺寸排阻色谱法从血液或血液来源的样品中直接纯化细胞外囊泡,这在一些实施方案中可去除至少90%或更高(包括例如至少93%、95%、97%、99%或更高)的可溶性蛋白质和其他干扰剂,例如像细胞碎片。

[0322] 在一些实施方案中,捕获测定包括使血液或血液来源的样品与至少一种捕获剂接触的步骤,所述捕获剂包含与卵巢癌的靶生物标记物特征的至少一个或多个提供的生物标记物结合的靶捕获部分。在一些实施方案中,可多路复用捕获测定,其包括使血液或血液来源的样品与一组捕获剂接触的步骤,每种捕获剂包含与卵巢癌的不同的提供的靶生物标记物特征的生物标记物结合的靶捕获部分。在一些实施方案中,靶捕获部分针对细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,如本文所述和/或使用的那些)。

[0323] 在一些实施方案中,此种靶捕获部分可固定在固体基底上。因此,在一些实施方案中,用于捕获测定的捕获剂是或包含固体基底,所述固体基底包含至少一个或多个(例如,1、2、3、4、5个或更多个)与其缀合的靶捕获部分,每个靶捕获部分针对细胞外囊泡相关膜结合多肽(例如,如本文所述和/或使用的那些)。固体基底可以适合于捕获细胞外囊泡并且不干扰下游处理、加工和/或检测的形式提供。例如,在一些实施方案中,固体基底可以是或包含珠(例如,磁珠)。在一些实施方案中,固体基底可以是或包含表面。例如,在一些实施方案中,此种表面可为测定室(包括例如管、孔、微孔、板、过滤器、膜、基质等)的捕获表面。在一些实施方案中,捕获剂是或包含磁珠,所述磁珠包含与其缀合的靶捕获部分。

[0324] 在一些实施方案中,进行检测测定以检测通过捕获测定捕获的细胞外囊泡(例如,如上所述)中卵巢癌的靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物(例如,与捕获测定中靶向的生物标记物不同的生物标记物)。在一些实施方案中,检测测定可包括免疫PCR。

在一些实施方案中,免疫-PCR可涉及靶向卵巢癌的靶生物标记物特征的单个提供的生物标记物(例如,本文所述的那些)的至少一个探针。在一些实施方案中,免疫PCR可涉及针对靶生物标记物特征的相同生物标记物(例如,本文所述的那些)的不同表位的多个(例如,至少两个、至少三个、至少四个或更多个)探针。在一些实施方案中,免疫PCR可涉及多个(例如,至少两个、至少三个、至少四个或更多个)探针,每个探针针对本文所述的不同的提供的生物标记物。

[0325] 在一些实施方案中,检测测定可包括逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)。在一些实施方案中,RT-PCR可涉及靶向本文所述的单个提供的生物标记物的至少一个引物/探针组。在一些实施方案中,RT-PCR可涉及多个(例如,至少两个、至少三个、至少四个或更多个)引物/探针组,每组针对本文所述的不同的提供的生物标记物。

[0326] 在一些实施方案中,检测测定可包括邻近连接免疫定量聚合酶链反应(pliq-PCR),以例如确定细胞外囊泡(例如,表达至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获的细胞外囊泡)内卵巢癌的靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物的共定位。

[0327] 在一些实施方案中,检测测定采用由申请人开发并在美国申请号16/805,637和国际申请PCT/US2020/020529中描述的靶实体检测系统,所述申请均于2020年2月28日提交,并且标题为“Systems, Compositions, and Methods for Target Entity Detection”(‘637申请和‘529申请;两者均以引用的方式整体并入本文),所述系统部分基于靶生物标记物特征在个体细胞外囊泡中的相互作用和/或共定位。例如,此种靶实体检测系统(如‘637申请和‘529申请中所述,并且还在下面标题为“所提供的靶实体检测系统和涉及相同靶实体检测系统的方法”的部分中进一步描述)可在一些实施方案中,在单个实体水平上检测样品中(例如,生物、环境或其他样品中)包含至少一个或多个(例如,至少两个或更多个)靶标(例如,分子靶标)的关注的实体(例如,关注的生物或化学实体,诸如细胞外囊泡或分析物)。阅读本公开的本领域技术人员将认识到,所提供的靶实体检测系统可用于多种应用和/或目的,包括例如用于检测卵巢癌。例如,在一些实施方案中,所提供的靶实体检测系统可用于医学应用和/或目的。在一些实施方案中,所提供的靶实体检测系统可用于筛查(例如,定期筛查)个体(例如,在一些实施方案中可能是无症状个体,或在一些实施方案中可能是经历与卵巢癌相关的一种或多种症状的个体或在一些实施方案中,可能是处于卵巢癌风险的个体,例如像具有卵巢癌遗传风险和/或生活史相关风险因素的个体,或绝经后个体)的疾病或病状(例如,卵巢癌)。在一些实施方案中,所提供的靶实体检测系统可用于筛查(例如,定期筛查)个体(例如,在一些实施方案中可能是无症状个体,或在一些实施方案中可能是经历与卵巢癌相关的一种或多种症状的个体或在一些实施方案中,可能是处于卵巢癌风险的个体,例如像具有卵巢癌遗传风险和/或生活史相关风险因素的个体,或绝经后个体)的不同类型的癌症(例如,多种不同的癌症,其中一种可以是卵巢癌)。在一些实施方案中,所提供的靶实体检测系统即使在应用于包含无症状个体或由无症状个体组成的群体时也是有效的(例如,由于足够高的灵敏度和/或低的假阳性和/或假阴性结果率)。在一些实施方案中,所提供的靶实体检测系统可用作与疾病治疗(例如,卵巢癌的治疗)结合的伴随诊断。

[0328] 在一些实施方案中,可进行多个(例如,至少两个或更多个)检测测定以检测细胞外囊泡(例如,通过捕获测定捕获的细胞外囊泡(例如,如上所述))中卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的多个(例如,至少两个或更多个)生物标记物(例如,与捕获测定中靶向

的生物标记物不同的生物标记物)。例如,在一些实施方案中,多个检测测定可包括(i)所提供的靶实体检测系统或或在'637申请和'529申请中描述的系统;以及(ii)免疫PCR。在一些实施方案中,多个检测测定可包括(i)所提供的靶实体检测系统或或在'637申请和'529申请中描述的系统;以及(ii)RT-PCR。

[0329] V.所提供的靶实体检测系统和涉及相同靶实体检测系统的方法

[0330] 在一些实施方案中,可用于卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物的检测测定的靶实体检测系统包括多个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少50个或更多个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含2-50个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含2-30个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含2-25个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含5-30个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,此种系统可包含5-25个检测探针,每个检测探针针对特定靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物)。在一些实施方案中,一组此类检测探针中的至少两个可针对靶生物标记物特征的相同的生物标记物。在一些实施方案中,一组此类检测探针中的至少两个可针对靶生物标记物特征的相同的生物标记物的相同表位。在一些实施方案中,一组此类检测探针中的至少两个可针对靶生物标记物特征的相同的生物标记物的不同表位。

[0331] 在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可用于检测单个疾病或病状,例如卵巢癌。在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可允许检测至少两种或更多种疾病或病状,例如,其中一种是卵巢癌。在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可允许检测某些亚型的卵巢癌,包括例如但不限于高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌和/或粘液性卵巢癌。在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可允许检测某些阶段(包括例如I期、II期、III期和/或IV期)的卵巢癌。因此,在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可包含多个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个)组的检测探针,其中每组针对不同疾病或不同类型的疾病或病状的检测。例如,在一些实施方案中,适合在本文提供的靶实体检测系统中使用的检测探针可包含多个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个)组的检测探针,其中在一些实施方案中,每组针对不同类型的癌症(其中一种为卵巢癌)的检测,或在一些实施方案中,每组针对不同亚型和/或阶段的卵巢癌的检测。

[0332] 检测探针

[0333] 在一些实施方案中,如本文所提供和/或使用的检测探针包含靶结合部分和偶联

至靶结合部分的寡核苷酸结构域。在一些实施方案中,偶联至靶结合部分的寡核苷酸结构域可包含双链部分和从寡核苷酸结构域的至少一端延伸的单链悬突。在一些实施方案中,偶联至靶结合部分的寡核苷酸结构域可包含双链部分和从寡核苷酸结构域的每一端延伸的单链悬突。在一些实施方案中,检测探针可适用于邻近连接免疫定量聚合酶链反应(pliq-PCR)并且被称为pliq-PCR检测探针。

#### [0334] A. 靶结合部分

[0335] 与寡核苷酸结构域偶联的靶结合部分是靶标(例如,提供的靶生物标记物特征的生物标记物;本领域技术人员将理解,其中靶生物标记物是特定形式或部分/组分,靶结合部分特异性地结合到此形式或部分/组分)特异性结合的实体或试剂。在一些实施方案中,靶结合部分可具有至少约 $10^{-4}$ M、至少约 $10^{-5}$ M、至少约 $10^{-6}$ M、至少约 $10^{-7}$ M、至少约 $10^{-8}$ M、至少约 $10^{-9}$ M或更低的对靶标(例如,分子靶标)的结合亲和力(例如,如通过解离常数测量的)。本领域技术人员将理解,在一些情况下,结合亲和力(例如,如通过解离常数测量的)可受两个分子之间的非共价分子间相互作用(诸如氢键、静电相互作用、疏水性和范德华力)的影响。替代地或另外,配体与其靶分子之间的结合亲和力可受其他分子的存在的影响。本领域技术人员将熟悉用于根据本公开测量结合亲和力和/或解离常数的多种技术,包括例如但不限于ELISA、凝胶迁移测定、下拉测定、平衡透析、分析超速离心、表面等离子体共振(SPR)、生物层干涉测量、光栅耦合干涉技术和光谱测定。

[0336] 在一些实施方案中,靶结合部分可以是或包含任何化学类别(例如像碳水化合物、核酸、脂质、金属、多肽、小分子等和/或其组合)的剂。在一些实施方案中,靶结合部分可以是或包含抗体剂和/或适体。在一些实施方案中,靶结合部分是或包含抗体剂,例如,特异性结合靶标或其表位(例如提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物或其表位)的抗体剂。在一些实施方案中,提供的生物标记物的靶结合部分可以是可商购获得的。在一些实施方案中,可以设计和创造提供的生物标记物的靶结合部分,用于在如本文所述的测定中使用的目的。在一些实施方案中,靶结合部分是或包含适体,例如,特异性结合靶标或其表位(例如提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物或其表位)的适体。在一些实施方案中,靶结合部分是或包含亲和分子,所述亲和分子特异性结合靶标或其表位(例如提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物或其表位)。在一些实施方案中,此类亲和分子可以是或包含与靶标或其表位结合的肽或多肽(例如,如本文所述),具有与相应抗体类似的特异性和亲和力。在一些实施方案中,靶标可以是或包含与卵巢癌相关的靶标。例如,在一些此类实施方案中,癌症相关靶标可以是或包含与多于一种癌症(即,至少两种或更多种癌症)相关的靶标。在一些实施方案中,癌症相关靶标可以是或包含通常与癌症相关的靶标。在一些实施方案中,癌症相关靶标可以是或包含与特定组织的癌症(例如卵巢癌)相关的靶标。在一些实施方案中,癌症相关靶标可以是或包含对特定癌症(例如,特定的卵巢癌)具有特异性的靶标。

[0337] 在一些实施方案中,靶结合部分识别并特异性结合存在于生物实体(包括例如但不限于细胞和/或细胞外囊泡)中的靶标。例如,在一些实施方案中,靶结合部分可识别并特异性结合肿瘤相关抗原或其表位。在一些实施方案中,肿瘤相关抗原可以是或包含与癌症相关的抗原,所述癌症例如像皮肤癌、脑癌(包括例如胶质母细胞瘤)、乳腺癌、结肠直肠癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌和皮肤癌。在一些实施方案中,靶结合部分可识别与

卵巢癌相关的肿瘤抗原(例如,高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌或粘液性卵巢癌)。在一些实施方案中,靶结合部分可识别与高级别浆液性卵巢癌相关的肿瘤抗原。

[0338] 在一些实施方案中,靶结合部分可特异性结合囊泡内靶标,例如囊泡内蛋白质或RNA(例如,mRNA)。在一些实施方案中,靶结合部分可特异性结合存在于细胞外囊泡上/内的表面靶标,例如存在于卵巢癌相关细胞外囊泡上的膜结合多肽。

[0339] 在一些实施方案中,靶结合部分针对特定病状或疾病(例如,癌症)的生物标记物,所述生物标记物通过或已通过例如分析患者活检和/或患者数据的群体或文库(例如,数十个、数百个、数千个、数万个、数十万个或更多个)鉴定此种生物标记物(例如,预测性生物标记物)来确定。

[0340] 在一些实施方案中,相关生物标记物可为例如通过数据分析鉴定和/或表征的生物标记物。在一些实施方案中,例如,可通过机器学习和/或计算建模来分析一组不同的数据(例如,在一些实施方案中,包括批量RNA测序、单细胞RNA(scRNA)测序、质谱、组织学、翻译后修饰数据、体外和/或体内实验数据中的一个或多个)进行分析,以鉴定对疾病或病状(例如,癌症)具有高度特异性的生物标记物(例如,预测标记物)。

[0341] 在一些实施方案中,靶结合部分针对组织特异性靶标,例如与特定组织相关的靶标,所述组织例如像脑、乳腺、结肠、卵巢和/或与女性生殖系统相关的其他组织、胰腺、前列腺和/或与男性生殖系统相关的其他组织、肝脏、肺和皮肤。在一些实施方案中,此种组织特异性靶标可与正常健康组织和/或患病组织(诸如肿瘤)相关。在一些实施方案中,靶结合部分针对与受试者的正常健康状况特异性相关的靶标。

[0342] 在一些实施方案中,在多个检测探针(例如,如本文所述和/或使用的)中使用的个体靶结合实体针对不同的靶标。在一些实施方案中,此类不同的靶标可代表不同的标记物蛋白或多肽。在一些实施方案中,此类不同的靶标可代表相同的标记物蛋白或多肽的不同表位。在一些实施方案中,在多个检测探针(例如,如本文所述和/或使用的)中使用的两个或更多个个体靶结合实体可针对相同的靶标。

[0343] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的多个检测探针中使用的个体靶结合实体可针对卵巢癌的靶生物标记物特征的不同靶生物标记物(例如,如以上标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中所述的那些)。例如,在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对MUC16和FOLR1的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对MUC16和CLDN6的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对MUC16和CLDN3的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对FOLR1和CLDN6的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对FOLR1和CLDN3的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对SLC34A2和CLDN3的靶结合实体。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其分别针对SLC34A2和CLDN3的靶结合实体。

[0344] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的多个检测探针中使用的个体靶结合实体可针对卵巢癌的靶生物标记物特征的相同靶生物标记物(例如,如以上标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中所述的那些)。在一些实施方案

中,此类靶结合实体可针对卵巢癌的此种靶生物标记物特征的相同靶生物标记物的相同或不同表位。例如,在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其各自针对MUC16的靶结合实体(例如,以其完整的跨膜蛋白形式,和/或在相同表位或在不同表位)。在一些实施方案中,多个检测探针中的至少两个可具有其各自针对FOLR1肽的靶结合实体(例如,在相同表位或在不同表位)。

#### [0345] B. 寡核苷酸结构域

[0346] 在一些实施方案中,根据本公开使用的寡核苷酸结构域(例如,其可与靶结合部分偶联)可包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端或两端延伸的单链悬突。在寡核苷酸结构域包含从每一端延伸的单链悬突的一些实施方案中,单链悬突从双链部分的不同链延伸。在寡核苷酸结构域包含从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突的一些实施方案中,寡核苷酸结构域的另一端可为平端。

[0347] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域可包含核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、能够参与沃森-克里克(Watson-Crick)类型或类似碱基对相互作用的合成核苷酸残基及其任何组合。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域是或包含DNA。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域是或包含肽核酸(PNA)。

[0348] 在一些实施方案中,寡核苷酸的长度可至少部分地例如通过例如待检测的关注的实体(例如,生物实体诸如细胞外囊泡)的物理特征和/或在待检测的关注的实体(例如,生物实体诸如细胞外囊泡)中分子靶标的选择和定位来确定。在一些实施方案中,检测探针的寡核苷酸结构域被配置成具有这样的长度,使得当第一检测探针和第二检测探针结合到关注的实体(例如,生物实体诸如细胞外囊泡)时,第一单链悬突和第二单链悬突足够紧密接近以允许单链悬突之间的相互作用(例如,杂交)。例如,当关注的实体(例如,生物实体)是细胞外囊泡(例如,外泌体)时,检测探针的寡核苷酸结构域可各自独立地具有这样的长度,使得当相应的检测探针结合到同一细胞外囊泡时,它们各自的单链悬突足够紧密接近以彼此退火或相互作用。例如,在一些实施方案中,用于检测细胞外囊泡(例如,外泌体)的检测探针的寡核苷酸结构域可各自独立地具有约20nm至约200nm、约40nm至约500nm、约40nm至约300nm或约50nm至约150nm的长度。在一些实施方案中,用于检测细胞外囊泡(例如,外泌体)的检测探针的寡核苷酸结构域可各自独立地具有约20nm至约200nm的长度。在一些实施方案中,一组检测探针的寡核苷酸结构域的长度可各自独立地变化,以增加和/或最大化在它们同时结合到相同的关注的实体时它们相互发现的概率。

[0349] 因此,在一些实施方案中,用于本文提供的技术的寡核苷酸结构域的长度可在约20个至约1000个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可在约30至约1000个核苷酸范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可在约30个至约500个核苷酸、约30个至约250个核苷酸、约30个至约200个核苷酸、约30个至约150个核苷酸、约40个至约150个核苷酸、约40个至约125个核苷酸、约40个至约100个核苷酸、约40个至约60个核苷酸、约50个至约90个核苷酸、约50个至约80个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为至少20个或更多个核苷酸,包括例如至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少250个、至少500个、至少750个、至少1000个核苷酸或更多。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为不超过1000个核苷酸或更少,包括例如不超过900个、不超过800个、不超过700个、不超过600个、不超过

500个、不超过400个、不超过300个、不超过200个、不超过100个、不超过90个、不超过80个、不超过70个、不超过60个、不超过50个、不超过40个、不超过30个核苷酸、不超过20个核苷酸或更少。

[0350] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为约20nm至约500nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为约20nm至约400nm、约30nm至约200nm、约50nm至约100nm、约30nm至约70nm或约40nm至约60nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为至少约20nm或更长,包括例如至少约30nm、至少约40nm、至少约50nm、至少约60nm、至少约70nm、至少约80nm、至少约90nm、至少约100nm、至少约200nm、至少约300nm、至少约400nm或更长。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的长度可为不超过1000nm或更短,包括例如不超过900nm、不超过800nm、不超过700nm、不超过600nm、不超过500nm、不超过400nm、不超过300nm、不超过200nm、不超过100nm或更短。

[0351] 在一些实施方案中,用于本文提供的技术的寡核苷酸结构域的双链部分的长度可在约30个至约1000个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可在约30个至约500个核苷酸、约30个至约250个核苷酸、约30个至约200个核苷酸、约30个至约150个核苷酸、约40个至约150个核苷酸、约40个至约125个核苷酸、约40个至约100个核苷酸、约50个至约90个核苷酸、约50个至约80个核苷酸的范围内。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为至少30个或更多个核苷酸,包括例如至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个、至少100个、至少250个、至少500个、至少750个、至少1000个核苷酸或更多。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为不超过1000个核苷酸或更少,包括例如不超过900个、不超过800个、不超过700个、不超过600个、不超过500个、不超过400个、不超过300个、不超过200个、不超过100个、不超过90个、不超过80个、不超过70个、不超过60个、不超过50个、不超过40个核苷酸或更少。

[0352] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为约20nm至约500nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为约20nm至约400nm、约30nm至约200nm、约50nm至约100nm、约30nm至约70nm或约40nm至约60nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为至少约20nm或更长,包括例如至少约30nm、至少约40nm、至少约50nm、至少约60nm、至少约70nm、至少约80nm、至少约90nm、至少约100nm、至少约200nm、至少约300nm、至少约400nm或更长。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的长度可为不超过1000nm或更短,包括例如不超过900nm、不超过800nm、不超过700nm、不超过600nm、不超过500nm、不超过400nm、不超过300nm、不超过200nm、不超过100nm或更短。

[0353] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分的特征在于,当检测探针通过各自的互补单链悬突(例如,如本文所述和/或使用的)的杂交而彼此连接时,相应寡核苷酸结构域(如果有的话,包括将靶结合部分连接到寡核苷酸结构域的接头)的组合长度足够长,以允许各自的靶结合实体基本上跨越关注的实体(例如,细胞外囊泡)的全部特征长度(例如,直径)。例如,在细胞外囊泡是关注的实体的一些实施方案中,当检测探针彼此完全连接时,检测探针的寡核苷酸结构域(如果有的话,包括将靶结合部分连接到寡核苷酸结构域的接头)的组合长度可为大约50nm至200nm。

[0354] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分可包含引物的结合位点。在一些实施方案中,引物的此种结合位点可包含被设计成降低或最小化错误引发或引物二聚体的

可能性的核苷酸序列。在一些实施方案中,此种特征可降低检测下限,并因此增加本文提供的系统的灵敏度。在一些实施方案中,引物的结合位点可包含被设计成具有与另一引物结合位点相似的退火温度的核苷酸序列。

[0355] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分可包含被设计成减少或最小化与通常与受试者(例如,人受试者)的基因组和/或基因转录物(例如,基因组DNA和/或RNA,诸如基因的mRNA)相关的核酸序列(例如,DNA和/或RNA序列)的重叠的核苷酸序列。在一些实施方案中,此种特征可减少或最小化在检测期间可能存在(例如,作为污染物)于样品中的受试者的任何基因组DNA和/或mRNA转录物的干扰。

[0356] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的双链部分可具有被设计成减少或最小化自身二聚体、同源二聚体或异源二聚体的形成的核苷酸序列。

[0357] 在一些实施方案中,用于本文提供的技术的寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为约2个至约20个核苷酸。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为约2个至约15个核苷酸、约2个至约10个核苷酸、约3个至约20个核苷酸、约3个至约15个核苷酸、约3个至约10个核苷酸。在一些实施方案中,单链悬突可具有至少1个至5个核苷酸的长度。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为至少2个或更多个核苷酸,包括例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少20个核苷酸或更多。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为不超过20个核苷酸或更少,包括例如不超过15个、不超过14个、不超过13个、不超过12个、不超过11个、不超过10个、不超过9个、不超过8个、不超过7个、不超过6个、不超过5个、不超过4个核苷酸或更少。

[0358] 在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为约1nm至约10nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为约1nm至约5nm。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为至少约0.5nm或更长,包括例如至少约1nm、至少约1.5nm、至少约2nm、至少约3nm、至少约4nm、至少约5nm、至少约6nm、至少约7nm、至少约8nm、至少约9nm、至少约10nm或更长。在一些实施方案中,寡核苷酸结构域的单链悬突的长度可为不超过10nm或更短,包括例如不超过9nm、不超过8nm、不超过7nm、不超过6nm、不超过5nm、不超过4nm、不超过3nm、不超过2nm、不超过1nm或更短。

[0359] 寡核苷酸结构域的单链悬突被设计成包含与第二检测探针的单链悬突的至少一部分互补的核苷酸序列,使得包含第一检测探针和第二检测探针的双链复合物可通过互补单链悬突的杂交形成。在一些实施方案中,选择互补单链悬突的核苷酸序列以在适当核酸连接酶存在下获得最佳连接效率。在一些实施方案中,单链悬突具有优先选择用于通过关注的特定核酸连接酶(例如,DNA连接酶,诸如T4或T7连接酶)有效连接的核苷酸序列。例如,此种单链悬突可具有GAGT的核苷酸序列,例如,如描述于Song等人,“Enzyme-guided DNA sewing architecture”*Scientific Reports* 5:17722 (2015)中,其出于本文所述目的以引用的方式并入本文。

[0360] 当两个检测探针通过各自的互补单链悬突的杂交偶联在一起时,它们各自的包含杂交单链悬突的寡核苷酸结构域在一些实施方案中的组合长度可为关注的实体(例如,生物实体)的特征长度(例如,直径)的约90%至110%或约95%至105%。例如,在一些实施方案中,当生物实体为外泌体时,组合长度可为约50nm至约200nm、或约75nm至约150nm、或约

80nm至约120nm。

[0361] C.靶结合部分与寡核苷酸结构域之间的偶联

[0362] 寡核苷酸结构域和靶结合部分可通过共价键联和/或通过非共价结合(例如像蛋白质-蛋白质相互作用,诸如链霉素亲和素-生物素相互作用和/或离子相互作用)在检测探针中偶联在一起。在一些实施方案中,适合根据本公开使用的检测探针为包含靶结合部分与寡核苷酸结构域的缀合物分子,其中所述两种组分通常例如直接通过键或间接通过一个或多个接头彼此共价偶联。在一些实施方案中,靶结合部分通过共价键联(例如,直接通过键或间接通过一个或多个接头)和/或通过非共价结合(例如像蛋白质-蛋白质相互作用,诸如链霉素亲和素-生物素相互作用和/或离子相互作用)偶联到寡核苷酸结构域的两条链中的一条。

[0363] 在使用接头的情况下,在一些实施方案中,选择接头以提供靶结合部分通过所选接头共价连接至寡核苷酸结构域的一条或两条链。在一些实施方案中,选择接头以使得靶结合部分与寡核苷酸结构域的一条或两条链的所得共价连接保持靶结合部分对其靶标的期望的结合亲和力。在一些实施方案中,选择接头以增强靶结合部分对其靶标的结合特异性。关注的接头和/或缀合方法可根据靶结合部分(例如,其大小和/或电荷)而广泛变化。在一些实施方案中,接头为生物学惰性的。

[0364] 用于将靶结合部分偶联至寡核苷酸的多种接头和/或方法是本领域普通技术人员已知的,并且可根据本公开使用。在一些实施方案中,接头可包含在任一端具有能够共价连接到靶结合部分的反应性官能团的间隔基团。可用于接头中的间隔基团的实例包括但不限于脂肪族和不饱和烃链(包括例如C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20或更长)、含有杂原子诸如氧(例如,醚诸如聚乙二醇)或氮(聚胺)的间隔基、肽、碳水化合物、可能含有杂原子的环状或非环状系统。促进共价连接的反应性官能团的非限制性实例包括亲核官能团(例如,胺、醇、硫醇和/或酰胺)、亲电官能团(例如,醛、酯、乙烯基酮、环氧化物、异氰酸酯和/或马来酰亚胺)、能够进行环加成反应、形成二硫键或与金属结合的官能团。但在一些实施方案中,示例性反应性官能团不限于伯胺和仲胺、异羟肟酸、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、二苯并环辛炔(DBCO)-NHS酯、叠氮基-NHS酯、叠氮乙酸NHS酯、炔丙基-NHS酯、反式环辛烯-NHS酯、N-羟基琥珀酰亚胺碳酸酯、氧羰基咪唑、硝基苯酯、三氟乙酯、缩水甘油醚、乙烯基砜、马来酰亚胺、叠氮苯甲酰肼、N-[4-(对叠氮水杨酸氨基)丁基]-3-[2'-吡啶基二硫基]丙酰胺)、双(磺基琥珀酸亚酰胺)辛二酸酯、己二亚氨酸二甲酯、酒石酸二琥珀酰亚胺、N-马来酰亚胺基丁酰氧基琥珀酰亚胺酯、N-羟基磺基琥珀酰亚胺基-4-叠氮苯甲酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-叠氮苯基]-1,3'-二硫代丙酸酯、N-琥珀酰亚胺基[4-碘乙酰基]氨基苯甲酸酯、戊二醛和4-[N-马来酰亚胺基甲基]环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺基酯、3-(2-吡啶基二硫基)丙酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SMCC)及其任何组合。

[0365] 在一些实施方案中,使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯化学法将靶结合部分(例如,靶结合抗体剂)偶联或缀合至寡核苷酸结构域的一条或两条链。NHS酯与游离伯胺反应,并导致稳定的共价连接。在一些实施方案中,伯氨基可位于具有间隔基团的末端,例如但不限于脂肪族和不饱和烃链(例如,C6或C12间隔基团)。

[0366] 在一些实施方案中,可使用本领域已知的位点特异性缀合方法将靶结合部分(例

如,靶结合抗体剂)偶联或缀合至寡核苷酸结构域的一条或两条链,以例如增强缀合的靶结合部分(例如,缀合的靶结合抗体剂)的结合特异性。位点特异性缀合方法的实例包括但不限于通过二硫键、C端、碳水化合物残基或聚糖和/或非天然氨基酸标记进行偶联或缀合。在靶结合部分是或包含抗体剂或肽适体的一些实施方案中,寡核苷酸可通过存在于靶结合部分中的至少一个或多个游离胺基偶联或缀合至靶结合部分。在一些实施方案中,寡核苷酸可通过存在于靶结合部分中的至少一个或多个反应性硫醇基团偶联或缀合至是或包含抗体剂或肽适体的靶结合部分。在一些实施方案中,寡核苷酸可通过存在于靶结合部分中的至少一个或多个碳水化合物残基偶联或缀合至是或包含抗体剂或肽适体的靶结合部分。

[0367] 在一些实施方案中,多个寡核苷酸(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个或更多个)可偶联或缀合至靶结合部分(例如,靶结合抗体剂)。

#### [0368] 示例性双链体靶实体检测系统

[0369] 在一些实施方案中,如本公开所提供的靶实体检测系统(并且例如用于检测例如在单个实体水平上与卵巢癌相关的细胞外囊泡)可包含针对所提供的靶生物标记物(例如,本文所述的那些)的第一检测探针的第一群体(例如,如本文所述和/或使用的)以及针对所提供的靶生物标记物(例如,本文所述的那些)的第二检测探针的第二群体(例如,如本文所述和/或使用的)。在一些实施方案中,第一检测探针和第二检测探针针对相同的所提供的靶生物标记物。在一些实施方案中,第一检测探针和第二检测探针针对不同的所提供的靶生物标记物。

[0370] 图2说明了用于在单个实体水平检测包含(i)至少一个靶标(例如提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物),其表达水平足够高,使得发现相同靶标的两个分子(例如,提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物)紧密接近,或(ii)至少两个或更多不同的靶标(例如,提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物)的关注的实体(例如,生物实体诸如细胞外囊泡)的示例性双链体靶实体检测系统。第一检测探针包含第一靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物1)和偶联至第一靶结合部分的第一寡核苷酸结构域,第一寡核苷酸结构域包含第一双链部分和从第一寡核苷酸结构域的一端延伸的第一单链悬突。如图2所示,第一寡核苷酸结构域可由较长链(链3)和较短链(链1)杂交产生,从而在一端形成双链部分和单链悬突。在一些实施方案中,第一靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物1)偶联(例如,共价偶联)至第一寡核苷酸结构域的链(例如,链1)的5'端或3'端。在一些实施方案中,偶联至第一靶结合部分的链的5'端或3'端可用接头(例如,如本文所述和/或使用的,带有或不带有间隔基团)修饰。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域的另一条链(例如,链3)的5'端具有游离磷酸酯基团。

[0371] 在图2所描绘的实施方案中,第二检测探针包含第二靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物2)和偶联至第二靶结合部分的第二寡核苷酸结构域,第二寡核苷酸结构域包含第二双链部分和从第二寡核苷酸结构域的一端延伸的第二单链悬突。如图2所示,第二寡核苷酸结构域可由较长链(链4)和较短链(链2)杂交产生,从而在一端形成双链部分和单链悬突。在一些实施方案中,第二靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物2)偶联(例如,共价偶联)至第二寡核苷酸结构域的链(例如,链2)的5'端。在一些实施方案中,偶联至第二靶结合部分的链的5'端可用接头(例如,如本文所述和/或使用的,带有或不带有间隔基团)修饰。在

一些实施方案中,第二寡核苷酸结构域的另一条链(例如,链4)的5'端具有游离磷酸酯基团。

[0372] 至少第一单链悬突和第二单链悬突的部分彼此互补,使得当它们足够紧密接近时(例如当第一检测探针和第二检测探针同时结合相同的关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)时),它们可杂交以形成双链复合物。在一些实施方案中,第一单链悬突和第二单链悬突具有相等的长度,使得当它们杂交以形成双链复合物时,它们各自的寡核苷酸结构域之间没有缺口(除了待连接的切口),并且每个相应的靶结合部分位于双链复合物的相对端。例如,在一些实施方案中,双链复合物在连接发生之前形成,其中双链复合物包含通过它们各自的单链悬突(例如,长度为4个核苷酸)的直接杂交而彼此偶联的第一检测探针和第二检测探针,其中每个相应的靶结合部分(例如,分别针对靶癌症标记物1和靶癌症标记物2)存在于双链复合物的相对端。在此类实施方案中,双链复合物的两条链(在各自的寡核苷酸结构域之间包含切口)都是可连接的,以例如用于扩增和检测。在一些实施方案中,双链复合物(例如,在连接发生之前)可包含关注的实体(例如,生物实体诸如细胞外囊泡),其中第一靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物1)和第二靶结合部分(例如,针对靶癌症标记物2)同时与关注的实体结合。

[0373] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针的第一靶结合部分可针对第一靶表面蛋白生物标记物(例如,在标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中提供的那些),而第二检测探针的第二靶结合部分可以针对第二靶表面蛋白生物标记物(例如,在标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中提供的那些)。在一些实施方案中,第一检测探针的第一靶结合部分可针对第一靶囊泡内蛋白生物标记物(例如,在标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中提供的那些),而第二检测探针的第二靶结合部分可以针对第二靶囊泡内蛋白生物标记物(例如,在标题为“提供的用于检测卵巢癌的生物标记物和/或靶生物标记物特征”的部分中提供的那些)。在一些实施方案中,第一靶结合部分和第二靶结合部分可针对相同靶表面蛋白生物标记物或相同靶囊泡内蛋白生物标记物的相同或不同表位。在一些实施方案中,第一靶结合部分和第二靶结合部分可针对不同的靶表面蛋白生物标记物或不同的靶囊泡内蛋白生物标记物。

[0374] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的MUC16(例如,以完整跨膜蛋白形式)的第一靶结合部分;而第二检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的MUC16(例如,以完整跨膜蛋白形式)的第二靶结合部分。在一些此类实施方案中,第一靶结合部分和第二靶结合部分可针对MUC16的相同或不同表位(例如,以完整跨膜蛋白形式)。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为相同的。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为不同的。

[0375] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的FOLR1多肽的第一靶结合部分;而第二检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的FOLR1多肽的第二靶结合部分。在一些此类实施方案中,第一靶结合部分和第二靶结合部分可针对FOLR1多肽的相同或不同表位。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为相同的。在一些实施方案

中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为不同的。

[0376] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的MUC16多肽的第一靶结合部分;而第二检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的FOLR1多肽的第二靶结合部分。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为相同的。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为不同的。

[0377] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的CLDN6多肽的第一靶结合部分;而第二检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的MUC16多肽或FOLR1多肽的第二靶结合部分。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为相同的。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为不同的。

[0378] 在用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统的一些实施方案中,第一检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的CLDN3多肽的第一靶结合部分;而第二检测探针包含针对与第一寡核苷酸结构域缀合的SLC34A2多肽的第二靶结合部分。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为相同的。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域和第二寡核苷酸结构域的双链部分可为不同的。

[0379] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统可以包含至少两组不同的检测探针。例如,在一些实施方案中,每组可针对包含一个或多个靶生物标记物(例如,本文所述的那些)的不同靶生物标记物特征。例如,在一些实施方案中,如图21所示,双链体靶实体检测系统可包含至少两组检测探针,其中第一组包含至少两个各自针对MUC16多肽的检测探针,并且第二组包含至少两个各自针对FOLR1多肽的检测探针。在一些实施方案中,例如,如图38所示,双链体靶实体检测系统可包含至少两组检测探针,其中第一组包含至少两个针对FOLR1多肽的检测探针(例如,具有针对SLC34A2多肽的捕获探针),并且第二组包含至少两个分别针对MUC16多肽和FOLR1多肽的检测探针(例如,具有至少针对MUC16多肽的捕获探针)。在一些实施方案中,如图39所示,双链体靶实体检测系统可包含至少两组检测探针,其中第一组包含至少两个针对FOLR1多肽的检测探针(例如,具有针对SLC34A2多肽的捕获探针),并且第二组包含至少两个分别针对MUC16多肽和FOLR1多肽的检测探针(例如,具有至少针对MUC16多肽的捕获探针)。在一些实施方案中,每组可针对卵巢癌的靶生物标记物的不同组合。例如,在一些实施方案中,双链体靶实体检测系统可包含至少两组检测探针,其中第一组包含至少两个各自针对不同的生物标记物的检测探针,并且第二组包含至少两个各自针对不同的生物标记物的检测探针。

[0380] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的双链体靶实体检测系统可包含三组不同的检测探针。例如,在一些实施方案中,每组可针对包含一个或多个靶生物标记物(例如,本文所述的那些)的不同靶生物标记物特征。在一些此类实施方案中,至少一组可针对单个靶生物标记物(例如,本文所述的那些)。在一些此类实施方案中,至少一组可针对至少两种不同的靶生物标记物的组合(例如,本文所述的至少两种靶生物标记物的组合)。例如,如实施例10所述,双链体靶实体检测系统可包含至少三组检测探针,其中第一组包含至少两个各自针对MUC16多肽的检测探针;第二组包含至少两个各自针对FOLR1多肽的检测探针;并且第三组至少包含针对MUC16多肽的第一检测探针和针对FOLR1多肽的第二检测探针。

[0381] 在一些实施方案中,包含至少两组不同的检测探针的双链体靶实体检测系统还可包括捕获测定,所述捕获测定包括针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获剂。

[0382] 在一些实施方案中,包括如本文所述的捕获探针或检测探针的生物标记物探针(例如,生物标记物特征)的任何组合可与包括如本文所述的捕获探针或检测探针的任何其他生物标记物探针组(例如,生物标记物特征)组合使用。

[0383] 示例性三链体或多链体 ( $n \geq 3$ ) 靶实体检测系统

[0384] 在一些实施方案中,如本公开所提供的靶实体检测系统(并且可用于例如在单个实体水平上检测卵巢癌相关的细胞外囊泡)可包含 $n$ 个不同的检测探针群体(例如,如本文所述和/或使用的),其中 $n \geq 3$ 。例如,在一些实施方案中,当 $n = 3$ 时,靶实体检测系统可包含针对第一靶标的第一检测探针(例如,如本文所述和/或使用的)、针对第二靶标的第二检测探针群体(例如,如本文所述和/或使用的)和针对第三靶标的第三检测探针群体(例如,如本文所述和/或使用的)。

[0385] 图15说明了用于在单个实体水平上检测包含三个不同分子靶标(例如,分子靶标)的关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)的示例性三链体靶实体检测系统。第一检测探针包含第一靶结合部分(例如,抗癌标记物1抗体剂)和偶联至第一靶结合部分的第一寡核苷酸结构域,所述第一寡核苷酸结构域包含第一双链部分和从第一寡核苷酸结构域的一端延伸的第一单链悬突。如图15所示,第一寡核苷酸结构域可由较长链(链8)和较短链(链1)杂交产生,从而在一端形成双链部分和单链悬突。在一些实施方案中,第一靶结合部分(例如,抗癌标记物1抗体剂)偶联(例如,共价偶联)至第一寡核苷酸结构域的链(例如,链1)的5'端。在一些实施方案中,偶联至第一靶结合部分的链的5'端可用接头(例如,如本文所述和/或使用的,带有或不带有间隔基团)修饰。在一些实施方案中,第一寡核苷酸结构域的另一条链(例如,链8)的5'端具有游离磷酸酯基团。

[0386] 在图15所描绘的实施方案中,第二检测探针包含第二靶结合部分(例如,抗癌标记物3抗体剂)和偶联至第二靶结合部分的第二寡核苷酸结构域,所述第二寡核苷酸结构域包含第二双链部分和从第二寡核苷酸结构域的一端延伸的第二单链悬突。如图15所示,第二寡核苷酸结构域可由较长链(链4)和较短链(链2)杂交产生,从而在一端形成双链部分和单链悬突。在一些实施方案中,第二靶结合部分(例如,抗癌标记物3抗体剂)偶联(例如,共价偶联)至第二寡核苷酸结构域的链(例如,链2)的5'端。在一些实施方案中,偶联至第二靶结合部分的链的5'端可用接头(例如,如本文所述和/或使用的,带有或不带有间隔基团)修饰。在一些实施方案中,第二寡核苷酸结构域的另一条链(例如,链4)的5'端不具有游离磷酸酯基团。

[0387] 第三检测探针包含第三靶结合部分(例如,抗癌标记物2抗体剂)和偶联至第三靶结合部分的第三寡核苷酸结构域,所述第三寡核苷酸结构域包含第三双链部分和从第三寡核苷酸结构域的每一端延伸的单链悬突。例如,单链悬突从第三寡核苷酸结构域的链的一端延伸,而另一单链悬突从第三寡核苷酸结构域的不同链的相对端延伸。如图15所示,第三寡核苷酸结构域可由两条链(例如,链9和链10)的部分杂交产生,从而在每一端形成双链部分和单链悬突。例如,在第三检测探针的链9的5'端形成单链悬突(3A),其中链9的5'端具有游离磷酸酯基团。另外,在相同的第三检测探针的链10的5'端形成单链悬突(3B),并且第三靶结合部分(例如,抗靶标2抗体剂)也偶联(例如,共价偶联)至链10的5'端。在一些实施方

案中,偶联至第三靶结合部分的链(例如,链10)的5'端可用接头(例如,如本文所述和/或使用的,带有或不带有间隔基团)修饰。

[0388] 当所有三个检测探针足够紧密接近时,例如,当所有三个检测探针同时结合相同的关注的实体(例如,生物实体)时,(i)第三检测探针的单链悬突(例如,3A)的至少一部分与第二检测探针的单链悬突的相应互补部分杂交,并且(ii)第三检测探针的另一个单链悬突(例如,3B)的至少一部分与第一检测探针的单链悬突的相应互补部分杂交。结果,通过相应单链悬突的直接杂交形成包含以线性排列彼此偶联的所有三个检测探针的双链复合物。参见例如图15。

[0389] 在涉及在所提供的技术中使用至少三个或更多个( $n \geq 3$ )检测探针的一些实施方案中,当检测探针的单链悬突退火于每个相应的配偶体以形成双链复合物时,至少( $n-2$ )个靶结合部分存在于双链复合物的一个或多个内部位置。在此类实施方案中,期望在双链复合物的单链中存在内部靶结合部分,使得双链复合物的另一条链不含任何内部靶结合部分,并且因此可连接以形成例如用于扩增和/或检测的连接模板。参见例如,图15(使用三个检测探针)、图16(使用四个检测探针)和图17(使用 $n$ 个检测探针)。

[0390] 在双链复合物的链包含至少一个或多个内部靶结合部分的一些实施方案中,所述链包含内部靶结合部分所偶联的检测探针的寡核苷酸链末端与另一个检测探针的寡核苷酸链末端之间的缺口。缺口的大小足够大,使得所述链在核酸连接酶的存在下变得不可连接。在一些实施方案中,缺口可为2至8个核苷酸大小或2至6个核苷酸大小。在一些实施方案中,缺口的大小为6个核苷酸。在一些实施方案中,重叠(单链悬突之间的杂交区)可为2至15个核苷酸长度或4至10个核苷酸长度。在一些实施方案中,重叠(单链悬突之间的杂交区)的长度为8个核苷酸。选择缺口和/或杂交区的大小以提供与连接模板(不包含内部靶结合部分)和非连接模板(包含至少一个内部靶结合部分)的最佳信号分离。应当注意,虽然图15至17未示出检测探针与关注的实体(例如,生物实体)的结合,但双链复合物(例如,在连接发生之前)可包含关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡),其中至少三个或更多个靶结合部分同时结合到关注的实体。

[0391] 在一些实施方案中,用于本文提供的靶实体检测系统(例如,本文所述的双链体、三链体或多链体靶实体检测系统)的检测探针(例如,检测探针和/或特定生物标记物的数量)组合(例如,一组)的选择基于例如被认为对于特定应用是最佳的所需特异性和/或所需灵敏度。例如,在一些实施方案中,选择检测探针的组合来检测卵巢癌(例如,对于I期、II期、III期或IV期),使得其提供的特异性为至少95%或更高,包括例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.7%、至少99.8%或更高。在一些实施方案中,选择检测探针的组合来检测卵巢癌(例如,对于I期、II期、III期或IV期),使得其提供的灵敏度为至少30%或更高,包括例如至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或更高。在一些实施方案中,选择检测探针的组合来检测卵巢癌(例如,对于I期、II期、III期或IV期),使得其提供的阳性预测值为至少8%或更高,包括例如至少9%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%或更高。在一些实施方案中,选择检测探针的组合来检测卵巢癌(例如,对于I期、II期、III期或IV期),使得其提供的阳性预测值为至少2%或更高,包括例如至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至

少50%或更高。在一些实施方案中,选择检测探针的组合来检测卵巢癌(例如,对于I期、II期、III期或IV期),使得其提供的检测限(LOD)低于 $1 \times 10^7$  EV/mL样品或更低,包括例如低于 $7 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $6 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $5 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $4 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $3 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $2 \times 10^6$  EV/mL样品、低于 $1 \times 10^6$  EV/mL样品或更低。在一些实施方案中,此种卵巢癌检测测定可用于检测卵巢癌的不同亚型,包括例如但不限于高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌或粘液性卵巢癌。在一些实施方案中,此种卵巢癌检测测定可用于检测上皮来源的卵巢癌。在一些实施方案中,此种卵巢癌检测测定可用于检测高级别浆液性卵巢癌。

[0392] 在一些实施方案中,检测探针的组合(例如,一组)而不是单独的检测探针赋予检测疾病、病症或病状(例如,如本文所述的特定卵巢癌和/或卵巢癌阶段)特异性,例如,一个或多个单独的探针可针对本身对卵巢癌没有特异性的靶标。例如,在一些实施方案中,本文提供的靶实体检测系统(例如,本文所述的双链体、三链体或多链体靶实体检测系统)中检测探针的有用组合可包含针对特异于相关疾病、病症或病状的靶标(即,对相关疾病、病症或病状具有特异性的靶标)的至少一种检测探针,并且还可包含针对不一定或完全特异于相关疾病、病症或病状的靶标(例如,也可在健康的、不属于特定疾病、病症或病状和/或不属于关注的特定疾病阶段的一些或所有细胞上发现)的至少一种检测探针。也就是说,如阅读本说明书的本领域技术人员将理解的,只要根据本发明使用的检测探针组是或包含一起对检测相关疾病、病症或病状具有特异性的多个单独的检测探针(即,充分区分与相关疾病、病症或病状相关的用于检测的生物实体与用于检测的不受关注的其他生物实体),则所述组根据本公开的某些实施方案是有用的。

[0393] 在一些实施方案中,本文提供的靶实体检测系统(例如,本文所述的双链体、三链体或多链体靶实体检测系统)可包含至少一个或多个(例如,至少2个或更多个)对照探针(除了靶特异性检测探针,例如,如本文所述和/或使用的,以例如在一些实施方案中识别疾病特异性生物标记物,诸如癌症特异性生物标记物和/或组织特异性生物标记物)。在一些实施方案中,对照探针被设计成使得其与感兴趣的实体(例如,生物实体)的结合抑制(完全或部分)检测信号的产生。

[0394] 在一些实施方案中,对照探针包含对照结合部分和偶联至对照结合部分的寡核苷酸结构域(例如,如本文所述和/或使用的),所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突。对照结合部分是与对照参考结合的实体或部分。在一些实施方案中,对照参考可以是或包含优先与正常健康细胞相关的生物标记物。在一些实施方案中,对照参考可以是或包含优先与非靶组织相关的生物标记物。在一些实施方案中,包括对照探针可选择性地去除或最小化由假阳性(例如,包含对照参考的关注的实体,任选地与待检测的一个或多个靶标组合)产生的可检测信号。均于2020年2月28日提交的标题为“Systems, Compositions, and Methods for Target Entity Detection,”的美国申请号16/805,637和国际申请PCT/US2020/020529(每个申请的全部内容以引用的方式并入本文)中描述的其他对照探针可用在所提供的靶实体检测系统中。

[0395] 在一些实施方案中,本公开尤其提供了以下见解:如本文所述或使用的检测探针可非特异性地结合到固体基底表面,并且甚至在多次洗涤以去除任何过量或未结合的检测探针之后,其中一些仍可保留在测定样品中;并且此类非特异性结合的检测探针可从固体

基底表面脱落并在连接反应中自由浮动,从而允许它们彼此相互作用以生成产生不期望的背景信号的非特异性连接模板。因此,在一些实施方案中,本文提供的靶实体检测系统(例如,本文所述的双链体、三链体或多链体靶实体检测)可包含至少一种或多种(例如,至少2种或更多种)抑制剂寡核苷酸,其被设计来捕获未与关注的实体结合但在连接反应中作为游离剂保留的残留检测探针,从而防止此类自由浮动的检测探针与其他自由浮动的互补检测探针相互作用以产生不期望的背景信号。在一些实施方案中,抑制剂寡核苷酸可以是或包含单链或双链寡核苷酸,所述单链或双链寡核苷酸包含用于检测探针(例如,如本文所述或使用的)的单链悬突的结合结构域,其中抑制剂寡核苷酸不包含引物结合位点。抑制剂寡核苷酸中不存在此种引物结合位点防止引物结合到由可检测探针与抑制剂寡核苷酸连接产生的非特异性连接模板,从而减少或抑制非特异性连接模板例如通过聚合酶链反应的扩增和/或检测。

[0396] 在一些实施方案中,抑制剂寡核苷酸包含用于检测探针(例如,如本文所述或使用的)的单链悬突的结合结构域,其中结合结构域是或包含与检测探针的单链悬突基本互补的核苷酸序列,使得具有互补单链悬突的游离的、未结合的检测探针可与抑制剂寡核苷酸的结合结构域结合。在一些实施方案中,抑制剂寡核苷酸可在一端具有发夹。在一些实施方案中,抑制剂寡核苷酸可为单链寡核苷酸,其在一端包含用于检测探针的单链悬突的结合结构域,其中单链寡核苷酸的一部分可自杂交以在另一端形成发夹。

[0397] 在一些实施方案中,本文提供的靶实体检测系统(例如,本文所述的双链体、三链体或多链体靶实体检测系统)不包含将检测探针的寡核苷酸结构域与另一检测探针的寡核苷酸结构域相关联的连接寡核苷酸。在一些实施方案中,连接寡核苷酸被设计成桥接任何两个检测探针的寡核苷酸结构域,所述两个检测探针在与关注的实体结合时不以其他方式彼此相互作用。在一些实施方案中,连接寡核苷酸被设计成与检测探针的寡核苷酸结构域的至少一部分和另一检测探针的寡核苷酸结构域的至少一部分杂交。连接寡核苷酸可为单链的、双链的或其组合。连接寡核苷酸不含任何靶结合部分(例如,如本文所述和/或使用的)或对照结合部分。在至少一些实施方案中,不需要连接寡核苷酸来间接连接检测探针的寡核苷酸结构域;在一些实施方案中,不使用此类连接寡核苷酸,部分是因为如本文所提供和/或使用的检测探针被设计成使得它们各自的寡核苷酸结构域具有足够的长度以在它们足够紧密接近时(例如,当检测探针同时结合关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)时)彼此接触并相互作用。

#### [0398] 使用提供的靶实体检测系统的方法

[0399] 所提供的靶实体检测系统可用于检测样品中(例如,生物、环境或其他样品中)的关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)以用于各种与检测卵巢癌相关的应用和/或目的。因此,本文提供的一些方面涉及使用适合根据本公开使用的多个(例如,至少2个、至少3个或更多个)检测探针的方法。在一些实施方案中,方法包括使样品(例如,来自人女性受试者的血液或血液来源的样品)中的关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)与包含如本文所述和/或使用的至少2个或更多个(包括例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或更多个)检测探针的一组检测探针接触。在一些实施方案中,方法包括使包含关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊

泡)的样品经受靶实体检测系统(例如,如本文所提供的)。多个检测探针(例如,至少两个或更多个)可同时或在不同时间(例如,顺序地)添加到包含关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)的样品中。在一些实施方案中,方法可以包括在与多个检测探针接触之前,使包含关注的实体的样品与至少一种针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获剂接触。

[0400] 在某些实施方案中,所提供的用于本文所述方法中的靶实体检测系统可包含多个(例如,至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或更多个)不同的检测探针(例如,如本文所述)组(例如,组合)。在一些实施方案中,方法包括使样品(例如,来自人女性受试者的血液或血液来源的样品)中的关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)与多个检测探针组接触,其中每组可包含如本文所述和/或使用的至少2个或更多个(包括例如至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个或更多个)检测探针。在一些实施方案中,方法包括使包含关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)的样品经受靶实体检测系统(例如,如本文所提供的)。多个检测探针和/或检测探针组合(例如,至少两个或更多个)可同时或在不同时间(例如,顺序地)添加到包含关注的实体(例如,生物实体,诸如细胞外囊泡)的样品中。在一些实施方案中,方法可以包括在与多个检测探针接触之前,使包含关注的实体的样品与至少一种针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的捕获剂接触。

[0401] 在一些实施方案中,来自分析样品中的一种或多种生物标记物组合的结果(例如,Ct值和/或连接的核酸模板(例如,连接的DNA模板)的相对数量)之间的关系可与临床信息(包括例如但不限于患者年龄、既往病史、血清CA-125等)和/或其他信息组合,以更好地对患有卵巢癌或处于患卵巢癌风险的患者进行分类。可以使用各种分类算法来解释多个变量之间的关系,以提高测定的灵敏度和/或特异性。在一些实施方案中,此种算法包括但不限于逻辑回归模型、支持向量机、梯度增强机、随机森林算法、朴素贝叶斯算法、K-最近邻算法及其组合。在一些实施方案中,本文描述的测定的性能(例如,准确性)可例如通过选择生物标记物组合(例如,如本文所述)、选择包括算法的其他因素或变量(例如,临床信息)和/或选择算法本身的类型来提高。

[0402] 在某些实施方案中,本文描述的技术利用预测算法,所述预测算法使用如本文所述的数据组进行训练和验证。在某些实施方案中,本文描述的技术用于使用从训练样品创建的算法产生风险评分,所述评分被设计为考虑来自至少两个,例如至少2个、至少3个、至少4个、至少5个或多于5个包含生物标记物特征的独立测定(例如,如本文所述)的结果。在某些实施方案中,算法产生的风险评分可以至少部分地使用来自至少一个单独测定(例如个体生物标记物特征)的诊断数据(例如原始和/或标准化Ct值)来产生。在某些实施方案中,参考阈值可包括在风险评分内。在某些实施方案中,表示多种不同程度的卵巢癌风险的多个阈值水平可包括在风险评分中。在一些实施方案中,独立的靶生物标记物特征测定可作为一系列测定中的单独测定进行,并且可在预测算法中对单独的测定进行相同或不同的加权。在一些实施方案中,例如,在算法中组合的单独测定的权重(例如,一组生物标记物测定)可由许多因素确定,包括但不限于单独测定的灵敏度、单独测定的特异性、单独测定的重现性、单独测定的可变性、单独测定的阳性预测值和/或特定测定的最低检测限。在一些

实施方案中,可以根据特征(例如,灵敏度、特异性、最低检测限等)对一组生物标记物测定进行排序,然后可以基于它们的相对排序对生物标记物测定进行加权。

[0403] 在一些实施方案中,由算法(如本文所述)产生的风险评分可以合适的方式呈现,例如,以标称尺度,例如,以反映多种可能性的0-100的尺度,例如,所述可能性包括但不限于妇女患有卵巢癌的可能性、妇女将患卵巢癌的可能性和/或卵巢癌的可能阶段。在一些实施方案中,较高的风险评分可以表示疾病病变的可能性增加,例如,从较低到较高的值可反映健康对照、良性对照、I期、II期、III期和IV期卵巢癌。在一些实施方案中,当与其他癌症类型相比时,风险评分可用于降低如本文所述的技术的交叉反应性的可能性。

[0404] 在一些实施方案中,风险评分可由来源于如本文所述的测定的数据与其他适用的诊断数据诸如年龄、生活史、TVUS结果、CA-125水平或其任何组合的组合产生。在一些实施方案中,风险评分提供高于和超过常规标准的护理诊断测定预测值的预测值,例如,高于由单独或组合使用中的TVUS和/或CA-125测定提供的预测值。在一些实施方案中,可产生对卵巢癌(例如,高级别浆液性癌)具有高特异性并且对其他癌症具有低灵敏度的风险评分。

[0405] 在一些实施方案中,风险评分可具有用于检测卵巢癌的相关临床截止值。例如,在一些实施方案中,检测的风险评分临床截止值可能需要对早期和晚期卵巢癌的检测产生至少40%,例如至少50%、至少60%或更高灵敏度,以及在20至89岁的一般健康的妇女群体中具有最小95%的特异性,例如至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更高的特异性的测定。在一些实施方案中,灵敏度和特异性目标是目标为77%灵敏度和99.5%特异性的两侧95%置信区间的近似下限。

[0406] 在一些实施方案中,进行训练研究以提供编程风险评分算法所需的必要数据。在一些实施方案中,此类训练研究可包括来自一系列供应商(至少包括商业供应商、目的驱动的研究和/或医生)的一组样品。在一些实施方案中,训练研究可包括来自高级别浆液性卵巢癌患者(例如,I期、II期、III期和/或IV期)的阳性样品、来自高级别浆液性卵巢癌细胞系的阳性对照样品、来自良性妇科肿瘤患者(如卵巢肿瘤、子宫肿瘤等)的阴性样品、来自非卵巢癌患者(如脑癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肺腺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、皮肤癌等)的阴性样品、来自炎性病患者(例如,克罗恩氏病、子宫内膜异位症、II型糖尿病、狼疮、胰腺炎、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等)的阴性样品、来自健康患者的阴性样品或其任意组合。在一些实施方案中,训练研究可包括来自任何适当年龄范围(例如<31岁、31-40岁、41-50岁、51-60岁、61-70岁、71-80岁,或>80岁)的患者的样品。在一些实施方案中,训练研究可包括来自任何种族/民族/派别的患者(例如,白种人、非洲人、亚洲人等)的样品。

[0407] 在一些实施方案中,进行验证研究以提供确认风险评分算法的效用所需的必要数据。在一些实施方案中,此类验证研究可包括来自一系列供应商(至少包括商业供应商、目的驱动的研究和/或医生)的一组样品。在一些实施方案中,验证研究可包括来自高级别浆液性卵巢癌患者(例如,I期、II期、III期和/或IV期)的阳性样品、来自高级别浆液性卵巢癌细胞系的阳性对照样品、来自良性妇科肿瘤患者(如卵巢肿瘤、子宫肿瘤等)的阴性样品、来自非卵巢癌患者(如脑癌、乳腺癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肺腺癌、黑色素瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、皮肤癌等)的阴性样品、来自炎性病患者(例如,克罗恩氏病、子宫内膜异位症、II型糖尿病、狼疮、胰腺炎、类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎等)的阴性样品、来自健康患

者的阴性样品或其任意组合。在一些实施方案中,验证研究可包括来自任何适当年龄范围(例如<31岁、31-40岁、41-50岁、51-60岁、61-70岁、71-80岁,或>80岁)的患者的样品。在一些实施方案中,验证研究可包括来自任何种族/民族/派别的患者(例如,白种人、非洲人、亚洲人等)的样品。

[0408] 在某些实施方案中,至少一个包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和至少一个(包括例如至少两个或更多个)靶生物标记物(其可以选自任何本文所述的表面蛋白生物标记物、本文所述的囊泡内蛋白生物标记物和/或本文所述的囊泡内RNA生物标记物)的靶生物标记物特征可体现在卵巢癌检测测定中。在一些此类实施方案中,至少一种捕获剂针对细胞外囊泡相关膜结合多肽,并且至少一组检测探针针对一个或多个本文所述的此类靶生物标记物。例如,图20(图B)和图22公开了靶生物标记物特征的某些实例,其中的每一个都可体现在卵巢癌检测测定(例如,本文所述的那些)中。

[0409] 在某些实施方案中,至少两个(包括例如至少三个或更多个)包含至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽和至少一个(包括例如至少两个或更多个)靶生物标记物(其可以选自任何本文所述的表面蛋白生物标记物、本文所述的囊泡内蛋白生物标记物和/或本文所述的囊泡内RNA生物标记物)的不同的靶生物标记物特征可体现在卵巢癌检测测定中。例如,图21公开了使用至少两个卵巢癌的靶生物标记物特征的卵巢癌检测测定,其中第一靶生物标记物特征包含SLC34A1和MUC16,并且第二靶生物标记物特征包含SLC34A2和FOLR1。如图21所示,在一些实施方案中,针对SLC34A2的捕获剂,在一些实施方案中,可固定在固体基底上,例如珠诸如磁珠),用于从患者的血液来源的样品捕获细胞外囊泡。捕获的细胞外囊泡的第一等分试样经过第一组检测探针,每个探针针对MUC16,同时捕获的细胞外囊泡的第二等分试样经过第二组检测探针,每个探针针对FOLR1。图29公开了使用至少三个卵巢癌的靶生物标记物特征的卵巢癌检测测定,其中第一靶生物标记物特征包含SLC34A1和MUC16,第二靶生物标记物特征包含SLC34A2和FOLR1,并且第三靶生物标记物特征包含MUC16和FOLR1。如图29所示,在一些实施方案中,患者的血液来源的样品的等分试样经过针对SLC34A2的第一捕获剂,所述捕获剂在一些实施方案中,可固定在固体基底(例如珠粒,诸如磁珠)上用于捕获细胞外囊泡以进行进一步分析。SLC34A2捕获的细胞外囊泡的第一等分试样经过第一组检测探针,每个探针针对MUC16,同时SLC34A2捕获的细胞外囊泡的第二等分试样经过第二组检测探针,每个探针针对FOLR1。在一些实施方案中,此种患者的血液来源的样品的另一等分试样经过针对MUC16的第二捕获剂,所述捕获剂在一些实施方案中,可固定在固体基底(例如珠粒,诸如磁珠)上用于捕获细胞外囊泡以进行进一步分析。然后使MUC16捕获的细胞外囊泡经过一组处理,所述组包含针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针。

[0410] 如图21和29所示,在一些实施方案中,每个不同的靶生物标记物特征可具有不同的用于单独确定样品是否对卵巢癌呈阳性的预定截止值。在一些实施方案中,如果测定读出高于多个(例如至少2个或更多个)靶生物标记物特征的截止值中的至少一个,则确定样品对卵巢癌呈阳性。在一些实施方案中,可利用截止值(例如,至少2个、至少3个或更多个)的组合来产生具有推论的提高了的灵敏度和/或特异性的诊断值。

[0411] 因此,在一些实施方案中,可将样品分成等分试样,使得可将不同的捕获剂和/或不同组的检测探针(例如,每个针对不同疾病或病状的检测)添加到不同的等分试样中。在

此类实施方案中,所提供的技术可以一次一个等分试样或一次多个等分试样实施(例如,用于平行测定以增加吞吐量)。

[0412] 在一些实施方案中,添加到样品中的检测探针的量在混合物中提供足够低浓度的检测探针,以确保检测探针在没有与关注的实体(例如,生物实体)结合的情况下不会随机地彼此紧密接近,至少没有达到任何很大或实质性的程度。因此,在许多实施方案中,当检测探针通过检测探针的各自的靶结合部分与关注的实体(例如,生物实体)的结合位点之间的结合相互作用同时结合到相同的关注的实体(例如,生物实体)时,检测探针彼此足够紧密接近以形成双链复合物(例如,如本文所述的)。在一些实施方案中,与样品组合后的混合物中检测探针的浓度可在约1fM至1 $\mu$ M的范围内,诸如约1pM至约1 nM,包括约1pM至约100nM。

[0413] 在一些实施方案中,样品中关注的实体(例如,生物实体)的浓度足够低,使得在不存在与同一关注的实体(例如,生物实体)结合的相应检测探针的情况下,结合到一个关注的实体(例如,生物实体)的检测探针不会随机地与结合到另一个关注的实体(例如,生物实体)的另一个检测探针紧密接近,至少没有达到任何很大或实质性的程度。仅举例来说,样品中关注的实体(例如,生物实体)的浓度足够低,使得结合到关注的非靶实体(例如,非癌性生物实体,诸如包含第一靶标的细胞外囊泡)的第一靶检测探针不会随机地与结合到另一个关注的非靶实体(例如,非癌性生物实体,诸如细胞外囊泡)的另一个不同的靶检测探针紧密接近,至少没有达到任何很大或实质性的程度来产生假阳性可检测信号。

[0414] 在使样品中的关注的实体(例如,生物实体)与一组检测探针接触后,可将此种混合物孵育足以使检测探针结合关注的实体中的相应靶标(例如,分子靶标)(如果存在的话)的一段时间,以形成双链复合物(例如,如本文所述)。在一些实施方案中,在约10 $^{\circ}$ C至约50 $^{\circ}$ C范围内(包括约20 $^{\circ}$ C至约37 $^{\circ}$ C)的温度下将此种混合物孵育约5分钟至约5小时范围内(包括约30分钟至约2小时)的时间段。

[0415] 然后可使双链复合物(由使关注的实体诸如生物实体与检测探针接触而产生)随后与核酸连接酶接触以进行检测探针的寡核苷酸链的游离3'端羟基和5'端磷酸端的核酸连接,从而产生包含至少两个或更多检测探针的寡核苷酸链的连接模板。在一些实施方案中,在使包含双链复合物的测定样品与核酸连接酶接触之前,可将至少一种或多种抑制剂寡核苷酸(例如,从如本文所述)添加至测定样品,使得抑制剂寡核苷酸可捕获可在连接反应期间以其他方式彼此相互作用的任何残留的自由浮动检测探针。

[0416] 如本领域中已知的,当两个紧邻的核酸退火或杂交到与它们互补的第三核酸序列时,连接酶催化两个紧邻的核酸的并列的3'-羟基和5'-磷酸末端之间形成磷酸二酯键。可使用任何已知的核酸连接酶(例如,DNA连接酶),包括但不限于温度敏感和/或热稳定连接酶。温度敏感连接酶的非限制性实例包括噬菌体T4 DNA连接酶、噬菌体T7连接酶和大肠杆菌(*E. coli*)连接酶。热稳定连接酶的非限制性实例包括Taq连接酶、Tth连接酶和Pfu连接酶。热稳定连接酶可从嗜热或超嗜热生物获得,包括但不限于原核生物、真核生物或古细菌生物。在一些实施方案中,核酸连接酶为DNA连接酶。在一些实施方案中,核酸连接酶可为RNA连接酶。

[0417] 在一些实施方案中,在连接步骤中,合适的核酸连接酶(例如,DNA连接酶)和必要和/或期望的任何试剂与反应混合物组合,并保持在足以发生杂交的连接寡核苷酸

的条件下。连接反应条件是本领域技术人员所熟知的。在连接期间,在一些实施方案中,可将反应混合物保持在约20℃至约45℃范围内(诸如约25℃至约37℃)的温度下约5分钟至约16小时范围内(诸如约1小时至约4小时)的时间段。在其他实施方案中,可将反应混合物保持在约35℃至约45℃范围内(诸如约37℃至约42℃,例如,是或约38℃、39℃、40℃或41℃)的温度下约5分钟至约16小时范围内(诸如约1小时至约10小时,包括约2小时至约8小时)的时间段。

[0418] 对此种连接模板的检测可提供关于样品中关注的实体(例如,生物实体)对于检测探针所针对的靶标是阳性还是阴性的信息。例如,此种连接模板的可检测水平指示包含关注的靶标(例如,分子靶标)的关注的受试实体(例如,生物实体)。在一些实施方案中,可检测水平是高于参考水平例如至少10%或更多(包括例如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或更多)的水平。在一些实施方案中,参考水平可为在阴性对照样品(诸如其中不存在包含此类靶标的关注的实体的样品)中观察到的水平。相反,此种连接模板的不可检测水平(例如,低于可检测水平的阈值的水平)指示关注的受试实体(例如,生物实体)中不存在关注的靶标(例如,分子靶标)中的至少一个。本领域技术人员将理解,可基于例如被认为对于每个应用和/或目的是最佳的期望灵敏度水平和/或期望特异性水平来确定将可检测水平与不可检测水平分开的阈值。例如,在一些实施方案中,可使用本文提供的系统来实现99.7%的特异性,例如通过设置比参考水平(例如,在阴性对照样品中观察到的水平,例如像来自一个或多个正常健康个体的样品)高三个标准偏差的阈值。另外或替代地,本领域技术人员将理解,可检测水平的阈值(例如,如由检测信号强度所反映的)可比参考水平高1至100倍。

[0419] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括在连接之后,检测连接模板例如作为样品中关注的实体的存在和/或量的量度。在各种实施方案中,连接模板的检测可为定性的或定量的。因此,在检测为定性的一些实施方案中,方法提供了对被测定的样品中是否存在包含至少两个或更多个靶标(例如,分子靶标)的关注的实体(例如生物实体)的读数或评价,例如评估。在其他实施方案中,方法提供了对被测定的样品中是否存在包含至少两个或更多个靶标(例如,分子靶标)的关注的实体(例如,生物实体)的定量检测,例如评价或评估被测定的样品中包含至少两个或更多个靶标(例如,分子靶标)的关注的实体(例如,生物实体)的实际量。在一些实施方案中,此种定量检测可为绝对的或相对的。

[0420] 可通过本领域已知的适当方法检测通过使用本文提供的技术而形成的连接模板。本领域技术人员将理解,可基于例如期望的灵敏度水平和/或实践方法的应用来选择适当的检测方法。在一些实施方案中,可直接检测连接模板而无需任何扩增,而在其他实施方案中,可扩增连接模板以使得连接模板的拷贝数增加,以例如增强特定测定的灵敏度。在不进行扩增的检测是可行的情况下,可以多种不同的方式检测连接模板。例如,检测探针的寡核苷酸结构域(例如,如本文所述和/或使用的)可被直接标记,例如荧光标记或放射性同位素标记,使得连接模板被直接标记。例如,在一些实施方案中,检测探针的寡核苷酸结构域(例如,如本文所提供和/或使用的)可包含可检测标记。可检测标记可为通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电、光学或化学方式可检测的组合物。此类标记包括用于用标记的链霉亲和素缀合物染色的生物素、磁珠(例如DynaBeads®)、荧光染料(例如,荧光素、德克萨斯红、罗丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记(例如, $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{34}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 或 $^{32}\text{P}$ )、酶(例如,辣根过氧

化物酶、碱性磷酸酶和ELISA中常用的其他酶)和量热标记诸如胶体金或有色玻璃或塑料(例如,聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶等)珠。在一些实施方案中,直接标记的连接模板可与反应混合物的其余部分(包括未连接的直接标记的连接寡核苷酸)大小分离,以便检测连接模板。

[0421] 在一些实施方案中,连接模板的检测可包括扩增步骤,其中连接核酸的拷贝数增加,以例如增强测定的灵敏度。根据需要,扩增可为线性的或指数的,其中扩增可包括但不限于聚合酶链反应(PCR);定量PCR、等温扩增、NASBA、数字液滴PCR等。

[0422] 用于实现PCR扩增的各种技术是本领域已知的;本领域技术人员将非常熟悉PCR技术的多种实施方案,并且将能够容易地选择适合扩增使用本文提供的技术产生的连接模板的实施方案。例如,在一些实施方案中,包括连接模板的反应混合物与在引物延伸反应中使用的一个或多个引物组合,例如PCR引物(诸如在几何(或指数)扩增中使用的正向和反向引物或在线性扩增中使用的单个引物)。与一个或多个连接模板接触的寡核苷酸引物应具有足够的长度,以在适当的退火条件下提供与互补模板DNA的杂交。引物的长度通常为至少10bp,包括例如长度为至少15bp、长度为至少20bp、长度为至少25bp、长度为至少30bp或更长。在一些实施方案中,引物的长度通常可在约15bp至50bp长度、约18bp至30bp或约20bp至35bp长度的范围内。连接模板可与单个引物或一组两个引物(正向和反向引物)接触,这取决于是否需要模板DNA的引物延伸、线性或指数扩增。

[0423] 除了上述组分之外,包含连接模板的反应混合物通常还包括聚合酶和脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)。所需的聚合酶活性可由一种或多种不同的聚合酶提供。在制备反应混合物以例如用于连接模板的扩增时,各种组成成分可以任何方便的顺序组合。例如,适当的缓冲液可与一个或多个引物、一种或多种聚合酶和待检测的连接模板组合,或各种组成成分中的所有可同时组合以产生反应混合物。

#### [0424] VI. 用途

[0425] 在一些实施方案中,可例如使用如本文所述的检测方法和/或测定在包含生物实体(包括例如细胞、循环肿瘤细胞、无细胞DNA、细胞外囊泡等)的样品中检测卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物。在一些实施方案中,可例如使用如本文所述的检测方法和/或测定在包含细胞外囊泡的样品中检测卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的一个或多个提供的生物标记物。

[0426] 在一些实施方案中,样品可以是或包含生物样品。在一些实施方案中,生物样品可来源于需要此种测定的受试者(例如,人女性受试者诸如人妇女受试者)的血液或血液来源的样品。在一些实施方案中,生物样品可以是或包含来自需要此种测定的受试者(例如,人受试者)的原始样品(例如,组织或肿瘤样品)。在一些实施方案中,可对生物样品进行处理,以将一个或多个关注的实体(例如,生物实体)与关注的非靶实体分开和/或使一个或多个关注的实体(例如,生物实体)富集。在一些实施方案中,存在于样品中的关注的实体可以是或包含生物实体,例如细胞或细胞外囊泡(例如,外泌体)。在一些实施方案中,可对此种生物实体(例如,细胞外囊泡)进行处理或将其与化学试剂接触,以例如稳定和/或交联生物实体中待测定的靶标(例如,所提供的靶生物标记物)和/或减少与检测探针的非特异性结合。在一些实施方案中,生物实体是或包含细胞,可任选地用例如化学试剂对其进行处理,以用于稳定和/或交联靶标(例如,分子靶标)和/或用于减少非特异性结合。在一些实施方案中,生物实体是或包含细胞外囊泡(例如外泌体),可任选地用例如化学试剂对其进行处理,以

用于稳定和/或交联靶标(例如,分子靶标)和/或用于减少非特异性结合。

[0427] 在一些实施方案中,本文提供的技术可用于管理患者护理,以用于例如一个或多个个体受试者和/或整个受试者群体。仅举例来说,在一些实施方案中,所提供的技术可用于筛查,例如,可定期进行,诸如每年、每半年、每两年或以本领域技术人员认为适当的一些其他频率进行。在一些实施方案中,此种筛查可为临时动机的或偶然动机的。例如,在一些实施方案中,所提供的技术可用于临时动机地筛查大于某个年龄(例如,超过40、45、50、55、60、65、70、75、80岁或以上)的一个或多个个体受试者或整个受试者(例如,无症状女性受试者)群体。如本领域技术人员将理解的,在一些实施方案中,可基于例如但不限于疾病、病症或病状(例如,癌症诸如卵巢癌)的患病率来确定筛查年龄和/或频率。在一些实施方案中,所提供的技术可用于临时动机地筛查可能经历了促使筛查特定疾病、病症或病状(例如,癌症诸如卵巢癌)的事故或事件的个体受试者。例如,在一些实施方案中,与确定疾病、病症或病状(例如,癌症诸如卵巢癌)或其易患性的一个或多个指标相关的偶然动机可以是或包括例如,基于他们的家族史的事故(例如,近亲诸如血缘亲属先前被诊断为此种疾病、病症或病状诸如卵巢癌或乳腺癌);鉴定疾病、病症或病状(例如,卵巢癌)的一个或多个风险因素;和/或来自基因测试(例如,基因组测序)和/或成像诊断测试(例如,超声、计算机断层扫描(CT)和/或磁共振成像(MRI)扫描)的先前偶然发现;发展具有特定疾病、病症或病状特征的一种或多种体征或症状(例如,可能指示卵巢癌的妇女经期异常出血等)和/或如本领域技术人员将理解的其他事故或事件。

[0428] 在一些实施方案中,所提供的用于管理患者护理的技术可通知治疗和/或支付(例如,治疗的报销)决定和/或行动。例如,在一些实施方案中,所提供的技术可提供对个体受试者是否具有疾病、病症或病状(例如,癌症诸如卵巢癌)的风险、发病或复发的一个或多个指标的确定,从而通知医师和/或患者何时根据此类发现提供/接受治疗性或预防性建议和/或何时开始此种治疗。在一些实施方案中,此类个体受试者可以是无症状受试者,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类个体受试者可能正在经历一种或多种可能与卵巢癌相关的症状,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类个体受试者可以是患有良性妇科肿瘤和/或慢性炎性病状的受试者,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类个体受试者可以是处于卵巢癌遗传风险的受试者,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类个体受试者可以是具有生活史相关风险的受试者,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类个体受试者可以是绝经后受试者,可以定期频率(例如,每年、每半年、每两年或本领域技术人员认为适当的其他频率)对其进行暂时动机或偶然动机的筛查。在一些实施方案中,此类绝经后受试者可能正在经历腹痛和/或骨盆疼痛。

[0429] 另外或替代地,在一些实施方案中,所提供的技术可例如基于特定反应性生物标记物(例如,癌症反应性生物标记物)的发现来通知医师和/或患者治疗选择。在一些实施方

案中,所提供的技术可例如基于与疾病相关的一个或多个分子靶标水平的变化的发现来提供对个体受试者是否对当前治疗有反应的确定,从而通知医师和/或患者此类治疗的功效和/或根据此类发现保持或改变治疗的决定。在一些实施方案中,所提供的技术可例如基于预测推荐的治疗对个体受试者的治疗效果的分子靶标(例如,提供的卵巢癌的一个或多个靶生物标记物特征的生物标记物)的发现来提供对个体受试者是否可能对推荐的治疗有反应的确定,从而通知医师和/或患者此类治疗的潜在功效和/或根据此类发现实施或改变治疗的决定。

[0430] 在一些实施方案中,所提供的技术可通知关于健康保险提供者是否报销(或不报销)例如以下的决定:(1) 筛查本身(例如,报销仅可用于周期性/定期筛查或仅可用于临时和/或偶然动机的筛查);和/或(2) 根据所提供的技术的发现开始、保持和/或改变治疗。例如,在一些实施方案中,本公开提供了与以下有关的方法:(a) 接收采用所提供的技术的筛查结果,并且还接收对筛查和/或特定治疗方案的报销请求;(b) 如果根据适当的时间表(例如基于筛查年龄,诸如超过某个年龄,例如超过40岁、45岁、50岁、55岁、60岁、65岁、70岁、75岁、80岁或以上,和/或筛查频率,例如像每3个月、每6个月、每年、每2年、每3年或以一些其他频率)或对相关事件的反应对受试者进行筛查,则批准报销筛查;和/或如果治疗方案根据接收的筛查结果代表适当治疗,则批准治疗的报销方案;以及任选地(c) 实现报销或提供报销被拒绝的通知。在一些实施方案中,如果接收的筛查结果检测到代表相关治疗方案的批准的生物标记物(例如,如可能在处方信息标签和/或通过批准的伴随诊断中所述的生物标记物),则根据接收的筛查结果,治疗方案是适当的。

[0431] 替代地或另外,本公开设想允许或促进如本文所述的筛查结果(例如,如根据本公开产生的)和/或报销决定的报告和/或处理的报告系统(例如,通过一个或多个适当的电子装置和/或一个或多个通信系统实施)。各种报告系统是本领域已知的;本领域技术人员将非常熟悉各种此类实施方案,并且将能够容易地选择适合实现的实施方案。

#### [0432] 示例性用途

##### [0433] A. 卵巢癌发病或复发的检测

[0434] 本公开尤其认识到,基于批量样品而不是以单个生物实体(例如,个体细胞外囊泡)的分辨率对生物实体(例如,细胞外囊泡)中的单个癌症相关生物标记物或多个癌症相关生物标记物进行检测通常在确定从其获得生物实体的受试者是否可能患有或易患癌症(例如,卵巢癌)方面不提供足够的特异性和/或灵敏度。本公开尤其提供了解决此类问题的技术,包括组合物和/或方法,包括例如通过具体要求用于检测的实体(例如,细胞外囊泡)以存在至少两个或更多个靶标(例如,至少两个或更多个提供的卵巢癌的靶生物标记物特征的生物标记物)的组合为特征。在特定实施方案中,本公开教导要求此类实体(例如,细胞外囊泡)以存在(例如,通过表达)对癌症具有特异性的分子靶标(即,相关癌症(例如,卵巢癌)的“靶生物标记物特征”)的组合为特征的技术,而不包含靶向组合(例如,靶生物标记物特征)的生物实体(例如,细胞外囊泡)不会产生可检测的信号。因此,在一些实施方案中,本文提供的技术可用于检测受试者中癌症的风险、发病和/或复发。在一些此类实施方案中,本文提供的技术可用于检测女性受试者中卵巢癌的风险、发病和/或复发。例如,在一些实施方案中,选择两个或更多个提供的生物标记物的组合用于检测特定癌症(例如卵巢癌)或各种癌症(其中一种包括卵巢癌)。在一些实施方案中,提供的用于检测卵巢癌的生物标

记物的特定组合可通过分析鉴定此种预测组合的卵巢癌患者活检的群体或文库(例如,数十、数百、数千、数万、数十万或更多)和/或患者数据来确定。在一些实施方案中,生物标记物的相关组合可为例如通过数据分析鉴定和/或表征的生物标记物。在一些实施方案中,例如,可通过机器学习和/或计算建模来分析一组不同的卵巢癌相关数据(例如,在一些实施方案中,包括批量RNA测序、单细胞RNA(scRNA)测序、质谱、组织学、翻译后修饰数据、体外和/或体内实验数据中的一个或多个)进行分析,以鉴定对卵巢癌具有高度特异性的预测标记物的组合。在一些实施方案中,可基于对与癌症(例如,卵巢癌)不同阶段相关的不同数据(例如,在一些实施方案中,包括批量RNA测序、scRNA测序、质谱、组织学、翻译后修饰数据、体外和/或体内实验数据)的比较和分析来在计算机中确定区分癌症(例如,卵巢癌)阶段的预测标记物的组合。例如,在一些实施方案中,本文提供的技术可用于区分卵巢癌受试者与非卵巢癌受试者,包括例如健康妇女受试者、诊断为患有良性肿瘤或附件肿块的妇女受试者以及患有非卵巢相关疾病、病症和/或病状的妇女受试者(例如,患有非卵巢癌的妇女受试者,或患有炎症肠病或病症的妇女受试者)。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于癌症的早期检测,例如阶段I或阶段II的卵巢癌的检测。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于检测一种或多种卵巢癌亚型,包括例如高级别浆液性卵巢癌、子宫内膜样卵巢癌、透明细胞卵巢癌、低级别浆液性卵巢癌和/或粘液性卵巢癌。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于筛查处于早期高级别浆液性卵巢癌的遗传或平均风险的妇女。

[0435] 在一些实施方案中,本文提供的技术可用于在单次测定中筛查受试者的特定癌症的风险、发病或复发。例如,在一些实施方案中,本文提供的技术可用于筛查受试者的卵巢癌的风险、发病或复发。在一些实施方案中,本文提供的技术可用于在单次测定中筛查受试者的特定癌症或多种(例如,至少2种、至少3种或更多种)癌症的风险或发病。例如,在一些实施方案中,本文提供的技术可用于在单次测定中筛查受试者的多种癌症,其中一种包括卵巢癌,并且其他待筛查的癌症可选自由脑癌(包括例如胶质母细胞瘤)、乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、肺癌和皮肤癌组成的组。

[0436] 在一些实施方案中,可定期(例如,每年、每两年、每三年等)使用所提供的技术来筛查人受试者(例如,人类女性受试者)的卵巢癌(例如,早期卵巢癌)或癌症复发。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者可以是成年人或老年人。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者可以是绝经后妇女。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者可以是老年妇女,例如,65岁以上、70岁以上、至少75岁以上、至少80岁或以上。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者的年龄可为约50岁或以上。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者的年龄可为约50岁或以下。在一些实施方案中,适用于此类筛查的人受试者的年龄可为35岁以上。

[0437] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的发生或复发的技术的受试者可以是绝经后人女性受试者,在一些实施方案中,其可能正在经历腹痛和/或骨盆疼痛。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的发病或复发的技术的受试者可以是至少55岁并且被确定患有良性妇科肿瘤和/或一种或多种慢性炎症性病症的人女性受试者。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的发病或复发的技术的受试者可以是绝经后人女性受试者或年龄至少55岁的人女性受试者,所述受试者具有乳腺癌和/或卵巢癌家族史(例如,有一个或多个一级亲属有乳腺癌和/或卵巢癌史的妇女)、之前接受过癌症

(例如,卵巢癌)治疗、在癌症治疗后处于卵巢癌复发风险、卵巢癌治疗后得到缓解,和/或先前或定期筛查卵巢癌,例如,通过筛查至少一个卵巢癌生物标记物的存在(例如,通过检测血清蛋白CA-125和/或通过经阴道超声(TVUS))。替代地,在一些实施方案中,绝经后人女性受试者或年龄至少55岁的人女性受试者可以是先前未经卵巢癌筛查、未诊断为卵巢癌和/或先前未接受卵巢癌治疗的女性受试者。在一些实施方案中,绝经后人女性受试者或年龄至少55岁的人女性受试者可以是患有良性妇科肿瘤的女性受试者。在一些实施方案中,绝经后受试者可以是易患卵巢癌(例如,处于平均群体风险、由于生活史因素而处于增加的风险、由于绝经而处于增加的风险或具有卵巢癌的遗传风险)的受试者。

[0438] 在一些实施方案中,本公开尤其提供了以下见解:本文描述和/或利用的技术对于筛查某些女性受试者群体特别有用,例如,对患卵巢癌具有较高易感性的女性受试者。在一些实施方案中,本公开尤其认识到本文描述和/或用于HGSOC检测的技术的所得PPV在卵巢癌易发群体或易感群体中可能更高。在一些实施方案中,本公开尤其提供了以下见解:对绝经后个体进行筛查(例如,在出现症状之前或以其他方式在没有出现症状的情况下进行定期筛查)可能是有益的,并且甚至对于卵巢癌的有效管理(例如,成功治疗)是重要的。在一些实施方案中,本公开提供了卵巢癌筛查系统,在一些实施方案中,所述卵巢癌筛查系统可被实施以检测绝经后个体(例如,有或没有卵巢癌遗传风险和/或生活史风险,和/或有或没有诸如腹痛和/或骨盆疼痛的症状)中的卵巢癌,包括早期癌症。在一些实施方案中,可以实施所提供的技术以实现绝经后个体(例如,有或没有卵巢癌遗传风险和/或生活史风险,和/或有或没有诸如腹痛和/或骨盆疼痛的症状)的定期筛查。在一些实施方案中,所提供的技术实现对卵巢癌的一个或多个特征(例如,发病、进展、对治疗的反应性、复发等)的检测(例如,早期检测,例如,在一个或多个有症状或无症状个体和/或一个或多个群体中),其中灵敏度和/或特异性(例如,假阳性和/或假阴性结果的比率)适用于允许将所提供的技术有用地应用于单次和/或定期(例如,周期性)评估。在一些实施方案中,所提供的技术与妇女的定期体格检查诸如乳房X线照片、HPV和/或巴氏涂片筛查(例如,每年、每隔一年或以主治医师批准的间隔)结合是有用的。在一些实施方案中,所提供的技术可用于与一种或多种治疗方案结合;在一些实施方案中,所提供的技术可改进这样的一种或多种治疗方案的一个或多个特征(例如,根据接受的参数的成功率)。

[0439] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的发病或复发的技术的受试者可以是无症状人女性受试者和/或整个无症状女性受试者群体。此类无症状受试者和/或整个无症状女性受试者群体可为具有乳腺癌和/或卵巢癌家族史(例如,有一个或多个一级亲属有乳腺癌和/或卵巢癌史的女性)、之前接受过癌症(例如,卵巢癌)治疗、在癌症治疗后处于卵巢癌复发的风险、卵巢癌治疗后得到缓解,和/或先前或定期筛查卵巢癌,例如,通过筛查至少一个卵巢癌生物标记物的存在(例如,通过检测血清蛋白CA-125和/或通过经阴道超声(TVUS))的一个或多个受试者。替代地,在一些实施方案中,无症状受试者可以是先前未经卵巢癌筛查、未诊断为卵巢癌和/或先前未接受卵巢癌治疗的女性受试者。在一些实施方案中,无症状受试者可以是患有良性妇科肿瘤的女性受试者。在一些实施方案中,无症状受试者可以是易患卵巢癌(例如,处于平均群体风险或具有卵巢癌遗传风险)的受试者。

[0440] 在一些实施方案中,可基于一个或多个特征来选择适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体,所述一个或多个特征诸如年龄、种族、遗传史、病史、个人

史(例如,吸烟、酒精、药物、致癌剂、饮食、肥胖、身体活动、光暴露、放射暴露、暴露于诸如病毒的感染性因子和/或职业危害)。例如,在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为确定具有卵巢癌相关基因(包括但不限于,例如,BARD1、BRIP1、RAD51C、RAD51D、CHEK2、MRE11A、RAD50、ATM、BRCA1、BRCA2、CDKN2A、MSH2、MLH1、MSH2、EPCAM、PALB2、STK11、TP53及其组合)中的一个或多个种系突变的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为被确定在特定基因座或某些基因(通过与卵巢癌相关的基因组广泛关联研究确定,包括但不限于例如WNT4、RSP01、BCL2L11、HOXD3、HAGLR、TIPARP、SYNP02、TERT、GPX6、CHMP4C、LINC00824、COL15A1、SMC2-AS1、MLLT10、INCENP、RCCD1、ATAD5、HNF1B、PLEKHM1、SKAP1、ANKLE1、GATAD2A、Cytobands和SNPs 2q13rs752590、4q32.3rs4691139、9p22 rs3814113、9q34.2rs635634、10p11.21 rs1192691和/或19q13.2rs688187)内有一个或多个种系单核苷酸多态性的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体(Reid等人,2017;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

[0441] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为患有确定在BRCA1、BRCA2和/或PALB2中具有种系突变的乳腺癌的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。

[0442] 在一些实施方案中,可基于一个或多个特征来选择适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体,所述一个或多个特征诸如年龄、种族、遗传史、病史、个人史(例如,吸烟、酒精、药物、致癌剂、饮食、肥胖、糖尿病、未产妇/不孕症、无口服避孕药使用史/短期史、体力活动、光暴露、放射暴露、会阴滑石粉使用、激素替代疗法(HRT)、暴露于诸如病毒的感染性因子和/或职业危害)。例如,在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为确定具有一个或多个生活史相关风险因素的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。

[0443] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为诊断有影像学证实的附件肿块或盆腔肿块的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。

[0444] 例如,在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为在经历双侧输卵管卵巢切除术之前处于遗传风险的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。

[0445] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为具有一种或多种卵巢癌非特异性症状的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。在一些实施方案中,卵巢癌的示例性非特异性症状可包括类似于肠易激综合征的一种或多种症状的症状。

[0446] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的发病或复发的技术的受试者可以是有症状女性受试者和/或整个有症状女性受试者群体。此类有症状受试者和/或整个有症状女性受试者群体可为具有乳腺癌和/或卵巢癌家族史(例如,有一个或多个一级亲属有乳腺癌和/或卵巢癌史的妇女)、之前接受过癌症(例如,卵巢癌)治疗、在癌症治疗后处于卵巢癌复发风险、卵巢癌治疗后得到缓解,和/或先前或定期筛查卵巢癌,例如,通过筛

查至少一个卵巢癌生物标记物的存在(例如,通过检测血清蛋白CA-125和/或通过经阴道超声(TVUS))的一个或多个受试者。替代地,在一些实施方案中,有症状受试者可以是先前未经卵巢癌筛查、未诊断为卵巢癌和/或先前未接受卵巢癌治疗的女性受试者。在一些实施方案中,有症状受试者可以是患有良性妇科肿瘤的女性受试者。在一些实施方案中,有症状的受试者可以是易患卵巢癌(例如,处于平均群体风险、具有卵巢癌的遗传风险、具有卵巢癌的生活史相关风险和/或具有卵巢癌的年龄相关风险)的受试者。

[0447] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为亚洲人、非裔美国人、白种人、夏威夷原住民或其他太平洋岛民、西班牙裔或拉丁裔、美国印第安人或阿拉斯加原住民、非西班牙裔黑人或非西班牙裔白人女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为亚太岛民、西班牙裔、美国印第安人/阿拉斯加原住民、非西班牙裔黑人或非西班牙裔白人女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可为任何种族和/或任何族裔的女性受试者(例如,妇女)或女性受试者(例如,妇女)群体。

[0448] 在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可确定具有正常的血清CA-125水平(例如,低于35U/mL的水平)。在一些实施方案中,适用于所提供的用于检测卵巢癌的技术的受试者或受试者群体可确定具有等于或高于正常血清CA-125水平的血清CA-125水平(例如,低于35U/mL的水平)。

[0449] 在一些实施方案中,本文提供的技术可与其他诊断测定组合使用,所述诊断测定包括例如但不限于(i)妇女的年度体格检查(例如,包括HPV和/或宫颈癌的巴氏涂片筛查以及乳腺癌的乳房X线照片筛查);(ii)血清CA-125和/或TVUS筛查测试;(iii)筛查血浆中与癌症相关的循环肿瘤DNA和/或蛋白生物标记物的基因突变的基因测定;(iv)涉及免疫荧光染色以鉴定细胞表型和标记物表达的测定,之后扩增和通过下一代测序进行分析;以及(v)BRCA1和/或BRCA2种系和体细胞突变测定,或涉及无细胞肿瘤DNA、液体活检、血清蛋白和无细胞DNA、OVA1®和OVERA®测试和/或循环肿瘤细胞的测定。

[0450] B. 癌症治疗的选择(例如,卵巢癌治疗)

[0451] 在一些实施方案中,所提供的技术可用于为癌症患者(例如,患有或易患卵巢癌的患者)选择适当的治疗。例如,本文提供的一些实施方案涉及用于癌症治疗(例如,卵巢癌和/或辅助治疗)的患者分类的伴随诊断测定,其包括使用本文提供的技术在患者样品(例如,来自卵巢癌患者的血液或血液来源的样品)中评估提供的生物标记物的选定组合。基于此种测定结果,被确定更可能对癌症治疗(例如,卵巢癌治疗和/或辅助治疗,包括例如奥拉帕利(olaparib)、顺铂、鲁卡帕尼(rucaparib)、尼拉帕尼(niraparib)、他拉唑帕尼(talazoparib))作出反应的患者可施用此种治疗,或被确定对特定的此类治疗无反应的患者可施用不同的治疗。

[0452] C. 治疗功效(例如,癌症治疗功效)的评估

[0453] 在一些实施方案中,本文提供的技术可用于监测和/或评估施用于癌症患者(例如,卵巢癌患者)的抗癌疗法的功效。例如,可在第一时间点从抗癌治疗之前或正在接受抗癌治疗(例如,奥拉帕利、顺铂、鲁卡帕尼、尼拉帕尼、他拉唑帕尼)的卵巢癌患者收集血液或血液来源的样品以检测或测量肿瘤负荷,例如通过检测包含对卵巢癌检测具有特异性的生

物标记物的选定组合的细胞外囊泡的存在或量。治疗一段时间后,可从同一卵巢癌患者收集第二血液或血液来源的样品以检测肿瘤负荷的变化,例如通过检测包含对卵巢癌检测具有特异性的生物标记物的选定组合的细胞外囊泡不存在或量的减少。通过在治疗过程中监测肿瘤负荷的水平和/或变化,可采取适当的行动过程,例如增加或减少治疗剂的剂量,和/或施用不同的治疗剂。

#### [0454] VII. 试剂盒

[0455] 还提供了可用于实践如上所述的技术的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒包含多个检测探针(例如,如本文所述和/或使用的)。在一些实施方案中,所提供的试剂盒可包含两个或更多个(例如,3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)检测探针。在一些实施方案中,单独的检测探针可针对不同的靶标。在一些实施方案中,两个或更多个单独的检测探针可针对相同的靶标。在一些实施方案中,所提供的试剂盒包含针对不同靶标的两个或更多个不同的检测探针,并且任选地可包含也针对另一检测探针所针对的靶标的至少一个另外的检测探针。在一些实施方案中,所提供的试剂盒包含多个检测探针子集,其中每个子集包含针对相同的靶标的两个或更多个检测探针。在一些实施方案中,多个检测探针可作为容器中的混合物提供。在一些实施方案中,多个检测探针子集可作为单独容器中的单独混合物提供。在一些实施方案中,每个检测探针在独立容器中单独地提供。

[0456] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的试剂盒包含:(a) 捕获剂,其包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶捕获部分;以及(b) 一组检测探针,所述组包含至少两个检测探针,每个检测探针针对卵巢癌的靶生物标记物特征的靶生物标记物,其中检测探针各自包含:(i) 靶结合部分,其针对卵巢癌的靶生物标记物特征的靶生物标记物;以及(ii) 偶联至靶结合部分的寡核苷酸结构域,所述寡核苷酸结构域包含双链部分和从寡核苷酸结构域的一端延伸的单链悬突部分,其中所述至少两个检测探针的单链悬突部分的特征在于它们在所述至少两个检测探针结合至相同的细胞外囊泡时能彼此杂交。

[0457] 在这些实施方案中,此种卵巢癌的靶生物标记物特征包括:

[0458] 至少一个细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物和选自由以下组成的组的至少一个靶生物标记物:表面蛋白生物标记物、囊泡内蛋白生物标记物和囊泡内RNA生物标记物,其中:

[0459] • 所述表面蛋白生物标记物选自CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合;

[0460] • 所述囊泡内蛋白生物标记物选自CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合;

[0461] • 所述囊泡内RNA生物标记物选自CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;

[0462] 在一些实施方案中,当至少一个靶生物标记物选自提供的表面蛋白生物标记物中的一个或多个时,选定的一个或多个表面蛋白生物标记物和至少一种细胞外囊泡相关膜结合多肽是不同的。在一些实施方案中,当至少一个靶生物标记物选自提供的表面蛋白生物标记物中的一个或多个时,选定的一个或多个表面蛋白生物标记物和至少一种细胞外囊泡

相关膜结合多肽是相同的(具有相同或不同的表位)。

[0463] 在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽生物标记物的靶标捕获部分,其是或包含CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、EpCAM、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

[0464] 在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含SLC34A2多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含MUC16多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含FOLR1多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含LRRTM1多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含TACSTD2多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含CD24多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含PTGS1多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含MUC1多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含sTn多肽糖基化。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,该多肽是或包含MSLN多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含ALPL多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含BST2多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含CLDN3多肽。在一些实施方案中,试剂盒中提供的捕获剂包含针对细胞外囊泡相关膜结合多肽的靶标捕获部分,其是或包含CLDN6多肽。

[0465] 在一些实施方案中,试剂盒中提供的至少两个检测探针的靶结合部分各自针对靶生物标记物特征的相同靶生物标记物。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含MUC16。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含FOLR1。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含CLDN3。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含CLDN6。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含SLC34A2。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含SLC2A1。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含MUC1。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含MSLN。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含AQP5。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含sTn。在一些实施方案中,此类相同的靶生物标记物是或包含TACSTD2。在一些此类实施方案中,这样的至少两个检测探针的寡核苷酸结构域是不同的。

[0466] 在一些实施方案中,试剂盒中提供的至少两个检测探针的靶结合部分各自针对靶生物标记物特征的不同靶生物标记物。例如,在一些实施方案中,试剂盒包含至少两个针对MUC16多肽和FOLR1多肽的检测探针。在一些实施方案中,试剂盒包含至少两个针对MUC16多

肽和CLDN3多肽的检测探针。在一些实施方案中,试剂盒包含至少两个针对FOLR1多肽和CLDN3多肽的检测探针。在一些实施方案中,试剂盒包含至少两个针对MUC16多肽和CLDN6多肽的检测探针。

[0467] 在一些实施方案中,监测探针的靶结合部分可以是或包含抗体(例如,单克隆抗体)。

[0468] 在一些实施方案中,试剂盒可包含至少一种化学试剂,诸如固定剂、透化剂和/或封闭剂。

[0469] 在一些实施方案中,试剂盒可包含一种或多种核酸连接试剂(例如,核酸连接酶,诸如DNA连接酶和/或缓冲溶液)。

[0470] 在一些实施方案中,试剂盒可包含至少一种或多种扩增试剂,诸如PCR扩增试剂。在一些实施方案中,试剂盒可包含一种或多种核酸聚合酶(例如,DNA聚合酶)、一对或多对引物、核苷酸和/或缓冲溶液。

[0471] 在一些实施方案中,试剂盒可包含用于捕获关注的实体(例如,生物实体)的固体基底。例如,此种固体基底可以是或包含珠(例如,磁珠)。在一些实施方案中,此种固体基底可以是或包含表面。在一些实施方案中,表面可以是或包含测定室的捕获表面(例如,实体捕获表面),例如像过滤器、基质、膜、板、管、孔(例如但不限于微孔)等。在一些实施方案中,固体基底的表面(例如,捕获表面)可涂覆有用于关注的实体(例如,生物实体)的捕获剂(例如,多肽或抗体剂)。

[0472] 在一些实施方案中,可选择试剂盒中提供的一组检测探针用于诊断卵巢癌。

[0473] 在一些实施方案中,试剂盒可包含多个检测探针组,其中每组检测探针针对特定癌症的检测并且包含至少2个或更多个检测探针。例如,此种试剂盒可用于在单次测定中筛查受试者的各种癌症,其中一种是卵巢癌,而其他癌症可选自皮肤癌、肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、脑癌和肝癌。

[0474] 在一些实施方案中,本文提供的试剂盒可包括用于实践本文所述的方法的说明书。这些说明书可以多种形式存在于试剂盒中,所述形式中的一种或多种可存在于所述试剂盒中。这些说明书可存在的一种形式是在合适的介质或基底上打印信息,例如,在试剂盒的包装、包装说明书等中打印信息的一张或多张纸。又一手段可以是计算机可读介质,例如在其上记录有说明信息的磁盘、CD、USB驱动器等。可存在的又一手段是网站地址,其可通过互联网用以存取说明信息。试剂盒中可存在任何方便的方式。

[0475] 在试剂盒用作伴随诊断的一些实施方案中,此类试剂盒可包括用于鉴定可能对治疗剂作出反应的患者的说明(例如,鉴定指示患者对治疗剂反应性的生物标记物)。在一些实施方案中,此类试剂盒可包含与伴随诊断测试串联使用的治疗剂。

[0476] 本发明的其他特征将在以下示例性实施方案的描述过程中变得明显,给出所述示例性实施方案是为了说明本发明,并且不旨在限制本发明。

[0477] 例示

[0478] 实施例1:与卵巢癌相关的单个细胞外囊泡中的示例性靶生物标记物特征的检测

[0479] 本实施例描述了针对靶标(例如,一个或多个靶生物标记物)的检测探针的合成,每个靶标包含靶结合部分和偶联至靶结合部分的寡核苷酸结构域(包含双链部分和单链悬突)。本实施例进一步展示了使用此类检测探针来检测包含两个或更多个不同靶标的生物

实体(例如,细胞外囊泡)的存在或不存在。

[0480] 在一些实施方案中,检测探针可包含双链寡核苷酸,其一端具有对靶癌症生物标记物具有特异性的抗体剂且另一端具有单链悬突。当两个或更多个检测探针结合到同一生物实体(例如,细胞外囊泡)时,检测探针的单链悬突紧密接近,使得它们可相互杂交以形成双链复合物,其可随后被连接并扩增以进行检测。

[0481] 此研究在一组中使用了至少两个检测探针。在一些实施方案中,这样的至少两个检测探针针对相同的靶标,其可针对相同靶标的不同表位或相同靶标的相同表位。在一些实施方案中,这样的至少两个检测探针针对不同的靶标。阅读本公开的技术人员将理解两个检测探针可针对不同的靶生物标记物,或者可使用三个或更多个检测探针,每个针对不同的靶蛋白。此外,描述于本实施例中的组合物和方法可扩展到不同生物样品(例如,包含细胞外囊泡)中的应用。

[0482] 本实施例示出来自某些实验的实验数据,证明本文提供的技术能够使用如本文所述的示例性生物标记物组合(例如,SLC34A2和MUC16,例如,在一些实施方案中,使用基于MUC16+MUC16抗体的检测探针的SLC34A2捕获)检测患者样品中的卵巢癌(例如,卵巢囊腺癌和/或高级别浆液性卵巢癌)。第一个实验展示了在PBS中使用本文所述的双链体系测定检测两种不同的卵巢癌细胞系衍生的细胞外囊泡(CLD-EV)。参见,例如图3。

[0483] 使用此种能够检测CLD-EV的双链体系测定,进行了含有来自每个阶段(阶段I至阶段IV)和/或亚型的卵巢癌以及来自不同对照组(例如,健康受试者、患有良性妇科肿瘤的受试者和非卵巢癌受试者)的患者样品的研究。请参见实施例6,图7-13示出了示例性双链体系测定的性能,所述测定涉及包含SLC34A2和MUC16的靶生物标记物特征。

#### [0484] 示例性测定概述

[0485] 在一些实施方案中,本文所述的靶实体检测系统为双链体系。在一些实施方案中,此种双链体系(例如,如图2所示)使用各自识别不同表位的两种抗体。成对的双链模板DNA也用于qPCR,每个双链模板DNA都具有与其配偶体上的5'悬突互补的特定四碱基5'悬突。每个抗体都与两个双链DNA模板中的一个缀合。当抗体结合它们的靶表位时,相应模板的粘性末端可杂交。然后在PCR扩增之前,这些粘性末端通过T7连接酶连接在一起。为了在两个DNA模板之间发生杂交,两个抗体需要彼此足够紧密地结合(DNA接头和抗体的长度在50nm至60nm内)。结合但保持未连接的任何模板都不会产生PCR产物,如图2所示。

#### [0486] 健康对照与I、II、III和IV期卵巢囊腺癌(OC)血浆:

[0487] 对来自健康对照和OC患者的血浆样品进行处理以获得纯化的细胞外囊泡,使用如下所述的示例性测定对其进行询问。

[0488] 使用与抗SLC34A2抗体共价缀合的磁珠捕获纯化的EV。使用一组两个检测探针对由珠捕获的EV进行分析,每个检测探针包含抗MUC16抗体和不同的寡核苷酸结构域(例如,如本文所述的那些)。

[0489] 仔细选择癌症SLC34A2和MUC16的生物标记物组合,以最小化与健康组织来源的细胞外囊泡的交叉反应。此种生物标记物组合与健康组织的交叉反应性部分地是通过使用卵巢囊腺癌中差异表达的mRNA的热图进行生物信息学预测的。因此,可预测与来自健康组织的细胞外囊泡表面相比,卵巢癌细胞外囊泡表面上的标记物的不同组合要丰富得多。在一些实施方案中,此种生物标记物组合包含SLC34A2和MUC16。

[0490] 表2. 以下生物标记物组合的转录表达分数, 如在某些卵巢癌细胞系与阴性对照细胞系 (例如, 非卵巢癌细胞系) 中表达的

|        |         |         |         |        |
|--------|---------|---------|---------|--------|
| [0491] | 基因      | 卵巢癌细胞系1 | 卵巢癌细胞系2 | 阴性非卵巢癌 |
|        | SLC34A2 | +++     | +       | -      |
|        | MUC16   | +++     | +       | -      |

[0492] 示例性方法:

[0493] 寡核苷酸

[0494] 在一些实施方案中, 寡核苷酸可具有以下序列结构和修饰。应当注意, 下面的链数对应于与图2中所示的链相关的数值。

[0495] 连1 v1:

[0496] /5AzideN/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT, 其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团, 或

[0497] /5AmMC12/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT, 其中/5AmMC12/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基 (例如, 伯氨基), 或

[0498] /5ThiolMC6/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT, 其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇。

[0499] 链2 v1:

[0500] /5AzideN/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCCTGTCTCACTAG, 其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团, 或

[0501] /5AmMC12/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCCTGTCTCACTAG, 其中/5AmMC12/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基 (例如, 伯氨基), 或

[0502] /5ThiolMC6/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCCTGTCTCACTAG, 其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇

[0503] 链3 v1:

[0504] /5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGGATGTCAAGGGTAGCAGCGACGATTAACGACTGCTGTGTCAGACTG, 其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0505] 链4 v1:

[0506] /5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAACTGGACAGTGGCTAATCAGGCAAGGCTATGGTCACTGTAGGTCAGGTC, 其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0507] 链5 v1:

[0508] CAGTCTGACACAGCAGTCGT

[0509] 连6 v1:

[0510] GACCTGACCTACAGTGACCA

[0511] 链7 (探针) v1:

[0512] /56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/, 其中/56-FAM/是指位于5'寡核苷酸末端的荧光素 (例如, 6-FAM); 并且/3IABkFQ/是指位于3'寡核苷酸末端的荧光素猝灭剂。

[0513] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有以下序列结构和修饰。应当注意,下面的链数对应于与图2中所示的链相关的数值。

[0514] 链1 v2:

[0515] /5AzideN/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团,或

[0516] /5AmMC12/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5AmMC12/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基(例如,伯氨基),或

[0517] /5ThiolMC6/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇

[0518] 链2 v2:

[0519] /5AzideN/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCCTGTCTCTACTAG,其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团,或

[0520] /5AmMC12/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCCTGTCTCTACTAG,其中/5AmMC12/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基(例如,伯氨基),或

[0521] /5ThiolMC6/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCTCTCTCTCTACTAG,其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇

[0522] 链3 v2:

[0523] /5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGGATGTCAAGGGTAGCAGCGACGATTAACGAGTGGTGAGTCAGACTG,其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0524] 链4 v2:

[0525] /5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAACTGGACAGTGGCTAATCAGGCAAGGCTATGGACTTCGTAGGTCTGGTG,其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0526] 链5 v2:

[0527] CAGTCTGACTCACCCTCGT

[0528] 链6 v2:

[0529] CACCAGACCTACGAAGTCCA

[0530] 链7(探针) v2:

[0531] /56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/,其中/56-FAM/是指位于5'寡核苷酸末端的荧光素(例如,6-FAM);并且/3IABkFQ/是指位于3'寡核苷酸末端的荧光素猝灭剂。

[0532] 在一些实施方案中,寡核苷酸可具有以下序列结构和修饰。应当注意,下面的链数对应于与图2中所示的链相关的数值。

[0533] 链1 v1-med:

[0534] /5AzideN/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团,或

[0535] /5AmMC12/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5AmMC12/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基(例如,伯氨基),或

[0536] /5ThiolMC6/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT,其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇。

[0537] 链2 v1-med:

[0538] /5AzideN/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG,其中/5AzideN/是指通过NHS酯接头连接到5'寡核苷酸末端的叠氮基团,或

[0539] /5AmMC12/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG,其中/5AmMC1/是指通过12碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的氨基(例如,伯氨基),或

[0540] /5ThiolMC6/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG,其中/5ThiolMC6/是指通过6碳间隔基连接到5'寡核苷酸末端的硫醇

[0541] 链3 v1-med:

[0542] /5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGACTGCTGTGTCAGACTG,其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0543] 链4 v1-med:

[0544] /5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAATGGTCACTGTAGGTCAGGTC,其中/5Phos/是指连接到5'寡核苷酸末端的磷酸酯基团

[0545] 链5 v1:

[0546] CAGTCTGACACAGCAGTCGT

[0547] 链6 v1:

[0548] GACCTGACCTACAGTGACCA

[0549] 链7(探针) v1:

[0550] /56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/,其中/56-FAM/是指位于5'寡核苷酸末端的荧光素(例如,6-FAM);并且/3IABkFQ/是指位于3'寡核苷酸末端的荧光素猝灭剂。

[0551] 抗体-寡核苷酸(例如,抗体-DNA)缀合:

[0552] 将25μg至100μg范围内的抗体等分试样与寡核苷酸链缀合,例如,60μg抗MUC16抗体等分试样与杂交的1+3和2+4链缀合,例如,使用无铜点击化学。第一步是制备DBC0功能化抗体以参与与叠氮化物修饰的寡核苷酸结构域(例如DNA结构域)的缀合反应。这开始于抗体与DBC0-PEG5-NHS异源双功能交联剂的反应。在室温下使NHS酯和可用赖氨酸基团之间的反应进行2小时,之后使用离心超滤去除未反应的交联剂。为了完成缀合,使叠氮化物修饰的寡核苷酸结构域(例如,DNA结构域)和DBC0功能化抗体在室温下反应过夜。使用Qubit蛋白测定测量缀合抗体的浓度。

[0553] 细胞培养

[0554] 使阴性对照细胞(例如,非卵巢癌细胞,诸如黑色素瘤细胞或健康细胞)在具有10%无外泌体FBS和50单位的青霉素/链霉素/mL的伊格尔(Eagle's)最低必须培养基(EMEM)中生长。使卵巢囊腺癌细胞在具有10%无外泌体FBS和50单位的青霉素/链霉素/mL的罗斯威尔公园纪念研究所(Roswell Park Memorial Institute)(RPMI1640)中生长。可用于开发用于检测卵巢癌的测定的示例性卵巢癌细胞系(例如,如本文所述的那些)包括但不限于A2780、Caov-3、COV413A、ES2、OVCAR-3、OV90、PA-1、SK-OV-3、SW 626、TOV-112以及描述于Ince等人,“Characterization of twenty-five ovarian tumor cell lines that

phenocopy primary tumours”Nature Communications 6:7419 (2015) (其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)中的细胞系。所有细胞系均保持在5%CO<sub>2</sub>和37℃下,并且传代数低于20。

[0555] 从细胞培养基中纯化细胞外囊泡

[0556] 在一些实施方案中,卵巢癌细胞和阴性对照细胞在它们各自的培养基中生长,直到它们达到约80%汇合。收集细胞培养基并在室温(RT)下以300x rcf旋转5分钟以去除细胞和碎片。然后收集上清液并在-80℃下冷冻。

[0557] 使用前,将储存在-80℃下的冷冻上清液解冻,然后澄清细胞和大的(例如,直径大于1微米)细胞碎片。使用离心澄清解冻的上清液。

[0558] 在一些实施方案中,使澄清的细胞培养基(例如,约500μL)通过尺寸排阻纯化柱。为每个样品收集具有约65nm至约1000nm大小范围的纳米颗粒。在一些实施方案中,可能需要较小的颗粒范围。

[0559] 颗粒计数:

[0560] 例如,用使用TS400芯片的SpectroDyne颗粒计数仪器获得颗粒计数,以测量65nm和1000nm之间的纳米颗粒范围。在一些实施方案中,可能需要较小的颗粒范围。

[0561] 产生患者血浆池:

[0562] 在一些实施方案中,使用混合患者血浆池。简而言之,将1mL的患者血浆等分试样在室温下解冻至少30分钟。将管短暂涡旋并向下旋转以将血浆固结到每个管的底部。将来自给定患者群组的血浆样品合并适当大小的容器中,并通过上下混合彻底混合。每个血浆池在低蛋白吸附(Protein Lo-bind)的1.5mL Eppendorf管中分成1mL等分试样,并在-80℃下重新冷冻。

[0563] 全血浆澄清(任选):

[0564] 在一些实施方案中,在EV纯化之前,不参与样品处理的人员对样品进行盲检。患者身份信息仅在实验完成后才显示出来,以便进行数据分析。从-80℃下的储存中取出1mL等分的全血浆,并对其进行三次澄清旋转以去除细胞、血小板和碎片。

[0565] 从澄清血浆中纯化EV的尺寸排阻色谱法:

[0566] 每个澄清的血浆样品(个体样品或混合样品)都通过单次使用的尺寸排阻纯化柱来分离EV。为每个样品收集具有约65nm至约1000nm大小范围的纳米颗粒。在一些实施方案中,可能需要较小的颗粒范围。

[0567] 捕获抗体与磁性捕获珠的缀合:

[0568] 抗体与磁珠(例如,环氧官能化的Dynabeads™)缀合。简而言之,在无菌环境中对珠进行称重并将其重悬于缓冲液中。将抗体与功能化珠混合,并在直立圆筒混合的情况下发生缀合反应。使用缀合试剂盒提供的洗涤缓冲液将珠洗涤数次,并在4℃下储存在所提供的储存缓冲液中。

[0569] 使用抗体缀合的磁珠直接捕获纯化的血浆EV:

[0570] 在某些实施方案中,从澄清的血浆样品中直接捕获纯化的血浆EV。例如,对于SLC34A2捕获,例如在室温下,将纯化的血浆EV的稀释样品与缀合有抗SLC34A2抗体的磁珠一起孵育适当的时间段。

[0571] 抗体-寡核苷酸缀合物与结合在磁性捕获珠上的EV的结合:

[0572] 在适当的缓冲液中以最佳浓度稀释抗体-寡核苷酸偶联物(例如,抗MUC16抗体-寡核苷酸偶联物;“抗体探针”)。允许抗体探针与包含结合在磁性捕获珠上的EV的样品相互作用。

[0573] 结合后洗涤:

[0574] 在一些实施方案中,将样品在适当的缓冲液中洗涤(例如,多次洗涤)。

[0575] 连接:

[0576] 洗涤以去除未结合的抗体-寡核苷酸缀合物后,将具有结合的细胞外囊泡和结合的抗体-寡核苷酸缀合物的珠与连接混合物接触。将混合物在RT下孵育20分钟。

[0577] PCR:

[0578] 连接后,将具有结合的细胞外囊泡和结合的抗体-寡核苷酸缀合物的珠与PCR混合物接触。例如,在Quant Studio 3上使用以下示例性PCR方案在96孔板中进行PCR:在95℃下保持1分钟,进行在95℃下持续5秒和在62℃下持续15秒的50个循环。选择的温度变化率是标准的(每秒2℃)每次实验重复进行一次qPCR反应,并且将ROX用作被动参考以将qPCR信号归一化。然后从Quant Studio 3机器下载数据,并在Python 3.7中进行分析 and 绘制。

[0579] 数据分析:

[0580] 在一些实施方案中,二元分类系统可用于数据分析。在一些实施方案中,可基于参考信号将来自检测测定的信号归一化。例如,在一些实施方案中,通过选择参考样品来计算单个抗体双链体的归一化信号。在一些实施方案中,用于计算任意样品i的归一化信号的方程如下,其中 $\text{Signal}_{\max}$ 是来自最高浓度细胞系EV标准的信号。

$$[0581] \quad \Delta Ct_i = Ct_{\text{ref}} - Ct_i$$

$$[0582] \quad \text{信号}_i = 2^{\Delta Ct_i}$$

$$[0583] \quad \text{标准信号}_i = \frac{\text{信号}_i}{\text{信号}_{\max}}$$

[0584] 代表性结果:

[0585] OC细胞系实验

[0586] 将纯化的细胞系EV在适当的缓冲液中稀释至最佳浓度,并使用SLC34A2功能化珠(例如,1mL或更少的平行测定)捕获。使用MUC16+MUC16抗体探针(也称为“MUC16+MUC16抗体探针”)分析捕获的EV。代表性qPCR数据和 $\Delta Ct$ 值在图3中提供。数据显示,SLC34A2和MUC16的生物标记物组合(例如,与示例性测定例如像如本实施例所述和图1至2中所示组合)能够区分OC衍生的EV与阴性对照细胞系,其信号强度与两个标记物的表达密切相关(参见表2)。

[0587] OC试验性患者血浆研究

[0588] 图4提供了OC患者血浆样品试验性研究中包括的患者的人口统计。小心地在不同的样品群组中尽可能地匹配年龄和性别。

[0589] 如上所述澄清一毫升或更少(例如,500 $\mu$ L或更少、400 $\mu$ L或更少、300 $\mu$ L或更少、200 $\mu$ L或更少或100 $\mu$ L或更少)的患者样品血浆的平行测定,并使用尺寸排阻色谱法纯化EV。使用抗SLC34A2磁珠捕获EV。使用MUC16+MUC16抗体探针对抗SLC34A2磁珠捕获的EV进行分析。请参见实施例6和示出了示例性双链体系统测定的性能的图7-13,所述测定涉及包含

SLC34A2和MUC16的靶生物标记物特征。

**[0590] 讨论:**

**[0591]** 本实施例证明了SLC34A2和MUC16的生物标记物组合(例如,与本实施例中所述和图1-2所示的双链体测定组合)能够以>99.5%的特异性检测早期卵巢囊腺癌。在一些此类实施方案中,生物标记物组合包含SLC34A2捕获和MUC16+MUC16抗体探针。虽然测定信号与血清CA-125水平没有强烈相关性,但跨越更广泛血清CA-125范围的OC阳性和健康对照患者的更大群组可用于证明此种测定在当前临床标准上对卵巢癌诊断的效用。

**[0592]** 在一些实施方案中,SLC34A2捕获与MUC16+MUC16抗体探针的生物标记物组合可应用于具有低水平和中等水平血清CA-125的OC阳性患者和健康患者样品。

**[0593]** 在一些实施方案中,包含CLDN6的生物标记物组合(例如,与SLC34A2和/或MUC16组合)可用于卵巢癌检测测定。

**[0594]** 在一些实施方案中,可使用可为每个抗体添加多达16条寡核苷酸结构域(例如,DNA)链的树枝化基元来代替每个抗体的一条或两条DNA链,以例如增强信噪比。

**[0595] 实施例2:卵巢癌检测的实施方案**

**[0596]** 在一些实施方案中,包含SLC34A2和MUC16的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和MUC16+MUC16抗体探针)可用于检测各种受试者群体(包括例如健康对照、非吸烟者(n=93);良性妇科肿瘤;I期OC;II期OC;III期OC;IV期OC;以及复发OC)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0597]** 在一些实施方案中,包含SLC34A2和FOLR1的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和FOLR1+FOLR1抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0598]** 在一些实施方案中,包含SLC34A2、MUC16和FOLR1的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和MUC16+FOLR1抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0599]** 在一些实施方案中,包含MUC16和CLDN6的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和MUC16+CLDN6抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0600]** 在一些实施方案中,包含MUC16和FOLR1的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和MUC16+FOLR1抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。在一些实施方案中,此种生物标记物组合可以体现在使用MUC16免疫亲和捕获和FOLR1+FOLR1抗体探针检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌的测定中(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0601]** 在一些实施方案中,包含MUC16和CLDN3的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和MUC16+CLDN3抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

**[0602]** 在一些实施方案中,包含FOLR1和CLDN6的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,FOLR1捕获(例如,FOLR1免疫亲和捕获)和FOLR1+CLDN6抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

[0603] 在一些实施方案中,包含LRRTM1和MUC16的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,LRRTM1捕获(例如,LRRTM1免疫亲和捕获)和MUC16+MUC16抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

[0604] 在一些实施方案中,包含FOLR1、SLC34A2和CLDN3的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,FOLR1捕获(例如,FOLR1免疫亲和捕获)和SLC34A2+CLDN3抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

[0605] 在一些实施方案中,包含MUC16、FOLR1和CLDN3的生物标记物组合(例如,在一些实施方案中,MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和FOLR1+CLDN3抗体探针)可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

[0606] 在一些实施方案中,单个生物标记物(例如,本文所述的任何生物标记物)可足以以高特异性和/或高灵敏度有效检测卵巢癌。例如,在一些实施方案中,MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和MUC16+MUC16抗体探针可用于检测各种受试者群体(例如,如本文所述)中的卵巢癌(例如,在如实施例1所述的测定后)。

[0607] 在一些实施方案中,本文所述的两种或更多种生物标记物组合可一起用于检测卵巢癌,以例如增加测定的灵敏度。例如,在一些实施方案中,用于卵巢癌检测的测定可涉及至少两种生物标记物组合,其中第一生物标记物组合可包含SLC34A2和MUC16,并且第二生物标记物组合可包含SLC34A2和FOLR1。例如,在一些实施方案中,包含SLC34A2和MUC16的第一生物标记物组合可体现在涉及SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和MUC16+MUC16抗体探针的测定中。在一些实施方案中,包含SLC34A2和FOLR1的第二生物标记物组合可体现在涉及SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和FOLR1+FOLR1抗体探针的测定中。

[0608] 在一些实施方案中,本文所述的三种或更多种生物标记物组合可一起用于检测卵巢癌,以例如增加测定的灵敏度。例如,在一些实施方案中,用于卵巢癌检测的测定可涉及至少三种生物标记物组合,其中第一生物标记物组合可包含SLC34A2和MUC16;第二生物标记物组合可包含SLC34A2和FOLR1;第三生物标记物组合可包含MUC16和FOLR1。例如,在一些实施方案中,包含SLC34A2和MUC16的第一生物标记物组合可体现在涉及SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和MUC16+MUC16抗体探针的测定中。在一些实施方案中,包含SLC34A2和FOLR1的第二生物标记物组合可体现在涉及SLC34A2捕获(例如,SLC34A2免疫亲和捕获)和FOLR1+FOLR1抗体探针的测定中。在一些实施方案中,包含MUC16和FOLR1的第三生物标记物组合可体现在涉及MUC16捕获(例如,MUC16免疫亲和捕获)和MUC16+FOLR1抗体探针的测定中。

[0609] 实施例3:细胞外囊泡(EV)表面蛋白作为卵巢癌生物标记物的评估

[0610] 在一些实施方案中,卵巢癌检测包括在细胞外囊泡的免疫亲和捕获后至少检测一个或多个EV表面蛋白。

[0611] 在一些实施方案中,存在于细胞外囊泡上的一种或多种表面蛋白或细胞外膜蛋白(“捕获蛋白”)可用于卵巢癌相关细胞外囊泡的免疫亲和捕获。此类捕获蛋白生物标记物的实例可包括但不限于CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHOLD、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组

合。

[0612] 在一些实施方案中, EV免疫测定方法(例如, 本文中描述的那些, 诸如实施例1中的方法) 和生物标记物验证过程(例如, 本文中描述的那些, 诸如实施例1中的方法) 可用于评估作为卵巢癌的生物标记物的另外的表面蛋白。在一些实施方案中, 将针对捕获蛋白(例如, 卵巢癌相关EV中存在的表面蛋白) 的抗体与磁珠缀合, 并首先在细胞系EV上然后在患者样品上评估其结合特定靶蛋白的能力。评估抗体涂覆的珠捕获卵巢癌相关EV的能力, 并使用靶实体检测系统(例如, 如本文所述的双链体系统, 其涉及一组两个检测探针, 每个检测探针针对不同于捕获蛋白的靶标记物) 读取由抗体包被的珠捕获的EV。

[0613] 在一些实施方案中, 可以使用以下表面蛋白生物标记物中的至少一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 读取捕获的EV: CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。在一些实施方案中, 可以使用一组检测探针(例如, 如本文所用和/或描述的) 读取捕获的EV, 检测探针中的至少两个针对以下表面蛋白生物标记物中的一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个): CLDN3、CLDN6、AQP5、CLDN16、FOLR1、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。在一些实施方案中, 一组检测探针包含两个检测探针, 每个探针针对相同的表面蛋白。在一些实施方案中, 一组检测探针包含两个检测探针, 每个探针针对不同的表面蛋白。

[0614] 实施例4: 作为卵巢癌生物标记物的细胞外囊泡中的mRNA (囊泡内mRNA) 的评估

[0615] 在一些实施方案中, 卵巢癌检测包括在细胞外囊泡的免疫亲和捕获后至少检测一个或多个囊泡内mRNA。

[0616] 在一些实施方案中, 存在于细胞外囊泡上的一种或多种表面蛋白或细胞外膜蛋白(“捕获蛋白”) 可用于卵巢癌相关细胞外囊泡的免疫亲和捕获。此类捕获蛋白生物标记物的实例可包括但不限于AQP5、CLDN3、CLDN6、CLDN16、LEMD1、LRRTM1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、FOLR1、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

[0617] 在一些实施方案中, EV核酸检测测定(例如, 使用引物-探针组的逆转录PCR) 和生物标记物验证过程(例如, 本文所述诸如实施例1中所述的那些) 可用于评估卵巢癌的mRNA生物标记物候选物。在一些实施方案中, 将针对捕获蛋白(例如, 卵巢癌相关EV中存在的表面蛋白) 的抗体与磁珠缀合, 并首先在细胞系EV上然后在患者样品上评估其结合特定靶蛋白的能力。评估涂覆抗体的珠捕获卵巢癌相关EV的能力, 并分析涂覆抗体的珠捕获的EV的mRNA含量, 例如, 使用一步定量逆转录PCR (RT-qPCR) 主混合物。

[0618] 在一些实施方案中, 可以通过检测以下mRNA中的至少一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 读取捕获的EV: CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合。在一些实施方案中, 可以通过检测以下使用RT-qPCR的mRNA中的一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 读取捕获的EV: CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合。

[0619] 在一些实施方案中,可通过检测以下mRNA中的至少一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个):CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;和实施例3中描述的EV表面蛋白中的至少一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个)来读取捕获的EV。在一些此类实施方案中,可(i)通过使用RT-qPCR检测以下mRNA中的一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个):CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;和(ii)通过使用一组检测探针(例如,如本文所用和/或描述的)(其中至少一个检测探针针对一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个)实施例3中描述的EV表面蛋白)来读取捕获的EV。在一些此类实施方案中,一组检测探针包含至少一个针对EV表面蛋白的检测探针。在一些此类实施方案中,一组检测探针包含至少两个针对相同EV表面蛋白(具有相同或不同表位)的检测探针。在一些实施方案中,一组检测探针包含至少两个针对不同EV表面蛋白的检测探针。在一些实施方案中,可以使包含EV表面蛋白和囊泡内mRNA的样品与缀合至单链寡核苷酸(例如,DNA)的抗EV表面蛋白抗体(例如,如实施例3中所述的针对EV表面蛋白的抗体)接触,所述单链寡核苷酸用作一对囊泡内mRNA生物标记物(例如,实施例4中所述)中的两个引物之一,使得抗EV表面蛋白抗体与EV表面蛋白结合,同时缀合的单链寡核苷酸与存在于同一样品中的囊泡内mRNA生物标记物杂交。然后添加所述囊泡内mRNA生物标记物对的第二个引物和RT-qPCR探针以进行RT-qPCR,用于检测单个样品中囊泡内mRNA和EV表面蛋白的存在。

[0620] 在一些实施方案中,可通过检测以下mRNA中的至少一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个):CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;和实施例5中所述的EV囊泡内蛋白中的至少一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个)来读取捕获的EV。在一些此类实施方案中,可(i)通过使用RT-qPCR检测以下mRNA中的一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个):CRABP2、MIF、CLDN6、PRAME、S100A1、KLK7及其组合;和(ii)通过使用一组检测探针(例如,如本文所用和/或描述的),其中至少一个检测探针针对一个或多个(例如,1个、2个、3个或更多个)实施例5中描述的囊泡内蛋白来读取捕获的EV。在一些实施方案中,一组检测探针包含至少一个针对囊泡内蛋白的检测探针(例如,如本文所述)。在一些实施方案中,一组检测探针包含至少两个检测探针,每个检测探针针对相同的囊泡内蛋白(例如,具有相同或不同表位)。在一些实施方案中,一组检测探针包含至少两个检测探针,每个探针针对不同的囊泡内蛋白(例如,如本文所述)。在一些实施方案中,可以使包含EV囊泡内蛋白和囊泡内mRNA的样品与缀合至单链寡核苷酸(例如,DNA)的抗EV囊泡内蛋白抗体(例如,如实施例5中所述的针对EV囊泡内蛋白的抗体)接触,所述单链寡核苷酸用作一对囊泡内mRNA生物标记物(例如,实施例4中所述)中的两个引物之一,使得抗EV囊泡内蛋白抗体与EV囊泡内蛋白结合,同时缀合的单链寡核苷酸与存在于同一样品中的囊泡内mRNA生物标记物杂交。然后添加所述囊泡内mRNA生物标记物对的第二个引物和RT-qPCR探针以进行RT-qPCR,用于检测单个样品中囊泡内mRNA和囊泡内蛋白的存在。

[0621] 实施例5:作为卵巢癌生物标记物的囊泡内蛋白的评估

[0622] 在一些实施方案中,卵巢癌检测包括在细胞外囊泡的免疫亲和捕获后至少检测一个或多个囊泡内蛋白。

[0623] 在一些实施方案中,存在于细胞外囊泡上的一种或多种表面蛋白或细胞外膜蛋白(“捕获蛋白”)可用于卵巢癌相关细胞外囊泡的免疫亲和捕获。此类捕获蛋白生物标记物的实例可包括但不限于CLDN6、AQP5、CLDN3、CLDN16、LEMD1、LRRTM1、FOLR1、MUC16、CHOLDL、

CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合。

[0624] 在一些实施方案中, EV免疫测定方法(例如, 本文中描述的那些, 诸如实施例1中的方法) 和生物标记物验证过程(例如, 本文中描述的那些, 诸如实施例1中的方法) 可用于评估作为卵巢癌的生物标记物的囊泡内蛋白。在一些实施方案中, 将针对捕获蛋白(例如, 卵巢癌相关EV中存在的表面蛋白) 的抗体与磁珠缀合, 并首先在细胞系EV上然后在患者样品上评估其结合特定靶蛋白的能力。评估涂覆抗体的珠捕获卵巢癌相关EV的能力, 并且被涂覆抗体的珠捕获的EV在使用靶实体检测系统(例如, 如本文所述的双链体系统, 所述系统涉及一组两个检测探针, 每个检测探针针对与捕获蛋白不同的靶标记物) 分析其囊泡内蛋白前被固定和/或透化。

[0625] 在一些实施方案中, 可使用以下囊泡内蛋白中的至少一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 读取固定和/或透化后的捕获的EV: CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合。在一些实施方案中, 可使用一组检测探针(例如, 如本文所用和/或描述的) 读取固定和/或透化后的捕获的EV, 检测探针中的至少两个针对以下囊泡内蛋白中的一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个): CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合。在一些实施方案中, 一组检测探针包含两个检测探针, 每个探针针对相同的囊泡内蛋白。在一些实施方案中, 一组检测探针包含两个检测探针, 每个探针针对不同的囊泡内蛋白。

[0626] 在一些实施方案中, 可使用(i) 以下囊泡内蛋白质中的至少一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个): CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合; 和(ii) 实施例3中所述的EV表面蛋白中的至少一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 来读取固定和/或透化后的捕获的EV。在一些实施方案中, 可使用一组检测探针(例如, 如本文所用和/或描述的) 读取固定和/或透化后的捕获的EV, 所述检测探针包括(i) 针对以下囊泡内蛋白中的一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) 的第一检测探针: CRABP2、KLK7、MIF、PRAME和S100A1及其组合; 和(ii) 针对实施例3中描述的一个或多个(例如, 1个、2个、3个或更多个) EV表面蛋白的第二检测探针。在一些实施方案中, 可通过在单个样品中一起检测EV囊泡内蛋白和EV囊泡内mRNA来读取固定和/或透化后的捕获的EV, 如上文实施例4中所述。

#### [0627] 实施例6: 卵巢癌液体活检测定的开发

[0628] 本实施例描述了例如用于筛查遗传风险和平均风险妇女的卵巢癌液体活检测定的开发。尽管是所有癌症中妇女的第五大杀手(Howlader等人, 2019; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文), 但目前没有针对平均风险妇女的推荐的卵巢癌筛查工具。这部分地是因为提出的卵巢癌筛查技术的性能不佳。鉴于有平均风险的妇女的卵巢癌发病率, 测试特异性不足(<99.5%) 导致假阳性结果数量超过真阳性多于一个数量级。这给医疗保健系统和接受筛查的妇女带来了沉重负担, 因为假阳性结果会导致额外的测试、不必要的手术和情绪/身体困扰(Buys等人, 2011; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。因此, 可能需要开发卵巢癌筛查测试, 所述测试可表现出两个特征以提供临床效用: (1) 超高特异性(>99.5%), 以最小化假阳性数量, 以及(2) 当预后最有利时, 对阶段I和阶段II卵巢癌具有高灵敏度(>40%)。此种测试的开发有可能每年挽救数万人的生命。

[0629] 已经针对卵巢癌液体活检测定研究了几种不同的生物标记物类别, 包括循环肿瘤

DNA (ctDNA)、循环肿瘤细胞 (CTC)、批量蛋白质和细胞外囊泡 (EV)。相对于ctDNA和CTC, EV由于其在血流中的丰度和稳定性而特别有希望, 这表明EV对早期癌症的灵敏度有所提高。此外, EV含有源自同一细胞的货物 (例如蛋白质、RNA、代谢物), 从而提供优于批量蛋白质测量的特异性。虽然已经研究了EV的诊断效用, 但大部分工作都与批量EV测量或低通量单EV分析有关。

[0630] 本实施例描述了通过对人血浆中的单个细胞外囊泡 (EV) 进行分析来进行早期卵巢癌检测的示例性方法的一个方面。EV (包括外泌体和微囊泡) 含有共定位的蛋白质、RNA、代谢物和代表其起源细胞的其他化合物 (Kosaka等人, 2019; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。检测单个EV内的战略性选择的共定位标记物可使得能够鉴定具有超高特异性的细胞类型, 包括区分癌细胞与正常组织的能力。与依赖细胞死亡以使生物标记物进入血液 (即cfDNA) 的其他癌症诊断方法相反, EV由功能细胞以高速率释放。已显示单细胞在体外每天释放多达10,000个EV (Balaj等人, 2011; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。另外, 人们普遍认为癌细胞比健康细胞释放EV的速率更高 (Bebelman等人, 2018; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

[0631] 一方面, 本公开提供了涉及使用申请人的专有生物信息学生物标记物发现过程鉴定在卵巢癌与健康组织中上调的基因的见解和技术。从上调的生物标记物列表中, 设计了预计对卵巢癌表现出高灵敏度和特异性的生物标记物组合。使用示例性单个EV测定 (参见例如, 图1或2中所示和/或本文所述), 检测到此类生物标记物在单个囊泡上的共定位, 表明生物标记物的分组来源于相同的细胞。鉴于许多上调的癌症生物标记物 (诸如MUC16) 由一种或多种健康组织表达, 这为批量生物标记物测量 (包括批量EV测定) 提供了优越的特异性。通过精心设计生物标记物组合, 可减少或消除来自竞争组织的信号, 包括与卵巢癌密切相关的信号。在一些实施方案中, 本公开提供了具有超高特异性的技术, 其作为卵巢癌筛查测试特别有用, 例如对于疾病患病率低且需要高阳性预测值 (>10%) 的卵巢癌 (Seltzer等人, 1995; 其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。

#### [0632] 生物标记物发现

[0633] 在一些实施方案中, 生物标记物发现过程利用对大型数据库的生物信息学分析以及对卵巢癌和细胞外囊泡的生物学的理解。

#### [0634] 单个细胞外囊泡分析

[0635] 检测血液中肿瘤来源的EV需要具有足够选择性和灵敏度的测定, 以在来自各种各样的健康组织的100亿个EV的背景下检测每毫升血浆中相对较少的肿瘤来源的EV。本公开尤其提供了解决此挑战的技术。例如, 在一些实施方案中, 用于单个细胞外囊泡分析的测定在图1中说明, 其在如下概述的三个关键步骤中进行:

[0636] 1. 使用尺寸排阻色谱 (SEC) 从患者血浆中纯化EV, 所述尺寸排阻色谱去除超过99%的可溶性蛋白质和其他干扰化合物。

[0637] 2. 使用对膜结合蛋白具有特异性的抗体功能化磁珠捕获肿瘤特异性EV。

[0638] 3. 进行邻近连接免疫定量聚合酶链反应 (pliq-PCR) 的改良版本, 以确定包含在捕获的EV上或其中的另外的蛋白生物标记物的共定位。

[0639] 在pliq-PCR测定的改良版本的许多实施方案中, 将两种或多种不同的抗体-寡核苷酸缀合物添加到由抗体功能化磁珠捕获的EV, 并且抗体随后与其蛋白质靶标结合。寡核

核苷酸由具有互补的单链悬突的dsDNA组成,并因此在紧密接近时(即,当相应的蛋白质靶标位于同一EV上时)能够杂交。在洗去未结合的抗体-寡核苷酸物种后,使用标准DNA连接酶反应连接相邻结合的抗体-寡核苷酸物种。连接模板链的后续qPCR使得能够对共定位的蛋白质物种进行检测和相对定量。在一些实施方案中,可以将二至二十个不同的抗体-寡核苷酸探针并入此种测定中,例如,如均于2020年2月28日提交,标题为“Systems, Compositions, and Methods for Target Entity Detection”的美国申请号16/805,637和国际申请PCT/US2020/020529中所述;其出于任何目的都以引用的方式并入本文。

[0640] 与其他技术相比,pliq-PCR在分析EV方面具有许多优点。例如,pliq-PCR具有比其他标准免疫测定(诸如ELISA)高三个数量级的灵敏度(Darmanis等人,2010;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。良好优化的pliq-PCR反应的超低LOD使得能够检测痕量水平的肿瘤来源的EV,低至一千个EV/mL。这与其他新兴EV分析技术相比是有利的,所述技术包括纳米胞质外泌体(nPLEX)传感器(Im等人,2014;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)和集成磁电化学外泌体(iMEX)传感器(Jeong等人,2016;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文),它们的报告LOD分别为约 $10^3$ 和约 $10^4$ EV(Shao等人,2018;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。此外,在一些实施方案中,pliq-PCR方法的改良版本不需要复杂的设备,并且可独特地检测多个生物标记物在单个EV上的共定位。

[0641] 在一些实施方案中,为了进一步提高单个EV谱测定的灵敏度和特异性,包括mRNA和囊泡内蛋白质(除了EV表面蛋白质之外)的其他类别的EV生物标记物可被鉴定并包括在测定中。

#### [0642] 初步工作

[0643] 通过初步研究,开发了工作流程,其中验证生物标记物候选物存在于EV中,并且能够被可商购获得的抗体或mRNA引物探针组检测到。对于给定的关注的生物标记物,培养表达(阳性对照)和不表达关注的生物标记物(阴性对照)的一个或多个细胞系可通过浓缩其细胞培养基并进行纯化以分离具有关注的大小范围的纳米颗粒(例如,使用SEC)来培养以收获其EV。通常,细胞外囊泡的直径可在30nm至几微米的范围内。参见例如,Chuo等人,“Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods”*Journal of Biomedical Sciences* 25:91 (2018) (其出于本文所述目的以引用的方式并入本文),其提供不同细胞外囊泡(EV)亚型的大小信息:迁移小体( $0.5\mu\text{m}$ 至 $3\mu\text{m}$ )、微囊泡( $0.1\mu\text{m}$ 至 $1\mu\text{m}$ )、原癌小体( $1\mu\text{m}$ 至 $10\mu\text{m}$ )、外泌颗粒(exomere)(<50nm)、小外泌体(60nm至80nm)和大外泌体(90nm至120nm)。在一些实施方案中,可分离大小范围为约30nm至1000nm的纳米颗粒以用于检测测定。在一些实施方案中,可分离一个或多个特定EV亚型以用于检测测定。

[0644] 通过专有的生物标记物发现过程,鉴定了在HGSOC与健康组织中上调的膜结合蛋白生物标记物(MUC16和SLC34A2),并将其用于细胞系EV和卵巢癌患者样品的概念验证实验。MUC16是一种膜蛋白,是卵巢癌中研究最广泛的生物标记物。如本文所述,血清中CA-125(其为MUC16多肽的一部分)的浓度已在处于卵巢癌遗传风险和卵巢癌复发风险的妇女中得到常规监测。CA-125历史上在血清中以裂解形式进行测量。然而,在本公开的一些实施方案中,MUC16作为完整的跨膜蛋白进行测量。在本公开的一些实施方案中,MUC16以其裂解形式进行测量。虽然不受理论的束缚,但SLC34A2是一种多通道膜转运蛋白,以往研究作为卵巢癌和非小细胞肺癌的治疗靶点(Lin等人,2015;其出于本文所述目的以引用的方式并入本

文)。

[0645] 为了检测来自含有共定位MUC16和SLC34A2标记物的EV的测定信号,在一些实施方案中,开发了涉及SLC34A2免疫亲和捕获和两种不同的对MUC16具有特异性的抗体-寡核苷酸探针的测定配置。

[0646] 使用抗SLC34A2功能化磁珠捕获纯化的细胞系EV。例如,图3(图A)提供了两种阳性对照细胞系和一种阴性对照细胞系的代表性qPCR轨迹。数据表明基因表达对测定信号的影响,其中较高表达的细胞系相对于较低表达的细胞系表现出信号增加36倍(252)。这些结果表明,在一些实施方案中,单个EV谱测定(例如,本文所述的那些)能够以非常高的灵敏度检测单个EV上的共定位的膜结合蛋白标记物。

[0647] 在卵巢癌细胞系EV中验证MUC16和SLC34A2后,使用优化的和操作人员盲化的测定方案对卵巢癌患者血浆样品进行试验性研究(最终扩展到320个患者样品)。所有血浆样品均购自同一来源,根据相同的采血方案对其进行处理,并且在开始任何治疗之前(即治疗初期(treatment naive))收集患者样品。本实施例的研究中包括的患者群组在图4(图A)中进行了描述。

[0648] 图7分别提供了所有卵巢癌和高级别浆液性卵巢癌(HGSOC)的这一临床试验性研究结果。在一些实施方案中,通过假设所有健康对照( $n=172$ )周围的对数正态分布,并且对于99.8%的特异性,将截止值设置为高于平均值(截止值1)2.879个标准差,并且对于98%的特异性,将截止值设置为高于平均值(截止值2)2.055个标准差来确定特异性。在一些实施方案中,通过假设所有健康对照( $n=172$ )周围的对数正态分布并将截止值设置为与99.5%特异性(95%置信区间(CI:98.4%至100%))的平均值(截止值1)相差2.576个标准差:来确定特异性。截止值2与98%特异性(95%CI:95.9%至100%)的平均值相差2.055个标准差。HGSOC的I/II期检测对截止值1和2的灵敏度分别为39.1%(95%CI:19.2%至59.0%)和60.9%(95%CI:41.0%至80.8%)。在一些实施方案中,具有99.5%特异性的截止值1可用于推算PPV以筛查绝经后有症状的妇女,其中假定卵巢癌的患病率为每500名妇女中有1人(Goff等,2007;其出于本文所述目的以引用的方式并入本文)。在一些实施方案中,98%特异性截止值可用于推算PPV以筛查处于遗传风险的妇女,其中假定患病率为每100名妇女中有1人。建立这些单独的截止值是为了解释不同患者群体之间假阳性耐受性的差异。所得的HGSOC的PPV远高于10%(对绝经后有症状和有遗传风险的妇女分别为17.6%和27%),这表明在一些实施方案中,单一EV谱测定(例如,如本文所述)具有被用作卵巢癌筛查测试的巨大潜力。通过评估另外的、互补的生物标记物组合,可增加此种检测的灵敏度以在平均风险妇女中获得至少10%的I/II期PPV。在一些实施方案中,可增加此种测定的灵敏度,以在处于卵巢癌遗传风险的妇女受试者或可能正在经历一种或多种卵巢癌相关症状(例如腹痛和/或骨盆疼痛)的绝经后妇女受试者中获得甚至更高的I/II期PPV。

[0649] 为了进一步提高用于检测卵巢癌的示例性单一EV谱测定(例如,本文所述的那些)的性能,在一些实施方案中,可鉴定包括膜结合蛋白和囊泡内mRNA/蛋白的其他生物标记物候选物。

[0650] 在一些实施方案中,证明了使用批量纯化的细胞系EV进行EV-mRNA检测的可行性,如图14(图A)所示,用于检测巨噬细胞抑制因子(MIF)转录物。通过对膜结合蛋白标记物的免疫亲和捕获,此种方法使得能够检测两个共定位的生物标记物。此外,EV-mRNA检测需要

更简单的方案,因为RT-qPCR可在免疫亲和捕获后直接进行。图14(图B)展示了使用EV的mRNA检测,其中首先使用抗上皮细胞黏附分子(EpCAM)修饰的磁珠捕获EV,并检测到MIF mRNA。阳性和阴性细胞系都表达MIF,然而,只有阳性细胞系表达EpCAM。证明使用此种检测系统,即使在高出一个数量级的浓度的阴性细胞系EV中,也能对阳性细胞系进行选择性的检测。

[0651] 实施例7:示例性卵巢癌液体活检测定的开发

[0652] 本实施例描述了示例性卵巢癌液体活检测定的开发,例如,用于筛查具有或不具有症状的有平均风险、遗传风险、生活史风险和/或绝经后风险的妇女。如本公开的实施例6中所述进行导致生物标记物发现的步骤。

[0653] 如实施例6和图7中所讨论的,当使用99.5%特异性截止值来检测具有单一生物标记物组合SLC34A2免疫亲和捕获和MUC16+MUC16 p1iq-PCR读出的I期和II期卵巢癌患者时,示例性卵巢癌液体活检测定(例如,如本文所述)的灵敏度可被提高。这可能部分归因于健康妇女的测定信号范围很大,可能是由于共表达SLC34A2和MUC16的健康组织。

[0654] 为了提高灵敏度和特异性,生物标记物图被扩展为包括生物信息学预测在卵巢癌中过度表达的其他靶标(参见图18图A至D以获取产生的数据的子集)。在一些实施方案中,设计了包含多肽生物标记物FOLR1、CLDN3、CLDN6、AQP5和LRRTM1的列表。AQP5(水孔蛋白5)是一种水通道蛋白,是参与产生唾液、眼泪和肺分泌物的整合膜蛋白水孔蛋白家族的成员。CLDN3和CLDN6(分别为密蛋白3和密蛋白6)是整合膜蛋白和紧密连接链的组分,这两种蛋白都是密蛋白家族的成员,它们通过上皮细胞和/或内皮细胞中的细胞-细胞粘附形成连续密封,从而防止溶质和水通过细胞旁间隙扩散。FOLR1(叶酸受体1)是叶酸受体家族的成员,并且其是一种跨膜蛋白,参与细胞外叶酸和还原型叶酸衍生物的结合和随后的细胞内递送。LRRTM1(富含亮氨酸重复跨膜神经元1)是跨膜蛋白,一般与神经元功能相关,例如可能与精神分裂症和惯用手有关,LRRTM1被认为参与了突触处的蛋白-蛋白相互作用和某些化学物质在突触间的传递。

[0655] 使用针对细胞系EV的市售单克隆抗体对这些生物标记物中的每一个进行严格筛查,以鉴定在示例性测定中表现出高亲和力和选择性的抗体克隆(数据未显示)。为每个生物标记物鉴定了至少一个合适的抗体克隆。

[0656] 为了便于鉴定具有高诊断效用的新型生物标记物组合,开发了用于在混合的患者血浆样品中筛查组合的程序。混合来自90名55至79岁的健康妇女的血浆,以估计每种生物标记物组合的平均健康背景蛋白质丰度水平。同时,从10名III期和10名IV期卵巢癌患者创建了一个卵巢癌血浆池,以估计在晚期卵巢癌病例中发现的信号。从包括AQP5、MUC16、CLDN3、CLDN6、FOLR1、LRRTM1和SLC34A2七种潜在生物标记物的列表中产生三种生物标记物(一个捕获探针和两个p1iq-PCR读出探针)的组合。在混合的患者血浆和/或对照血浆样品中筛查组合。在每个筛查实验中,纯化1mL混合的患者血浆,例如,使用尺寸排阻色谱法,并分成10个等分试样(相当于每种生物标记物组合100μL血浆)。图20A中提供了初步生物标记物筛查数据的子集,其中每个数据点代表不同的生物标记物组合。图20A中的生物标记物组合在总体上表现出非常低的信号强度的血浆池中的测定信号未示出大的差异,这表明几乎没有EV包含这些共定位的生物标记物。图20B提供了七种不同的示例性生物标记物组合的混合健康血浆和混合卵巢癌血浆之间的测定信号差异。结果表明,与混合的卵巢癌血浆相

比时,如本文所述的生物标记物组合可检测100 $\mu$ L混合健康血浆之间100至1000倍的信号差异。

[0657] 生物标记物组合筛查的改进可通过测试来自其他患者群组的混合血浆来实现,所述患者群组包括绝经前健康妇女、患有良性妇科肿瘤的妇女、患有其他炎性病状的妇女和/或早期HGSOC病例。

[0658] 图20A和20B中的数据表明如本文所述的若干示例性生物标记物组合(例如,MUC16捕获探针和MUC16+MUC16pliq-PCR探针、SLC34A2捕获探针和MUC16+FOLR1 pliq-PCR探针、SLC34A2捕获探针和FOLR1+FOLR1 pliq-PCR探针、SLC34A2捕获探针和MUC16+MUC16 pliq-PCR探针、MUC16捕获探针和MUC16+CLDN6 pliq-PCR探针、FOLR1捕获探针和FOLR1+CLDN6 pliq-PCR探针等)可区分健康患者和患有卵巢癌的患者。为了证明使用多个正交和互补的生物标记物组合将提高本文描述的示例性测定的性能(例如,通过区分不同的癌症患者亚群与健康群组),针对先前在实施例6和图7中研究的和/或描述的患者样品子集测试几种生物标记物组合。特别地选择健康群组和HGSOC群组以覆盖图7中观察到的整个信号范围。

[0659] 图21中提供了示出本文描述的示例性测定的性能的结果,所述测定包括至少两种生物标记物组合,在一些实施方案中,所述生物标记物组合可包含1) SLC34A2捕获、MUC16+MUC16pliq-PCR读出(在即时的图7研究(例如实施例6)中使用的相同组合);和2) SLC34A2捕获、FOLR1+FOLR1 pliq-PCR读出。数据证明如本文所述的示例性测定(例如,涉及至少两种生物标记物组合,例如,至少两种正交生物标记物组合(例如,至少两种统计学上独立的生物标记物组合))能够区分HGSOC患者与健康良性患者群组。与在涉及单一生物标记物组合的测定中观察到的相比,此种跨生物标记物组合的正交性提高了灵敏度。例如,在如本文所述的两种或更多种生物标记物组合(例如,如本文所述的正交生物标记物组合)在测定中使用的一些实施方案中,在特异性截止值为99.5%时,I期和II期卵巢癌病例(n=22)的总体测定灵敏度增加至59.1%,并且所有卵巢癌病例(n=36)的总体测定灵敏度增加至63.9%。这些结果证明,将多种(例如,至少两种或更多种)生物标记物组合并入本文所述的示例性测定中可显著提高测定的性能(例如,灵敏度和/或特异性)。例如,在一些实施方案中,涉及至少两种生物标记物组合(例如,(1) SLC34A2捕获、MUC16+MUC16pliq-PCR读出;和(2) SLC34A2捕获、FOLR1+FOLR1 pliq-PCR读出)的示例性测定的灵敏度在98%特异性截止值时为66.7%。虽然在此实施例中使用两种生物标记物组合(其中每种组合具有共同的生物标记物SLC34A2)的灵敏度的总体增加约为8.3%,但不共享共同生物标记物的生物标记物组合的某些实施方案可提供更大的灵敏度增加。

[0660] 为了进一步提高用于检测卵巢癌的示例性单一EV谱测定(例如,本文所述的那些)的性能,在一些实施方案中,可将其他靶生物标记物(包括例如,如本文所述的膜结合蛋白和囊泡内mRNA/蛋白)并入示例性单一EV谱测定。

[0661] 在一些实施方案中,生物标记物图被扩展为包括生物信息学预测在卵巢癌中过度表达的其他靶标。考虑了包括CLDN6、AQP5、CLDN3、CLDN16、LEMD1、LRRTM1、FOLR1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2和TNFRSF12A在内的多肽生物标记物。通过如实施例1中所述的测定筛查的某些生物标记物组合描述于表1。在这些初步筛查后,选择某些组合用于进一步分析;示例性结果如下所述。

[0662] 表3中示出的生物标记物组合的二级筛查结果比较健康混合样品(池由90个单独样品组成)或良性混合(池由10个单独样品组成,所述样品来自患有浆液性囊腺瘤、粘液性囊腺瘤、子宫内膜样囊肿、浆液性乳头状囊腺瘤、浆液性囊腺纤维瘤或成熟畸胎瘤的患者)样品与晚期卵巢癌样品(池由20个单独样品组成,所述样品来自患有III期或IV期卵巢腺癌的患者)或早期卵巢癌样品(池由16个单独样品组成,所述样品来自患有I期或II期卵巢腺癌的患者),证明了某些生物标记物组合成功区分卵巢癌样品与参考样品(当用描述的生物标记物组合以如实施例1中所述进行的扩增的至少4倍差异测量时)。

[0663] 如下所示,各种生物标记物组合区分晚期卵巢癌池与良性妇科肿瘤池。此发现尤其证明了根据本公开使用的这些生物标记物组合特异性区分卵巢恶性肿瘤与良性肿瘤,从而证明了所公开技术的一个特别有利的特征。在某些情况下,这一特征尤为重要,因为良性肿瘤会产生与恶性肿瘤类似的症状,并且通常难以通过常规筛查方法进行分类。

[0664] 如下所示,各种生物标记物组合区分晚期卵巢癌池与健康池和/或良性妇科肿瘤池。这些发现尤其证明了根据本公开使用的这些生物标记物组合在早期卵巢癌(例如,I/II期)中特异性区分卵巢恶性肿瘤与健康组织和/或良性肿瘤,从而证明了所公开技术的一个特别有利的特征。在某些情况下,这一特征尤为重要,因为正确区分卵巢癌样品和良性妇科肿瘤,同时仍能在早期检测和诊断卵巢癌对于成功抗击疾病同时保持患者健康至关重要。

[0665] 本实施例中呈现的结果尤其证明了所提供的技术检测卵巢囊腺瘤,并且特别证明了所提供的技术(例如,使用如本文所述的生物标记物组合来检测EV中和/或EV上的生物标记物)区分卵巢癌来源的EV与来源于健康组织和/或良性妇科肿瘤的EV。

[0666] 本实施例证明了所提供的检测共定位的生物标记物特征(例如,检测单个EV中或单个EV上的生物标记物组)的技术(例如,如本文所述的邻近连接技术)检测晚期卵巢癌、检测早期卵巢癌(包括具有至少四倍于来自90名健康妇女的血浆池的信号)和/或区分卵巢癌血浆与良性肿瘤血浆的有效性。本实施例特别证明了此类提供的技术检测共定位表面生物标记物特征(例如,在单个EV的表面上)的有效性。

[0667] 表4提供了某些生物标记物组合的二级筛查结果,而表5提供了包含至少三个EV表面多肽生物标记物的某些生物标记物特征的三级筛查结果,生物标记物的组合是根据表4中呈现的发现设计的。示出的结果比较健康混合样品(池由90个单独样品组成)、非卵巢癌混合样品(池由26个单独样品组成,所述样品来自癌症(诸如乳腺癌、结肠癌、肺癌、胰腺癌、子宫癌或弥漫性大B细胞淋巴瘤)患者)和/或良性妇科混合样品(池由14个单独样品组成,所述样品来自患有浆液性囊腺瘤、粘液性囊腺瘤、浆液性囊腺纤维瘤、子宫内膜样囊肿、子宫内膜样囊腺瘤、成熟畸胎瘤、子宫内膜异位症或平滑肌瘤的患者)与通过血清CA-125水平(例如,高CA-125(>35U/mL,池由12个单独样品组成),或低CA-125(<35U/mL,池由11个单独样品组成))描绘的晚期卵巢癌样品(池由12个单独样品组成)、早期卵巢癌样品。对每种生物标记物组合进行合适的阳性和阴性对照以验证适当起效的测定(例如,不包含细胞外囊泡或包含来自卵巢癌细胞系的细胞外囊泡的样品)。结果证明,某些生物标记物组合成功地区分卵巢癌样品与所指出的参考样品(当用描述的生物标记物组合以如实施例1中所述进行的扩增的至少2倍差异测量时)。

[0668] 如下所示,这些发现尤其证明了根据本公开使用的这些生物标记物组合中的某些特异性区分卵巢恶性肿瘤与健康组织、良性妇科肿瘤和/或其他癌症类型,从而证明了所公

开技术的一个特别有利的特征。此外,如下所示的结果证明了各种生物标记物组合区分早期高CA-125卵巢癌样品池和/或早期低CA-125卵巢癌样品池与健康样品池、非卵巢癌样品池和/或良性妇科肿瘤样品池。在某些情况下,这一特征尤为重要,因为当前的护理标准非侵入性检测方法依赖于血清CA-125水平的测量(如上文详细描述中所述)。因此,本实施例描述了根据本公开使用的生物标记物特征,其可为早期低CA-125卵巢癌诊断提供比当前护理标准更有效的诊断系统。此外,本实施例的发现描述了区分卵巢癌样品和良性妇科肿瘤和/或其他癌症类型的测定。在某些情况下,这一特征尤为重要,因为良性肿瘤和/或其他癌症类型会产生与恶性卵巢癌类似的症状和/或分子特征,并且在使用常规筛查方法时通常难以区分这些病状。

[0669] 本实施例中呈现的结果尤其证明了所提供的技术检测卵巢囊腺癌,并特别证明了所提供的技术(例如,使用如本文所述的生物标记物组合来检测EV中和/或EV上的生物标记物)区分卵巢癌来源的EV与来源于健康组织、良性妇科肿瘤和/或来源于某些其他癌症类型的EV。

[0670] 本实施例证明了所提供的检测共定位的生物标记物特征(例如,检测单个EV中或EV上的生物标记物组)的技术(例如,如本文所述的邻近连接技术)检测晚期卵巢癌(包括具有至少两倍于来自90名健康妇女的血浆池的信号)和/或区分卵巢癌血浆与良性妇科肿瘤血浆和/或区分卵巢癌血浆与来自某些其他癌症类型的血浆的有效性。本实施例特别证明了此类提供的技术检测共定位表面生物标记物特征(例如,在单个EV的表面上)的有效性。

[0671] 本公开进一步定义了如本文所述的测定中特别有用和/或有效的特定生物标记物及其组。在一些实施方案中,特定的示例生物标记物和/或组如示例的是有用的。在一些实施方案中,可将多个特定示例性生物标记物和/或组应用于相同样品(例如,应用于相同样品的不同等分试样)和/或来自相同个体和/或来源的类似样品。在一些实施方案中,评估多个单独的生物标记物或其组(例如,生物标记物特征),并且为每个确定结果评分(例如,反映特定的结合水平和/或特定的灵敏度和/或特异性水平)。在一些实施方案中,当多个此类评估达到指示相同状态(例如,是否癌变、癌症阶段等)的分数时,诊断确定性得到提高。替代地或另外,在一些实施方案中,当确定和/或考虑此类评分与一种或多种其他诊断评估或策略(例如TVUS和/或血清CA-125水平等)相结合时,诊断确定性得到提高。

[0672] 表3描述了与健康或良性样品相比时区分卵巢癌混合样品的某些生物标记物组合。检测/区分用\*表示,并且对应于癌症样品与所述参考样品相比4倍的扩增差异。缩写:晚期卵巢癌(LS)、早期卵巢癌(ES)、捕获探针靶标(Capture)、检测探针靶标(Det)、组合(Combo)。

[0673]

| 组合 | 捕获      | Det 1   | Det 2 | 与健康池相比 |    | 与良性池相比 |    |
|----|---------|---------|-------|--------|----|--------|----|
|    |         |         |       | LS     | ES | LS     | ES |
| 1  | SLC34A2 | SLC34A2 | FOLR1 | *      |    | *      |    |
| 2  | SLC34A2 | MUC16   | MUC16 | *      |    | *      |    |
| 3  | SLC34A2 | MUC16   | FOLR1 | *      | *  | *      |    |
| 4  | SLC34A2 | FOLR1   | FOLR1 | *      | *  | *      |    |
| 5  | MUC16   | SLC34A2 | MUC16 | *      | *  | *      |    |
| 6  | MUC16   | SLC34A2 | FOLR1 | *      | *  |        |    |
| 7  | MUC16   | MUC16   | MUC16 | *      | *  | *      |    |
| 8  | MUC16   | MUC16   | FOLR1 | *      | *  | *      | *  |
| 9  | MUC16   | MUC16   | CLDN3 | *      | *  | *      | *  |
| 10 | MUC16   | MUC16   | CLDN6 | *      |    | *      |    |
| 11 | MUC16   | MUC16   | AQP5  | *      |    | *      |    |
| 12 | MUC16   | FOLR1   | FOLR1 | *      |    | *      |    |
| 13 | MUC16   | FOLR1   | CLDN3 | *      | *  | *      | *  |
| 14 | MUC16   | FOLR1   | AQP5  | *      |    | *      |    |
| 15 | FOLR1   | MUC16   | MUC16 | *      |    | *      |    |
| 16 | FOLR1   | MUC16   | FOLR1 | *      |    | *      |    |
| 17 | FOLR1   | MUC16   | CLDN3 | *      |    | *      |    |
| 18 | FOLR1   | FOLR1   | CLDN6 |        |    | *      |    |
| 19 | FOLR1   | SLC34A2 | MUC16 | *      |    | *      |    |
| 20 | FOLR1   | FOLR1   | FOLR1 | *      |    | *      |    |
| 21 | FOLR1   | FOLR1   | CLDN3 | *      |    | *      |    |

[0674]

| 组合 | 捕获     | Det 1   | Det 2 | 与健康池相比 |    | 与良性池相比 |    |
|----|--------|---------|-------|--------|----|--------|----|
|    |        |         |       | LS     | ES | LS     | ES |
| 22 | FOLR1  | FOLR1   | AQP5  | *      |    | *      |    |
| 23 | CLDN3  | FOLR1   | FOLR1 | *      | *  | *      |    |
| 24 | CLDN3  | SLC34A2 | MUC16 | *      |    | *      |    |
| 25 | CLDN3  | MUC16   | MUC16 | *      |    | *      |    |
| 26 | CLDN3  | MUC16   | FOLR1 | *      |    | *      |    |
| 27 | CLDN3  | MUC16   | CLDN3 | *      |    | *      |    |
| 28 | CLDN3  | MUC16   | CLDN6 | *      |    | *      |    |
| 29 | LRRTM1 | MUC16   | MUC16 | *      | *  |        | *  |

[0675] 表4描绘了在初级筛查中示出的区分晚期卵巢癌混合样品与健康混合样品的某些示例性两种生物标记物组合。然后使用注意到的组合来比较早期卵巢癌样品(按CA-125水平区分)与健康样品池、非卵巢癌样品池或良性妇科肿瘤样品池。检测/区分用\*表示,并且对应于癌症样品与所述参考样品相比2倍的扩增差异;请注意,在表4中,用于免疫亲和捕获的生物标记物和用于测定读出的生物标记物之间没有区别。缩写:晚期卵巢癌(LS)、早期高CA-125卵巢癌(ES High)、早期低CA-125卵巢癌(ES Low)、捕获和/或检测探针靶标(Target)、组合(Combo)。

[0676]

| 组合 | 靶标 1  | 靶标 2   | 与健康池相比 |      |      | 与良性肿瘤池相比 |      | 与非卵巢癌池相比 |      |
|----|-------|--------|--------|------|------|----------|------|----------|------|
|    |       |        | LS     | ES 高 | ES 低 | ES 高     | ES 低 | ES 高     | ES 低 |
| 1  | ALPL  | FOLR1  | *      | *    |      | *        |      | *        |      |
| 2  | BST2  | MUC16  | *      | *    |      | *        |      | *        |      |
| 3  | FOLR1 | MSLN   | *      | *    |      | *        |      | *        |      |
| 4  | FOLR1 | MUC16  | *      | *    |      |          |      | *        | *    |
| 5  | MSLN  | MUC16  | *      | *    |      | *        |      |          |      |
| 6  | MSLN  | MUC1   | *      | *    |      | *        |      | *        | *    |
| 7  | MSLN  | SLC2A1 | *      |      |      |          |      |          |      |

[0677]

| 组合 | 靶标 1    | 靶标 2  | 与健康池相比 |      |      | 与良性肿瘤池相比 |      | 与非卵巢癌池相比 |      |
|----|---------|-------|--------|------|------|----------|------|----------|------|
|    |         |       | LS     | ES 高 | ES 低 | ES 高     | ES 低 | ES 高     | ES 低 |
| 8  | MUC1    | sTn   | *      | *    | *    | *        | *    | *        | *    |
| 9  | MUC1    | MUC16 | *      | *    |      | *        | *    | *        |      |
| 10 | MUC1    | FOLR1 | *      | *    |      | *        |      | *        |      |
| 11 | MUC16   | sTn   | *      | *    |      | *        |      | *        |      |
| 12 | PTGS1   | MUC16 | *      | *    |      |          |      |          |      |
| 13 | SLC34A2 | FOLR1 | *      | *    |      |          |      | *        |      |
| 14 | SLC34A2 | MUC16 | *      |      |      |          |      | *        |      |
| 15 | sTn     | FOLR1 | *      | *    |      | *        |      | *        | *    |
| 16 | sTn     | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    | *        | *    |
| 17 | TACSTD2 | MUC16 | *      | *    | *    | *        | *    | *        | *    |
| 18 | TACSTD2 | sTn   | *      | *    |      | *        |      | *        |      |

[0678] 表5描述了某些示例性的三个靶生物标记物组合。将晚期卵巢癌和/或早期卵巢癌

样品(按CA-125水平区分)与健康样品池、非卵巢癌样品池或良性妇科肿瘤样品池进行比较。检测/区分用\*表示,并且对应于癌症样品与所述参考样品相比2倍的扩增差异。缩写:晚期卵巢癌(ES)、早期高CA-125卵巢癌(ES High)、早期低CA-125卵巢癌(ES Low)、捕获探针靶标(Capture)、检测探针靶标(Det)、组合(Combo)。

[0679]

| 组合 | 捕获      | Det 1 | Det 2 | 与健康池相比 |      |      | 与良性肿瘤池相比 |      |      | 与非卵巢癌池相比 |      |      |
|----|---------|-------|-------|--------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|    |         |       |       | LS     | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 |
| 1  | TACSTD2 | MUC16 | sTn   | *      | *    | *    |          | *    |      | *        | *    | *    |
| 2  | TACSTD2 | MUC16 | MUC1  | *      | *    | *    |          |      | *    |          |      | *    |
| 3  | TACSTD2 | MUC16 | MSLN  |        |      |      |          |      |      |          |      | *    |
| 4  | TACSTD2 | MUC16 | FOLR1 | *      |      | *    |          |      |      | *        |      | *    |
| 5  | TACSTD2 | sTn   | MUC1  | *      | *    | *    | *        |      |      | *        | *    | *    |
| 6  | TACSTD2 | sTn   | MSLN  |        |      | *    |          |      |      |          |      | *    |

[0680]

| 组合 | 捕获      | Det 1 | Det 2 | 与健康池相比 |      |      | 与良性肿瘤池相比 |      |      | 与非卵巢癌池相比 |      |      |
|----|---------|-------|-------|--------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|    |         |       |       | LS     | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 |
| 7  | TACSTD2 | sTn   | FOLR1 |        |      |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 8  | TACSTD2 | MUC1  | MSLN  |        |      |      |          |      |      |          |      | *    |
| 9  | TACSTD2 | MUC1  | FOLR1 |        |      |      |          |      |      |          |      |      |
| 10 | TACSTD2 | MSLN  | FOLR1 |        |      |      |          |      |      |          |      |      |
| 11 | MUC1    | MUC16 | sTn   | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    |      |
| 12 | MUC1    | MUC16 | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 13 | MUC1    | MUC16 | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 14 | MUC1    | sTn   | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 15 | MUC1    | sTn   | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    |      |
| 16 | MUC1    | MSLN  | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 17 | MUC16   | sTn   | MUC1  | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    |      |
| 18 | MUC16   | sTn   | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    |      |
| 19 | MUC16   | sTn   | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 20 | MUC16   | MUC1  | MSLN  |        |      |      |          |      |      | *        | *    | *    |
| 21 | MUC16   | MUC1  | FOLR1 |        |      |      |          |      |      |          |      |      |
| 22 | MUC16   | MSLN  | FOLR1 |        |      |      |          |      |      | *        | *    | *    |
| 23 | sTn     | MUC16 | MUC1  | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 24 | sTn     | MUC16 | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 25 | sTn     | MUC16 | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 26 | sTn     | MUC1  | MSLN  | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    | *    |
| 27 | sTn     | MUC1  | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    | *    | *        | *    | *    |
| 28 | sTn     | MSLN  | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 29 | MSLN    | MUC16 | sTn   | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 30 | MSLN    | MUC16 | MUC1  | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    | *    |
| 31 | MSLN    | MUC16 | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 32 | MSLN    | sTn   | MUC1  | *      | *    | *    | *        | *    | *    | *        | *    |      |

[0681]

| 组合 | 捕获      | Det 1 | Det 2 | 与健康池相比 |      |      | 与良性肿瘤池相比 |      |      | 与非卵巢癌池相比 |      |      |
|----|---------|-------|-------|--------|------|------|----------|------|------|----------|------|------|
|    |         |       |       | LS     | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 | LS       | ES 高 | ES 低 |
| 33 | MSLN    | sTn   | FOLR1 | *      | *    |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 34 | MSLN    | MUC1  | FOLR1 | *      | *    | *    | *        |      | *    | *        | *    | *    |
| 35 | SLC34A2 | MUC16 | FOLR1 | *      | *    |      |          |      |      | *        | *    |      |
| 36 | SLC34A2 | MUC16 | MSLN  | *      |      |      | *        |      |      | *        |      |      |
| 37 | SLC34A2 | MUC16 | sTn   | *      |      |      | *        | *    |      | *        | *    |      |
| 38 | SLC34A2 | FOLR1 | sTn   | *      |      |      | *        | *    |      | *        | *    |      |

[0682] 实施例8:示例性卵巢癌液体活检测定的进一步表征

[0683] 此实施例针对使用不同细胞群体和患者群体的示例性卵巢癌液体活检测定中的各种生物标记物组合的进一步表征。用于检测卵巢癌的有用的生物标记物组合可通过筛查在混合的对照和患者血浆样品中的本文公开的生物标记物的各种组合(例如,表面蛋白靶生物标记物,例如像SLC34A2、MUC16、FOLR1、CLDN3、CLDN6、AQP5、LRRTM1、CLDN16、LEMD1、MUC16、CHODL、CDH6、HTR3A、SLC34A2、EpCAM、ALPL、BST2、CD24、MSLN、MUC1、PTGS1、ST14、sTn、TACSTD2、BCAM、CD74、LY6E、SLC2A1、CXCR4、DDR1、EFNB1、NOTCH3、PLXNB1、SPINT2、TNFRSF12A及其组合)来确定。混合的样品可提供对各患者群组之间平均测定信号的估计,从而促进生物标记物组合分类。

[0684] 在一些实施方案中,用于检测卵巢癌的生物标记物组合可包含一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个生物标记物(例如,本文所述的那些),其中此类组合包含至少一个用于捕获细胞外囊泡(例如,通过免疫亲和捕获)的生物标记物和至少一个用于通过

pliq-PCR测定进行检测的生物标记物(包括,例如,一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或更多个生物标记物)。在一些实施方案中,用于捕获细胞外囊泡(例如,免疫亲和捕获)的靶生物标记物可与用于基于pliq-PCR的分析的至少一种靶生物标记物相同。在一些实施方案中,用于捕获细胞外囊泡和基于pliq-PCR的分析的靶生物标记物可各不相同。图20B、图22至28和图33至36中示出了各种示例性生物标记物组合的实例。图37A至J中示出了各种示例性生物标记物组合的诊断能力的实例。

[0685] 可在混合的患者群组中验证各种生物标记物组合。患者群组可包括适当的患者和/或对照群体。在某些实施方案中,患者群组可包括绝经后健康妇女(例如,年龄在55岁至79岁之间的健康妇女)、绝经前健康妇女(例如,年龄在20岁至54岁之间的妇女)、患有晚期HGSOC的妇女(例如,III期和IV期HGSOC病例)、患有早期HGSOC的妇女(例如,I期和II期HGSOC病例)、患有良性妇科肿瘤的妇女(例如,患有良性妇科增生的妇女)和/或患有炎症性疾病、病症或病状的妇女(例如,患有炎症病状包括子宫内膜异位症、盆腔炎、炎性肠病(例如,克罗恩氏病和/或溃疡性结肠炎等)和/或其他炎症性疾病的妇女)。

[0686] 在一些实施方案中,两步筛查程序可表征各种生物标记物组合的性能。例如,最初可在健康背景池(来自各年龄组)和晚期HGSOC池中筛查各种生物标记物组合(例如,用于捕获探针(例如,用于免疫亲和捕获)和检测探针的生物标记物的各种组合)。在一些实施方案中,在健康池和卵巢癌池之间表现出不良分离(例如, $\Delta Ct$ 小于4,对应于小于16倍的差异)的生物标记物组合可作为用在分离中的生物标记物组合从进一步研究中排除,然而,当与如本文所述的其他生物标记物组合组合时,此类生物标记物组合可能是有用的。在一些实施方案中,在健康池和卵巢癌池之间表现出不良分离(例如, $\Delta Ct$ 小于2,对应于小于4倍的差异)的生物标记物组合可作为用在分离中的生物标记物组合从进一步研究中排除,然而,当与如本文所述的其他生物标记物组合组合时,此类生物标记物组合可能是有用的。在一些实施方案中,在健康池和卵巢癌池之间表现出不良分离(例如, $\Delta Ct$ 小于1,对应于小于2倍的差异)的生物标记物组合可作为用在分离中的生物标记物组合从进一步研究中排除,然而,当与如本文所述的其他生物标记物组合组合时,此类生物标记物组合可能是有用的。

[0687] 在一些实施方案中,两步筛查程序可表征各种生物标记物组合的性能。例如,最初可在健康背景池(来自各年龄组)和晚期HGSOC池中筛查各种生物标记物组合(例如,用于捕获探针(例如,用于免疫亲和捕获)和检测探针的生物标记物的各种组合)。在一些实施方案中,表现出良好诊断性能(例如, $\Delta Ct$ 大于1,对应于大于2倍的差异)的生物标记物组合可用混合的早期HGSOC、良性妇科肿瘤和/或炎症病状进行第二轮筛查。在一些实施方案中,表现出良好诊断性能(例如, $\Delta Ct$ 大于2,对应于大于4倍的差异)的生物标记物组合可用混合的早期HGSOC、良性妇科肿瘤和/或炎症病状进行第二轮筛查。在一些实施方案中,表现出良好诊断性能(例如, $\Delta Ct$ 大于4,对应于大于16倍的差异)的生物标记物组合可用混合的早期HGSOC、良性妇科肿瘤和/或炎症病状进行第二轮筛查。在一些实施方案中,可进一步评估可区分早期和晚期HGSOC与对照池的顶级生物标记物组合(例如,表现最好的大约20种生物标记物组合)。

[0688] 在示例性测定(例如,本文描述的那些)中并入一种或多种另外的生物标记物组合可提高其灵敏度。如实施例7中指出的,通过利用至少两种生物标记物组合,可实现提高的测定性能(例如,在98%特异性下至少大约80%的灵敏度;或在99.5%特异性下至少大约

70%的灵敏度)。混合的患者样品可近似整个单独患者群体的测定信号,这一特征可提供真实的矩阵来以有效的方式评估大量的生物标记物组合。鉴定的顶级生物标记物组合(例如,多达20种生物标记物组合)可在基于个体患者血浆的试验性研究中进行进一步测试。在一些实施方案中,基于个体患者血浆的试验性研究可包括绝经前或绝经后的对照患者、无症状的对照患者、有症状的对照患者、患有良性妇科肿瘤的对照患者和/或患有非卵巢癌炎性健康病状的对照患者。在一些实施方案中,基于个体患者血浆的试验性研究可包括绝经前或绝经后的测试患者、有症状的测试患者、无症状的测试患者、患有I期或II期HGSOC的测试患者和/或患有III期或IV期HGSOC的测试患者。非HGSOC健康病状可与卵巢癌群组进行年龄匹配。可以期望的是,对样品(例如,健康对照、良性妇科肿瘤和/或其他非靶病状)可提供对数正态分布的估计,以设置与98%特异性(大约95%CI:95.3%至100%)有关的用于遗传风险筛查测定的信号截止值,和与99.5%特异性(大约95%CI:98.1%至100%)有关的用于症状分类测定的信号截止值。可使用组合之间的双变量关联来评估生物标记物组合性能特征以评估独立性,并且可以使用用于预测卵巢癌的三变量逻辑回归模型进一步测试顶级生物标记物组合。

[0689] 可实现对可区分HGSOC病例与对照并识别组合之间的正交性的新的生物标记物组合的鉴定。这种正交性可帮助区分HGSOC病例与对照群组,增加如本文所述的示例性测定的灵敏度。为了评估患者群组中的种族多样性,可来源于不同群体的供应商处获得样品。在某些实施方案中,示例性生物标记物组合可对特定种族和/或族裔群组具有特异性。在某些实施方案中,在不同种族和/或族裔群组中测试示例性生物标记物组合可鉴定对特定种族和/或族裔群组具有适当诊断价值的生物标记物组合。

[0690] 在主要患者样品中验证其他卵巢癌生物标记物组合可提高示例性测定的诊断性能。在149名妇女的群组中,如本文所述的示例性测定使用两种生物标记物组合在98%的特异性下实现了66.7%的灵敏度,并在99.5%的特异性下实现了63.9%的灵敏度(如实施例7中所述和图21中所示)。通过并入其他正交性生物标记物组合,测定性能可提高超过80%的灵敏度(特异性为98%)和70%的灵敏度(特异性为99.5%)。

[0691] 实施例9:用于检测卵巢癌的其他生物标记物组合的附加评估

[0692] 在此实施例中,使用各种患者样品评估了10种不同的生物标记物组合,所述患者包括例如绝经后健康妇女(例如,年龄在55岁至79岁之间的健康妇女)、绝经前健康妇女(例如,年龄在20岁至54岁之间的妇女)、患有晚期HGSOC的妇女(例如,III期和IV期HGSOC病例)、患有早期HGSOC的妇女(例如,I期和II期HGSOC病例)、患有良性妇科肿瘤的妇女(例如,患有良性妇科增生的妇女)和/或患有炎性疾病、病症或病状的妇女(例如,患有子宫内膜异位症、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎等的妇女)。图22描绘了示例性测定的性能(例如,如实施例1中所述),所述测定涉及区分对照受试者(例如,健康妇女受试者和/或患有良性妇科肿瘤和/或炎性病状的受试者)与卵巢癌患者的单个示例性生物标记物组合。示例性单个生物标记物组合呈现在表6中:

[0693] 表6捕获和检测探针的某些示例性组合。

|        | 捕获探针的靶标 | 检测探针1的靶标 | 检测探针2的靶标 |
|--------|---------|----------|----------|
| [0694] | SLC34A2 | MUC16    | MUC16    |
|        | SLC34A2 | FOLR1    | FOLR1    |
|        | SLC34A2 | MUC16    | FOLR1    |
| [0695] | MUC16   | MUC16    | MUC16    |
|        | MUC16   | MUC16    | FOLR1    |
|        | MUC16   | MUC16    | CLDN3    |
|        | MUC16   | FOLR1    | CLDN3    |
|        | MUC16   | MUC16    | CLDN6    |
|        | MUC16   | FOLR1    | FOLR1    |
|        | LRRTM1  | MUC16    | MUC16    |

[0696] 图23至28描绘了示例性测定的性能(例如,如实施例1中所述),所述测定涉及上表中所示的某些生物标记物组合。在每个测定中,通过选择(i) 偏离健康对照受试者和患有炎症病状的受试者的平均值2.93个标准差(例如,排除分布中99.83%的健康受试者)或(ii) 来自健康对照受试者的最大测定信号中限制性较小的来确定截止值。在一些实施方案中,与健康对照受试者和/或患有炎症病状(例如,克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、子宫内膜异位症等)的受试者相比,良性卵巢肿瘤样品可能较少关注脱靶信号。因此,在一些此种实施方式中,可能不包括良性卵巢肿瘤样品以确定截止值。图33至36描绘了涉及上表中所示的某些生物标记物组合的其他示例性测定(例如,如实施例1中所述进行)的性能。

[0697] 在测试的生物标记物组合中,图29描绘了三种选定生物标记物组合的性能(包括灵敏度),它们是:(图A) 针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对MUC16的第二检测探针;(图B) 针对SLC34A2的捕获剂和一组至少针对FOLR1的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针;(图C) 针对MUC16的捕获剂和一组至少针对MUC16的第一检测探针和针对FOLR1的第二检测探针。如图所示,每个单独测定都实现了至少50%或更高的灵敏度。

[0698] 为了进一步增加卵巢癌检测测定的灵敏度,可使用本文所述的至少两种生物标记物组合的组合。例如,当使用如图29中所示的所有三种生物标记物组合时(即,仅当样品达到或超过包括所有三种单独生物标记物组合的截止值的分类截止值时,阳性指示卵巢癌),此测定的灵敏度得到提高——卵巢癌I期患者:83.3%;卵巢癌II期患者:83.3%;卵巢癌III期患者:90.0%;卵巢癌IV期患者:71.4%;低血清CA-125水平的卵巢癌患者:71.4%;患有良性卵巢肿瘤的妇女:30.0%;以及健康受试者:0.8%。这示出了使用两种或更多种生物标记物组合(例如,如本文所述)可实现至少80%至81%的测定灵敏度和至少99.2%或更高(高达100%的特异性)的测定特异性。

[0699] 图30至32证明了使用某些生物标记物组合的示例性测定(例如,如实施例1中所述)的能力可检测具有正常血清CA-125(例如,低于35U/mL)的卵巢癌患者,否则这些患者将被常规血清CA-125测定遗漏。此外,结果示出了生物标记物组合(例如,本文所述的)可区分卵巢癌患者与许多血清CA-125升高的非卵巢癌患者(例如,患有良性妇科肿瘤的患者),否则这些患者会被错误地诊断为患有卵巢癌。这些结果示出了血清CA-125不一定与妇女患卵巢癌的风险相关,而本文提供的技术可成功地鉴定卵巢癌受试者,而与她们的血清CA-125

水平无关。

[0700] 实施例10:示例性卵巢癌液体活检测定的验证

[0701] 此实施例涉及在其他群体/群组中验证示例性卵巢癌液体活检测定。可以进行独立验证研究,以使用其他患者样品群组评估如本文所述的示例性卵巢癌诊断测定。样品可以从任何适当的来源获得。技术专家在进行任何结果分析之前不知道样品名称,和/或测定结果由外部独立技术专家进行分析。为确保从代表美国的群体中取样,根据样品的可用性,至少大约20%的样品可来源于非白人种族(美国人口普查局(United States Census Bureau),2018)。

[0702] 在某些实施方案中,分析的患者群组可包括:在进行任何降低风险的手术之前处于卵巢癌遗传风险的患者(例如,具有卵巢癌家族病例的患者和/或未经双侧输卵管卵巢切除术或类似过程的BRCA1或BRCA2病理性变异携带者)、患有与腹痛相关的慢性病状的绝经后妇女(例如,患有慢性炎性病状的>54岁的妇女)、患有良性妇科肿瘤的患者和/或患有HGSOC的患者(例如,患有I/II期卵巢癌的个体,以及患有III/IV期卵巢癌的个体)。在某些实施方案中,生物标记物组合(例如,本文所述的那些)可在有遗传风险的妇女中以大约98%的特异性(95%CI:95.5%至100%)提供至少大约80%的灵敏度(95%CI:68.7%至91.3%)。在某些实施方案中,生物标记物组合(例如,本文所述的那些)可为绝经后有症状的女性以大约99.5%的特异性(95%CI:98.2%至100%)提供至少大约70%的灵敏度(95%CI:57%至83%)。此外,在某些实施方案中,示例性测定可区分患有良性肿瘤的妇女与患有HGSOC的妇女,从而导致几乎没有假阳性。

[0703] 在某些实施方案中,如本文所述的示例性测定的其他验证研究可利用来自独立来源的纵向收集的样品进行。在一些实施方案中,样品可获得自或来源于卵巢癌病例的纵向收集的抽血(例如,在不同时间点收集的抽血)。此外,可分析从年龄匹配的对照中抽取的血液。使用用于98%特异性截止值的示例性逻辑回归模型,可评估在保持每年的特异性为98%时,示例性测定在诊断前多少年(例如,无论卵巢癌诊断之前多少年抽血可用)能够检测到卵巢癌。测定灵敏度可在诊断前计算为年份的函数,同时确保对照样品中的特异性保持在98%。

[0704] 在一些实施方案中,可以期望在对于诊断时收集的样品大约98%的特异性(95%CI:93.8%至100%)下,对HGSOC具有至少大约80%的灵敏度(95%CI:63.3%至96.7%)。鉴于卵巢癌肿瘤已被示出作为I/II期疾病存在四年或更多年(Brown和Palmer,2009),示例性测定可被期望在临床诊断前两年对HGSOC实现至少大约60%的灵敏度(95%CI:39.5%至80.5%)。这与临床诊断前两年在此高风险患者群组中23.3%的PPV有关,PPV远远好于目前对处于遗传风险的妇女的护理标准。

[0705] 参考文献

[0706] Balaj,L.,Lessard,R.,Dai,L.,Cho,Y.J.,Pomeroy,S.L.,Breakefield,X.O.and Skog,J.,2011.Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences.Nature communications,2,p.180.

[0707] Bebelman,M.P.,Smit,M.J.,Pegtel,D.M.,and Baglio,S.R.,2018.Biogenesis and function of extracellular vesicles in cancer.Pharmacology&Therapeutics,188,pp.1-11.

- [0708] Brett M.Reid,Jennifer B.Permuth,Thomas A.Sellers.,2017.Epidemiology of ovarian cancer:a review,Cancer Biol Med 2017.doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
- [0709] Buys,S.S.,Partridge,E.,Black,A.,Johnson,C.C.,Lamerato,L.,Isaacs,C.,Reding,D.J.,Greenlee,R.T.,Yokochi,L.A.,Kessel,B.and Crawford,E.D.,2011Effect of screening on ovarian cancer mortality:the Prostate,Lung,Colorectal and Ovarian (PLCO) cancer screening randomized controlled trial.Jama,305(22), pp.2295-2303.
- [0710] Darmanis,S.,Nong,R.Y.,Hammond,M.,Gu,J.,Alderborn,A.,Vänelid,J.,Siegbahn,A.,Gustafsdottir,S.,Ericsson,O.,Landegren,U.and Kamali-Moghaddam,M.,2010.Sensitive plasma protein analysis by microparticle-based proximity ligation assays.Molecular&cellular proteomics,9(2),pp.327-335.
- [0711] Howlader N,Noone AM,Krapcho M,Miller D,Brest A,Yu M,Ruhl J,Tatalovich Z,Mariotto A,Lewis DR,Chen HS,Feuer EJ,Cronin KA(eds) .SEER Cancer Statistics Review,1975-2016,National Cancer Institute.Bethesda,MD,
- [0712] [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/),based on November 2018 SEER data submission,posted to the SEER web site,April 2019.
- [0713] Im,H.,Shao,H.,Park,Y.I.,Peterson,V.M.,Castro,C.M.,Weissleder,R.and Lee,H.,2014.Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nano-plasmonic sensor.Nature biotechnology,32(5),p.490.
- [0714] Jeong,S.,Park,J.,Pathania,D.,Castro,C.M.,Weissleder,R.and Lee,H.,2016.Integrated magneto-electrochemical sensor for exosome analysis.ACS nano,10(2),pp.1802-1809.
- [0715] Shao,H.,Im,H.,Castro,C.M.,Breakefield,X.,Weissleder,R.and Lee,H.,2018.New technologies for analysis of extracellular vesicles.Chemicalreviews,118(4),pp.1917-1950.
- [0716] Sun,L.,Brentnall,A.,Patel,S.,Buist,D.S.,Bowles,E.J.,Evans,D.G.R.,Eccles,D.,Hopper,J.,Li,S.,Southey,M.and Duffy,S.,2019.A cost-effectiveness analysis of multigene testing for all patients with breast cancer.JAMA oncology.
- [0717] Torre,L.A.,Trabert,B.,DeSantis,C.E.,Miller,K.D.,Samimi,G.,Runowicz,C.D.,Gaudet,M.M.,Jemal,A.and Siegel,R.L.,2018.Ovarian cancer statistics,2018.CA:a cancer journal for clinicians,68(4),pp.284-296.
- [0718] Ursula A.Matulonis,AnilK.Sood,Lesley Fallowfield,BrookeE.Howitt,Jalid Sehouli and Beth Y.Karlan.Ovarian Cancer.Nature Reviews Disease Primers 2016 Aug25;2:16061.Doi:10.1038/nrdp.2016.61
- [0719] 等效方案
- [0720] 本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所描述的发明的具体实施方案的很多等效方案。应当了解的是,除非另外指明或除非对于本领域的普通技

术人员来说显然将会出现矛盾或不一致,否则本发明涵盖了所有变化、组合以及置换,其中来自所列权利要求中的一项或多项的一个或多个限制、要素、条款、描述性术语等被引入从属于同一基础权利要求(或相关的任何其他权利要求)的另一权利要求中。此外,还应当了解的是,本发明的任何实施方案或方面可以明确地被排除在权利要求之外,无论在说明书中是否叙述了特定的排除。本发明的范围并非旨在限于以上描述,而是如以下权利要求所阐述。

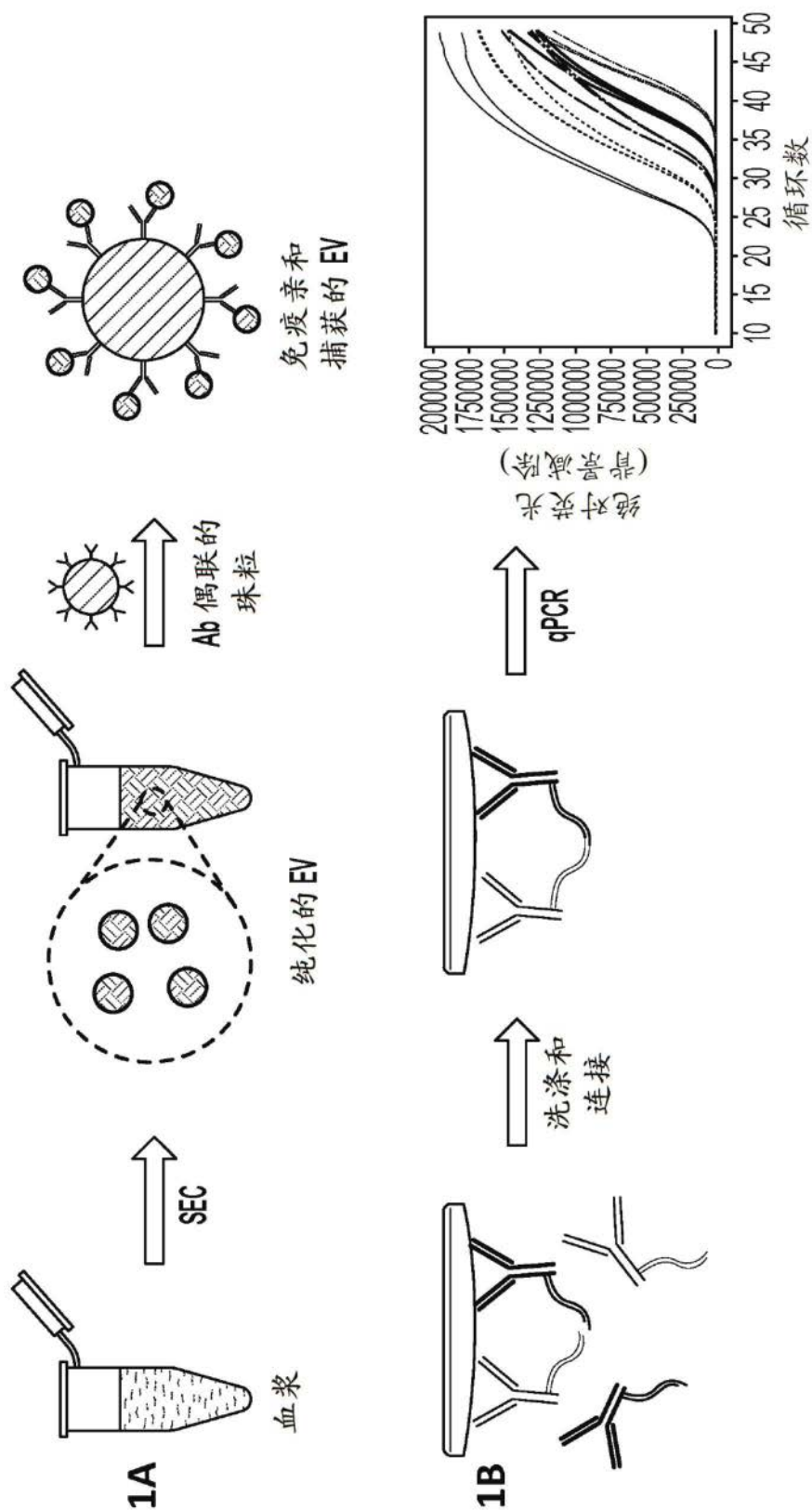


图1

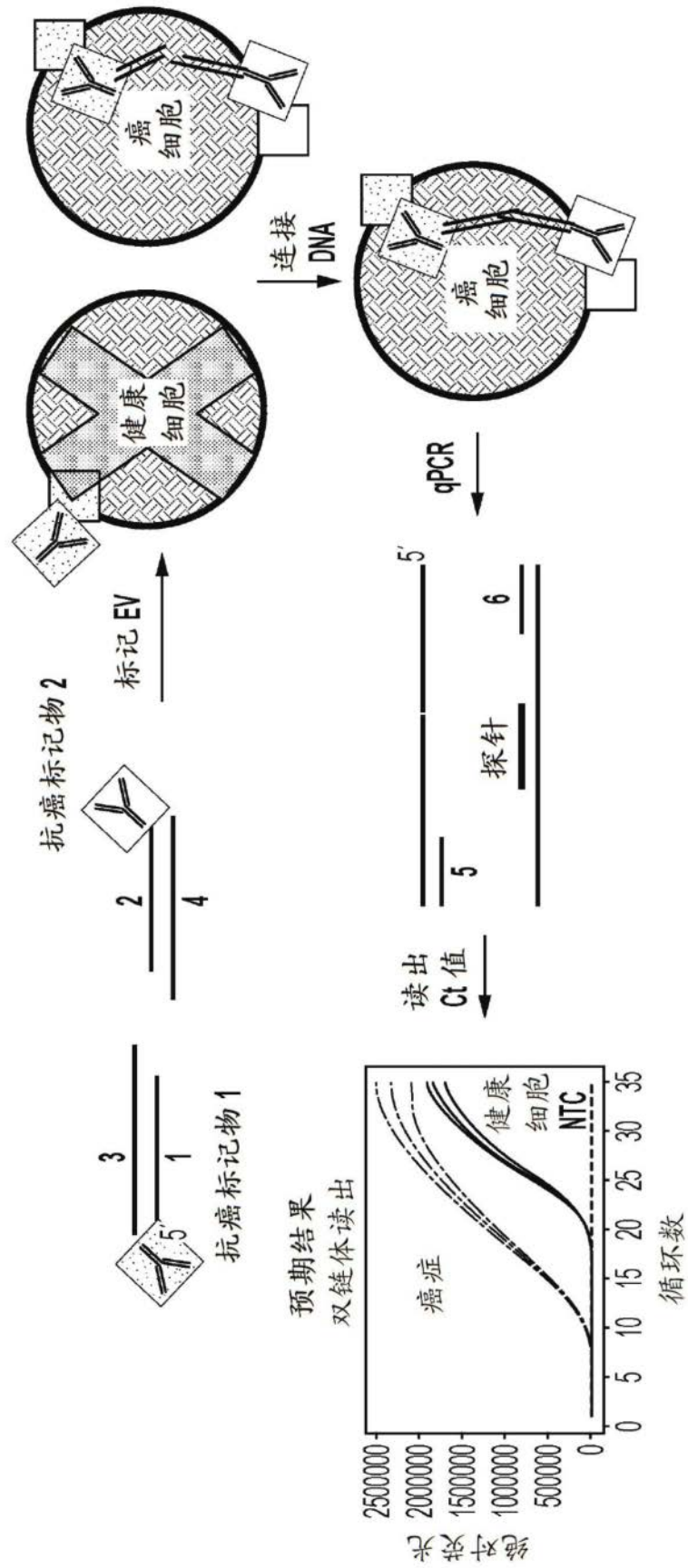
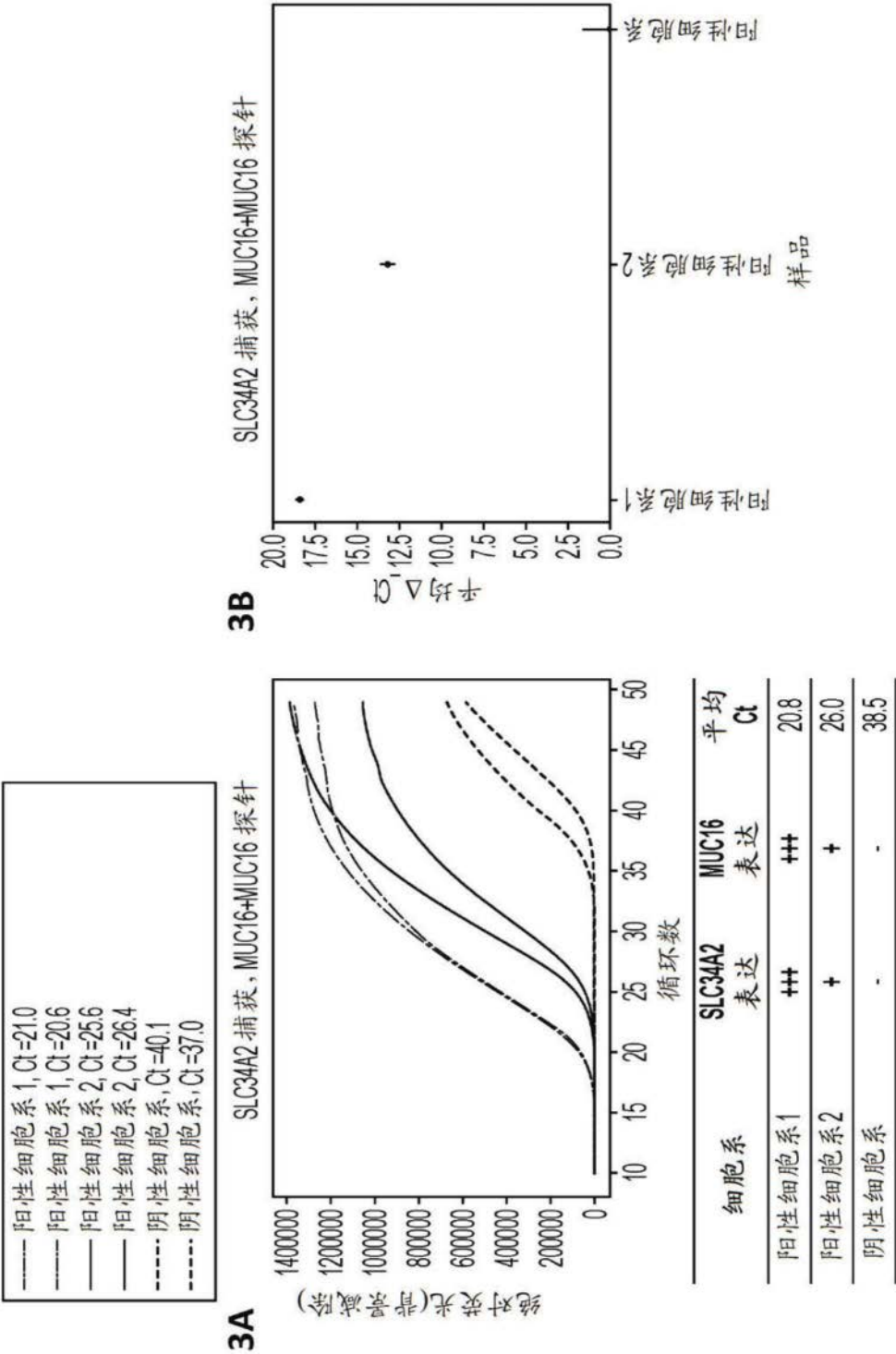


图2



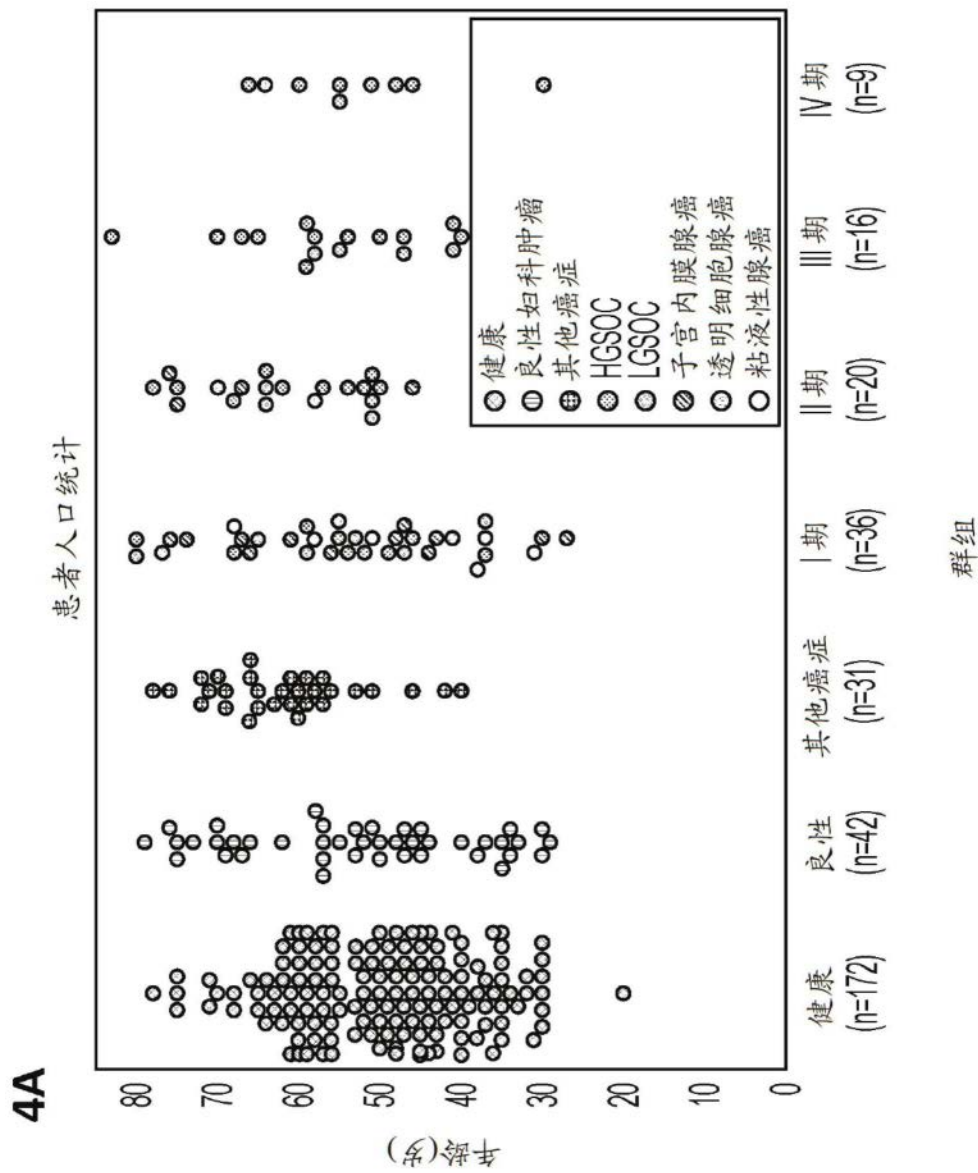


图4

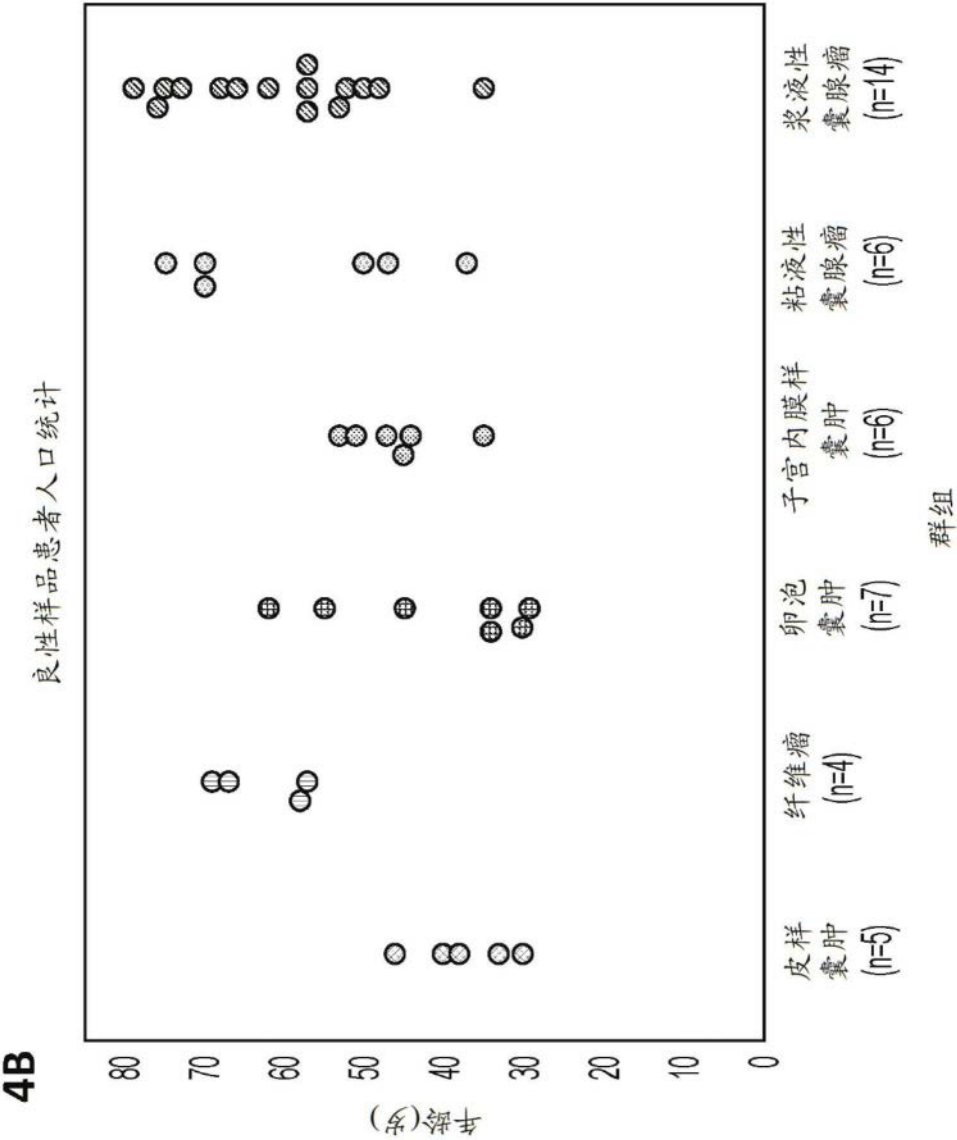


图4(续)

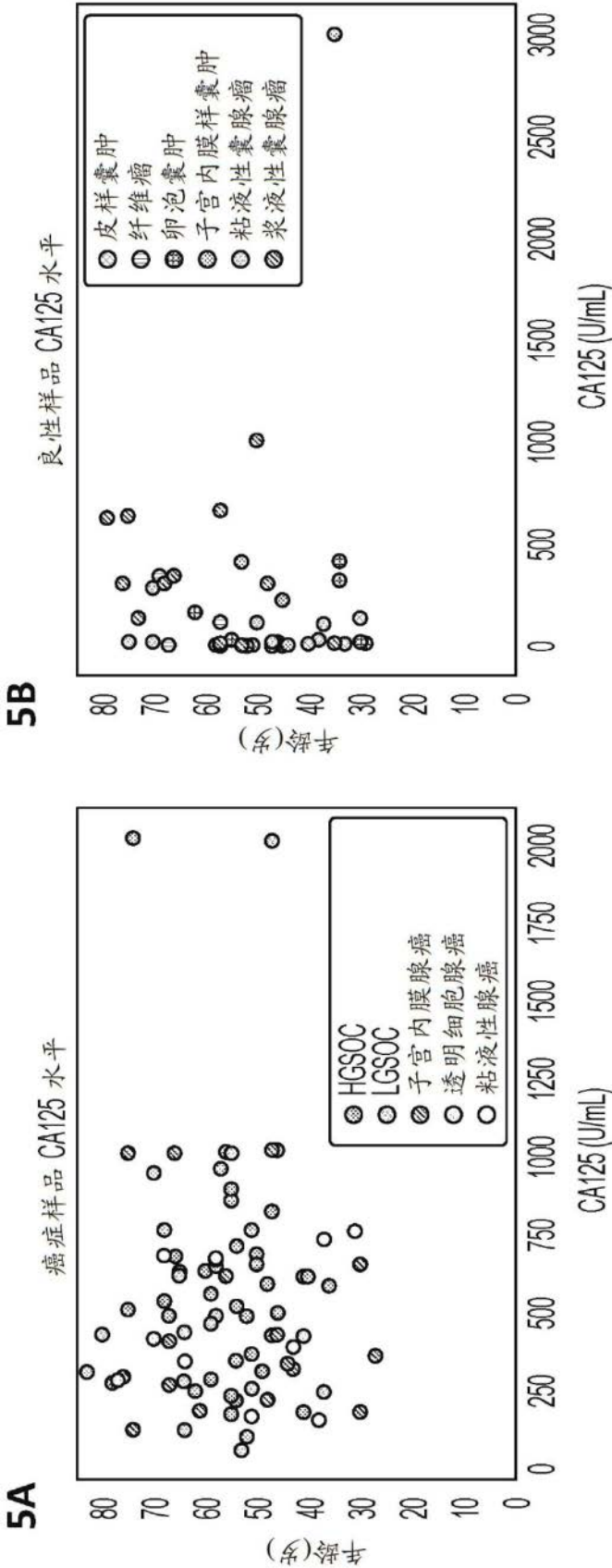


图5

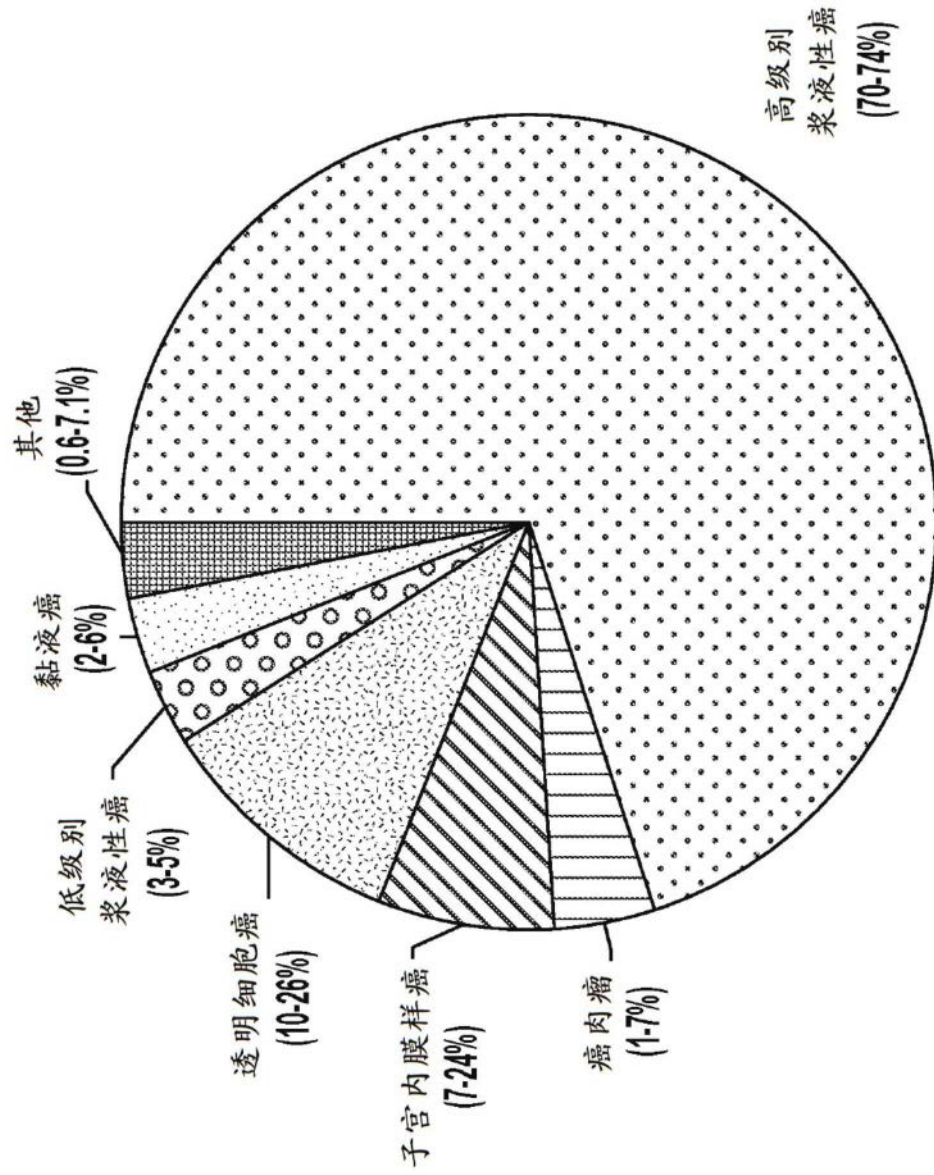


图6

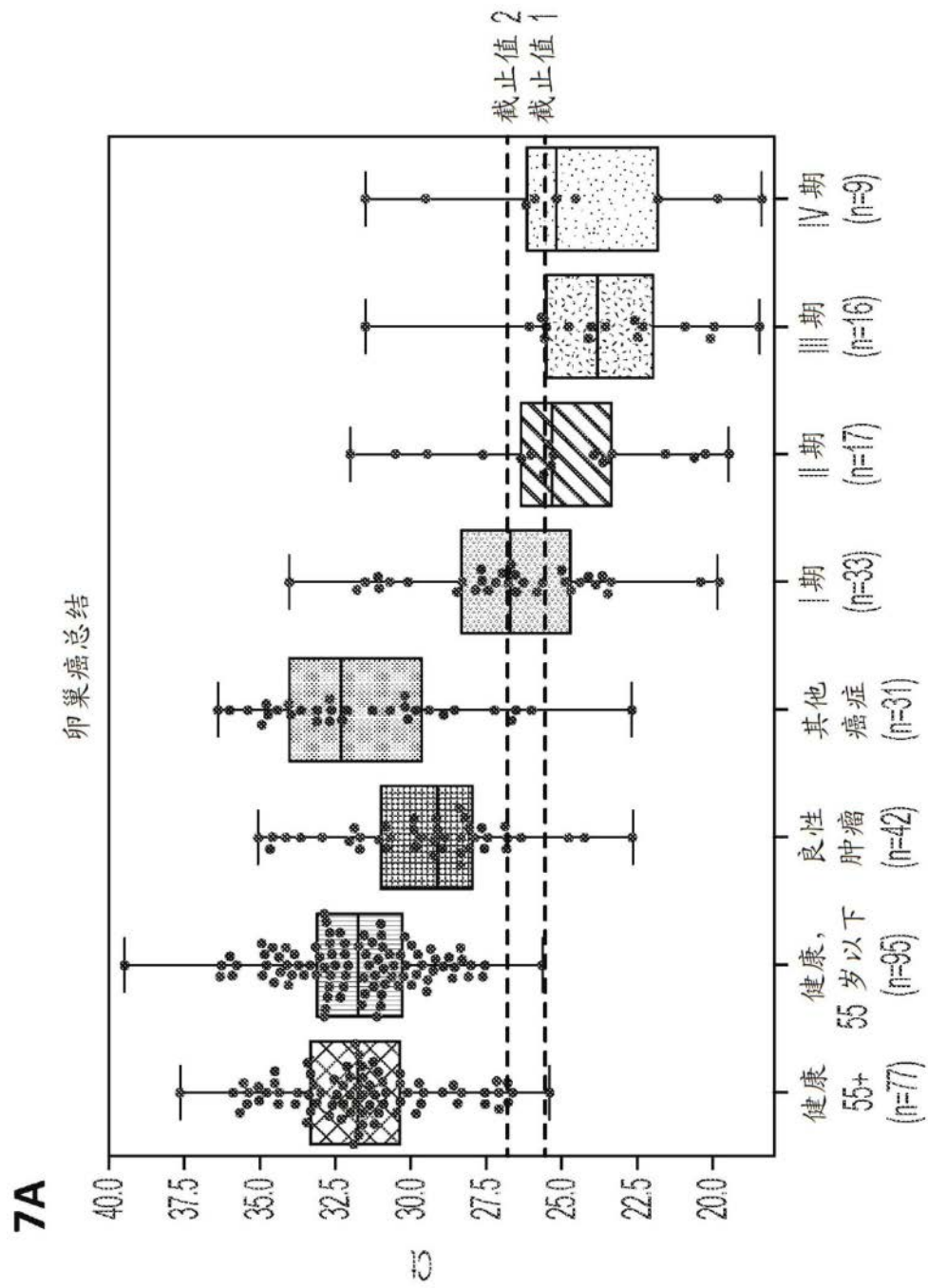


图7

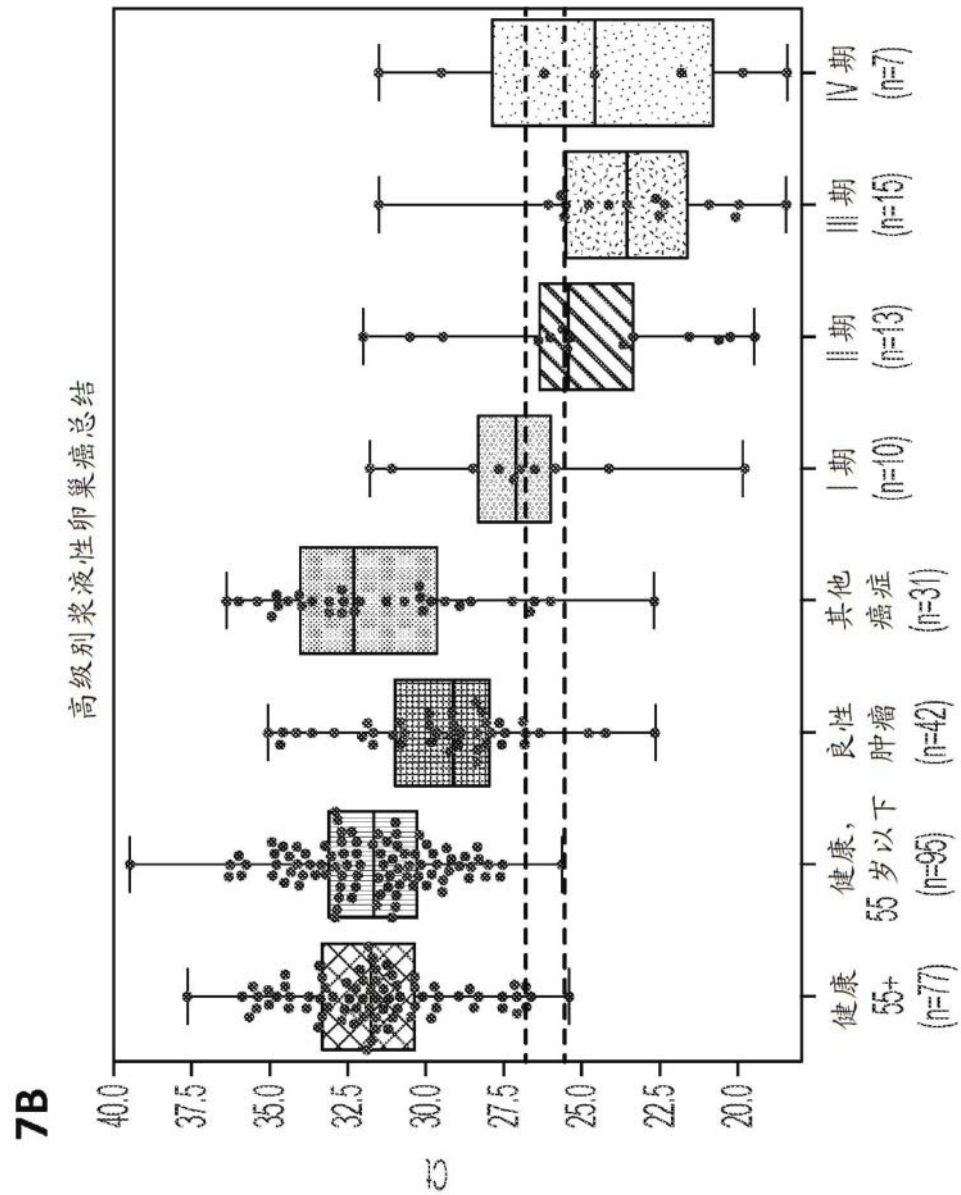


图7(续)

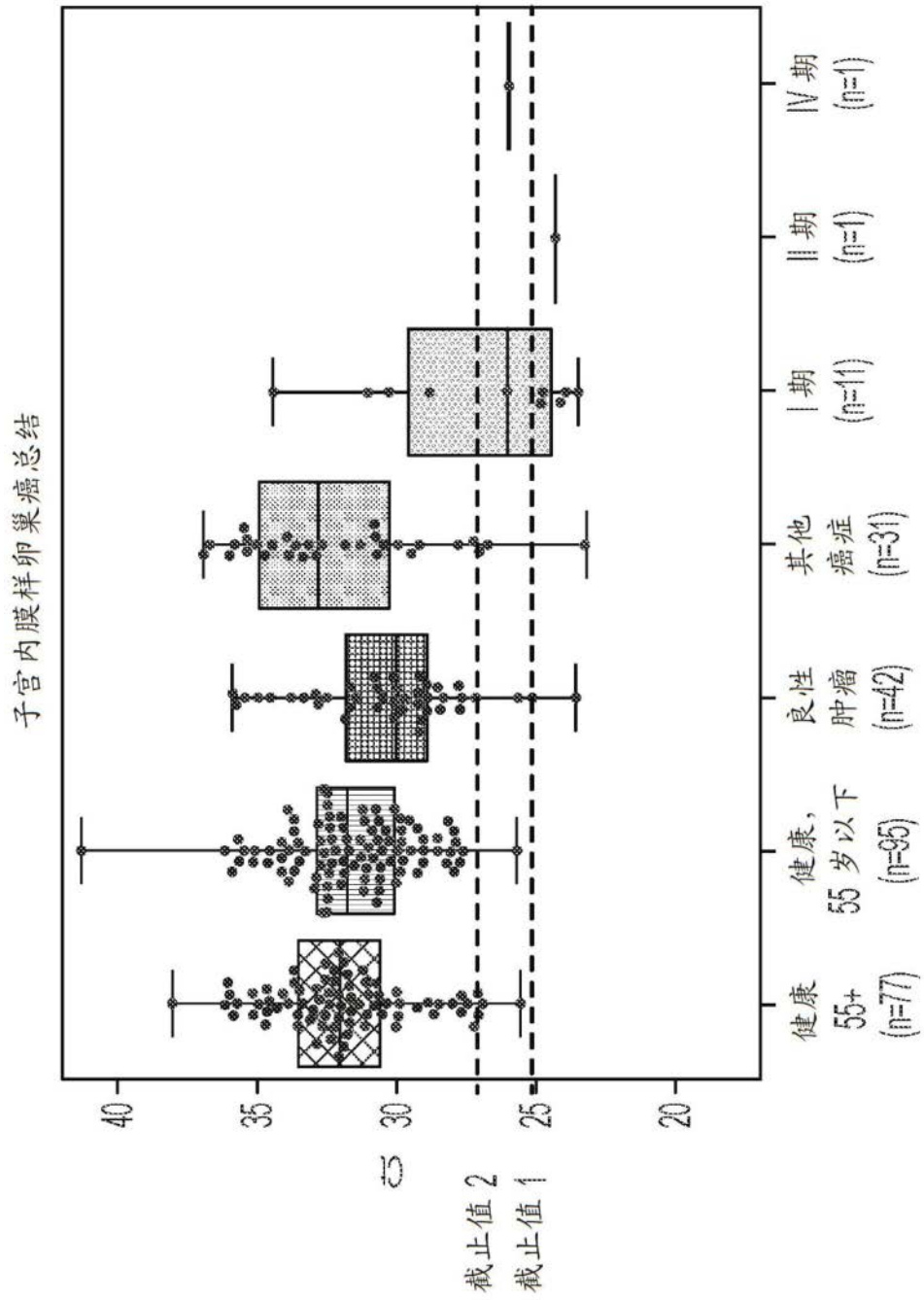


图8

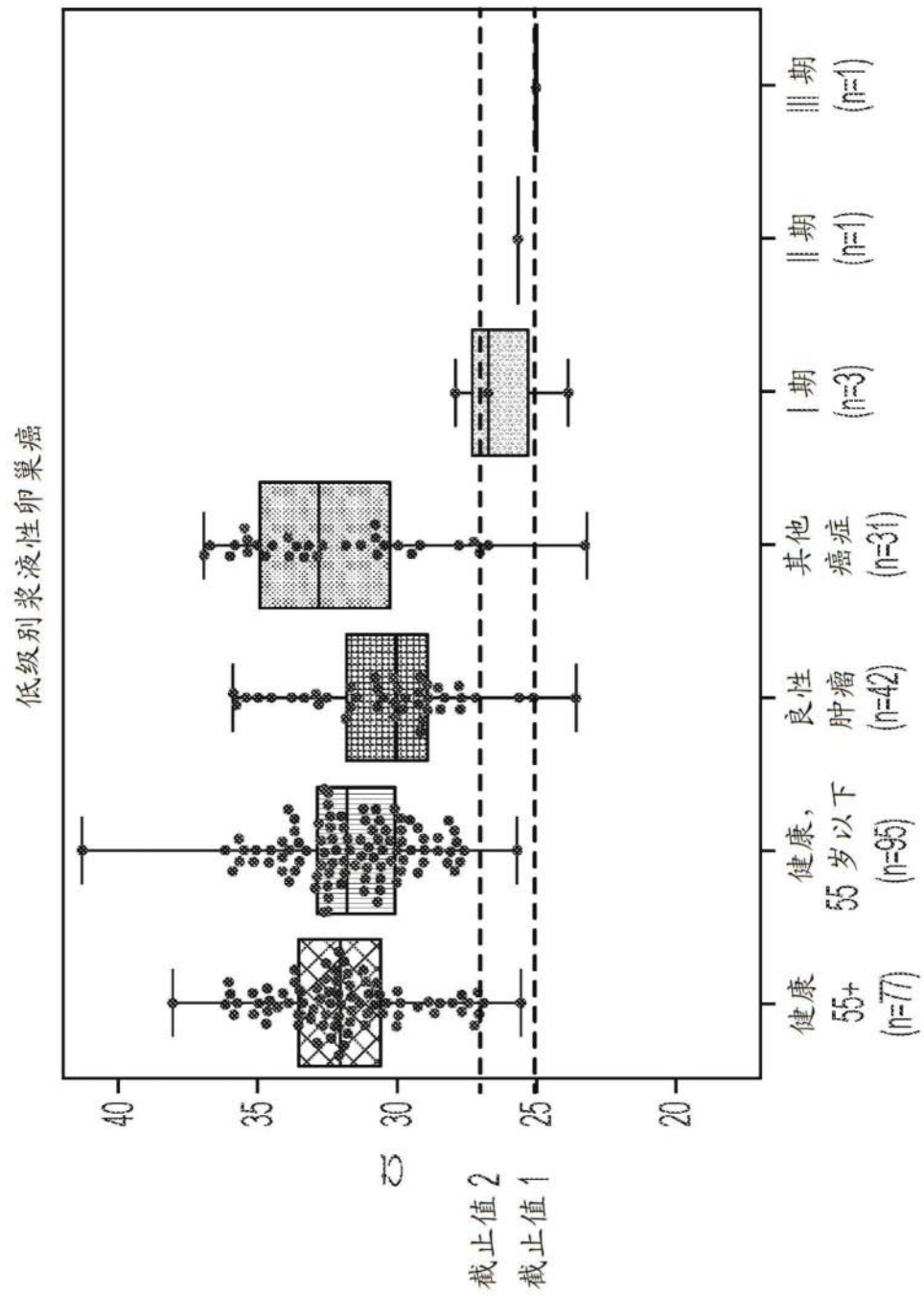


图9

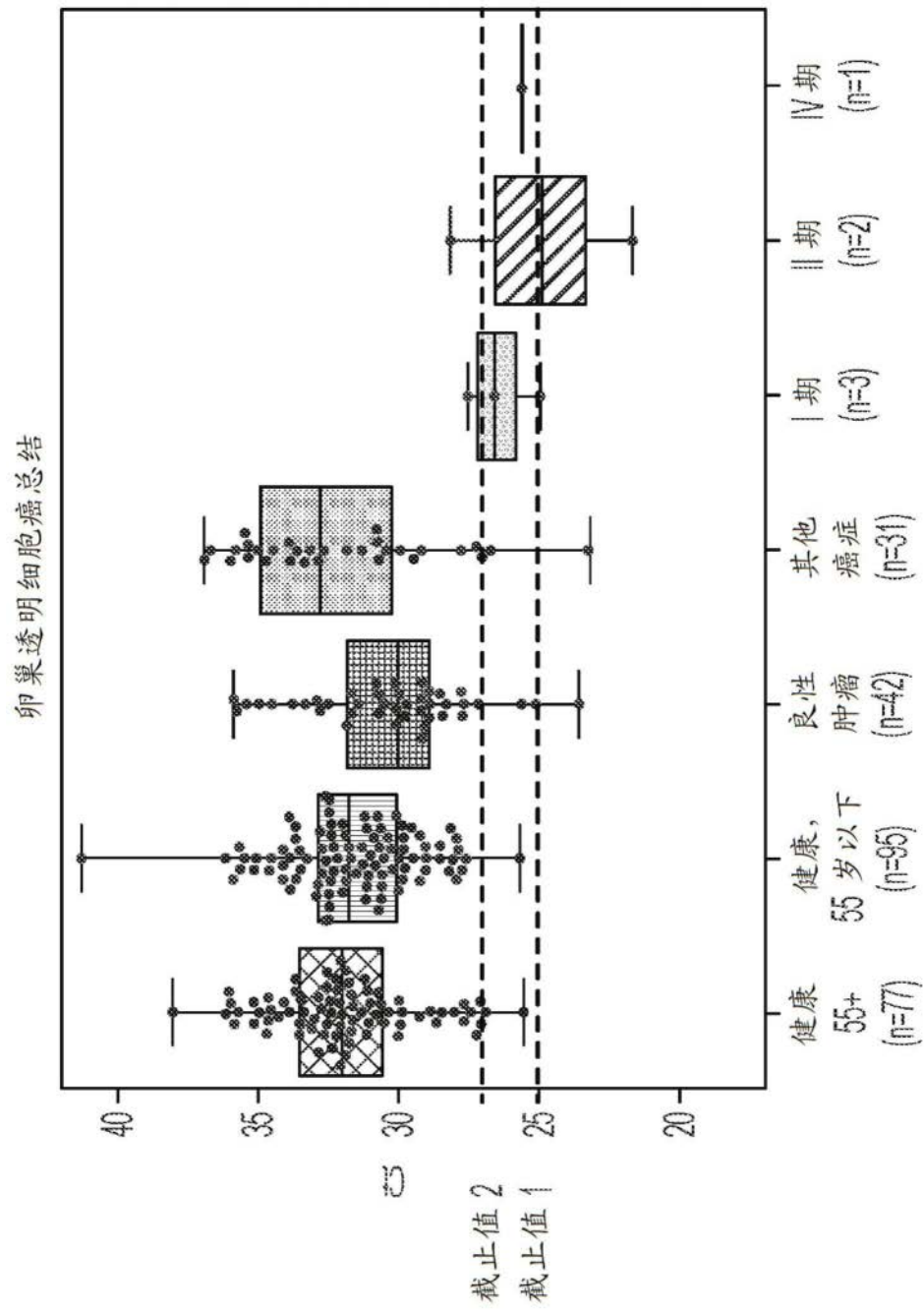


图10

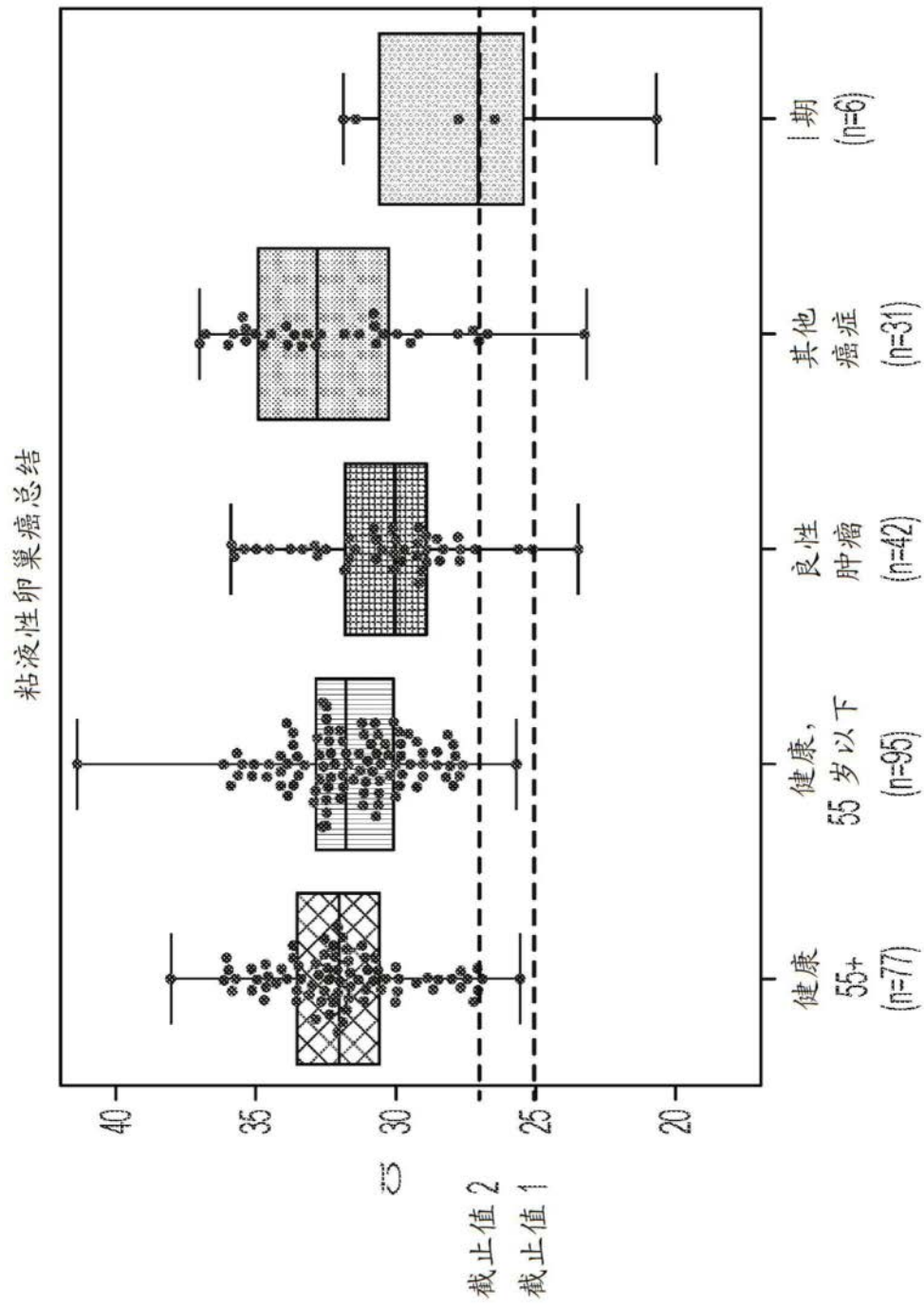


图11

12A

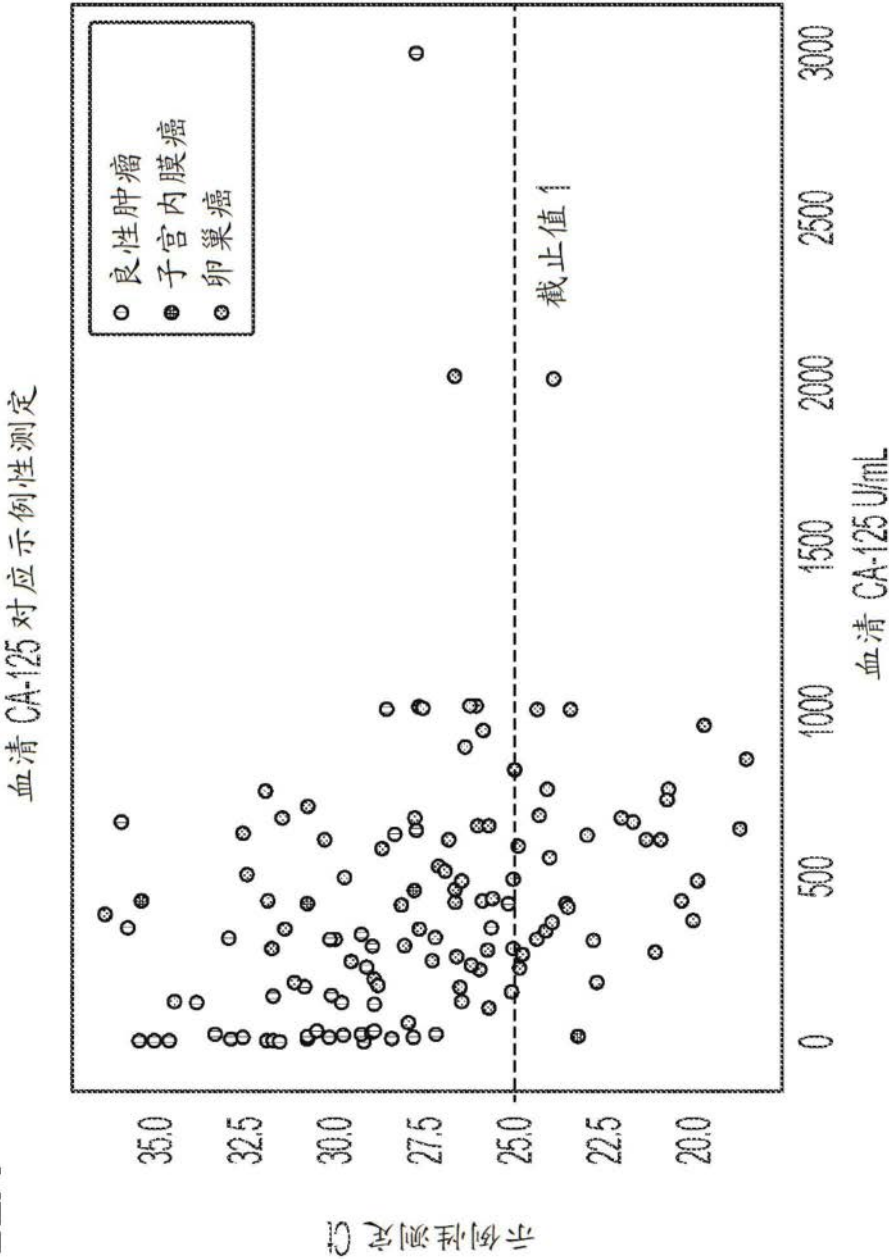


图12

**12B**

ROC 曲线: Halo 信号与血清 CA-125

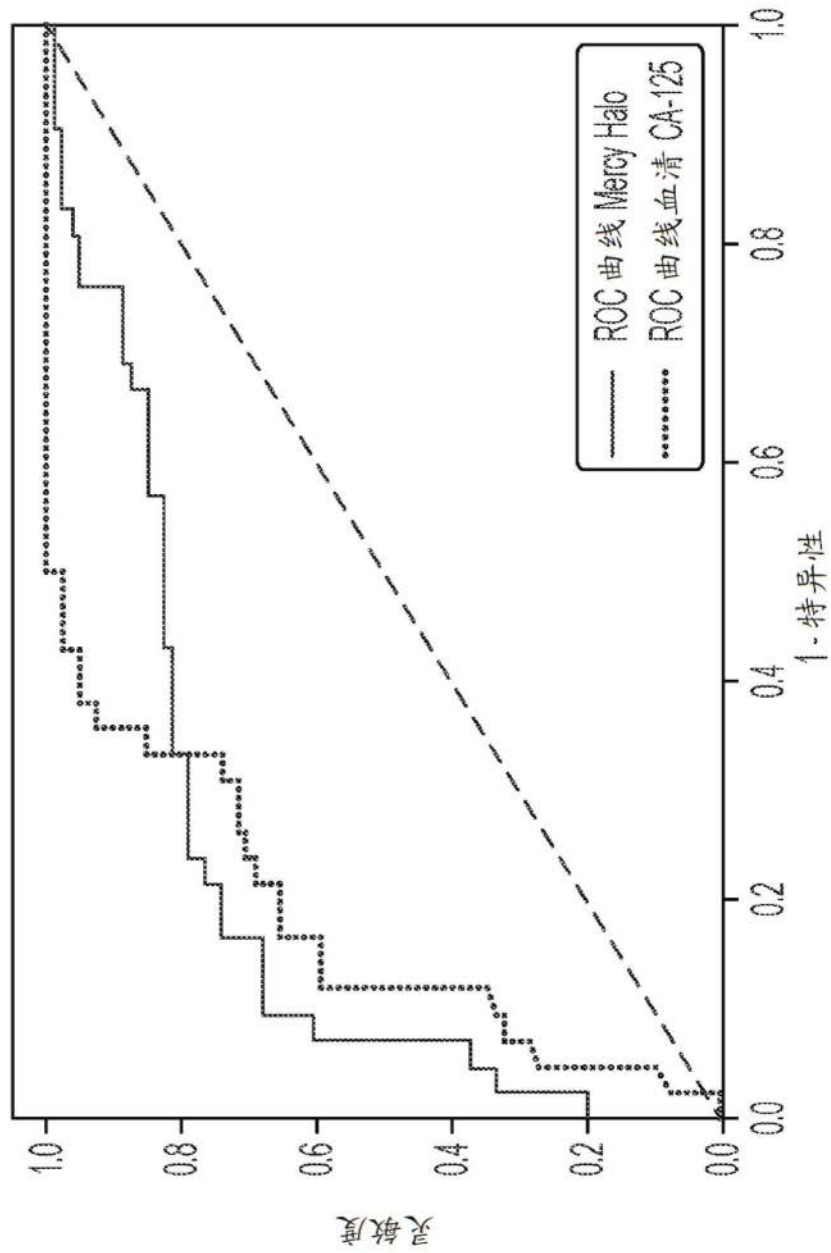


图12(续)

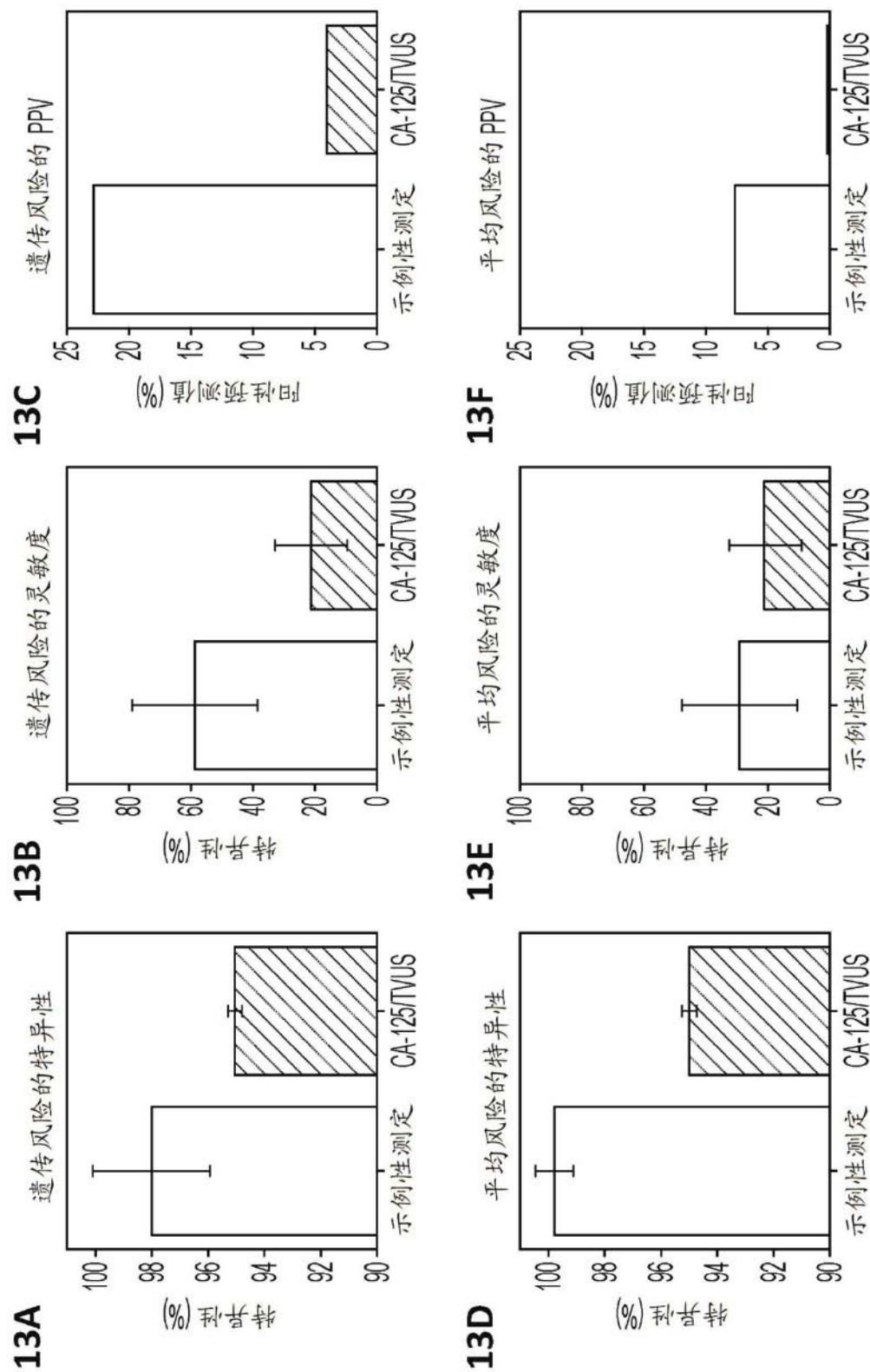


图13

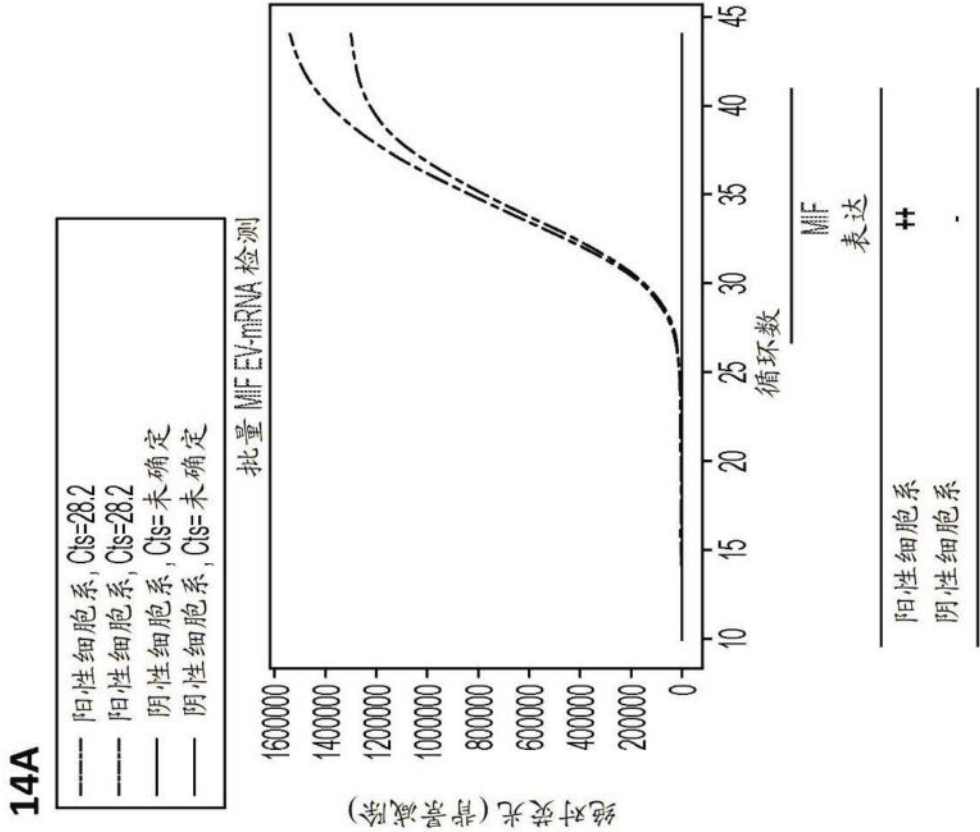


图14

14B

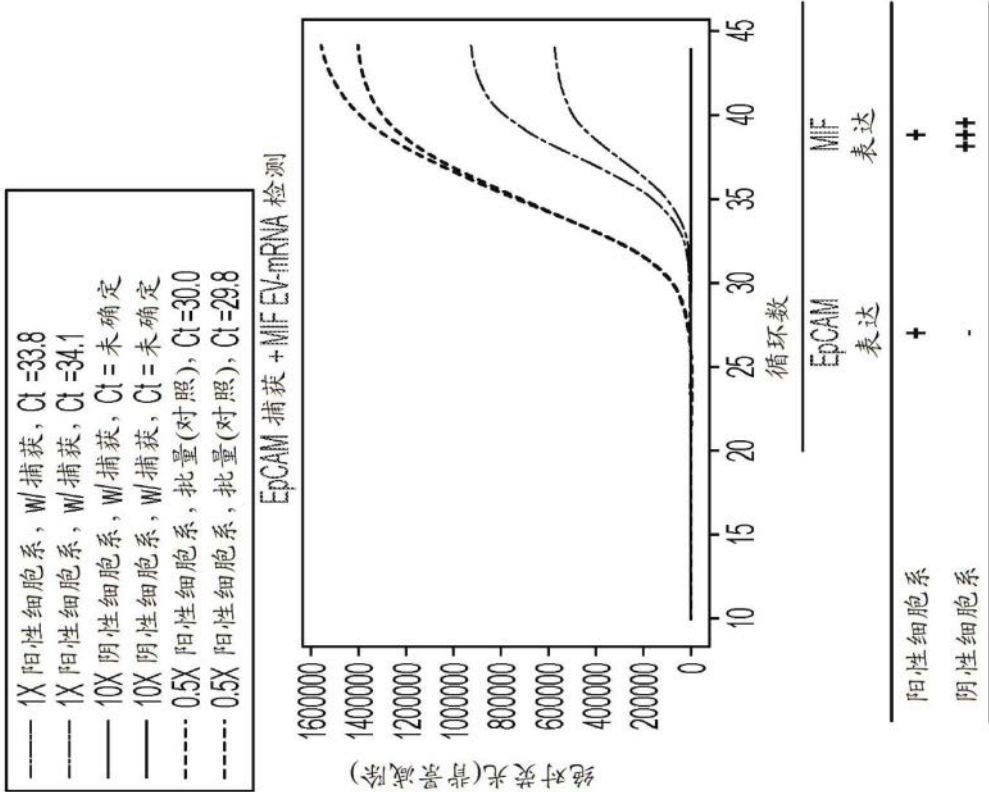


图14(续)

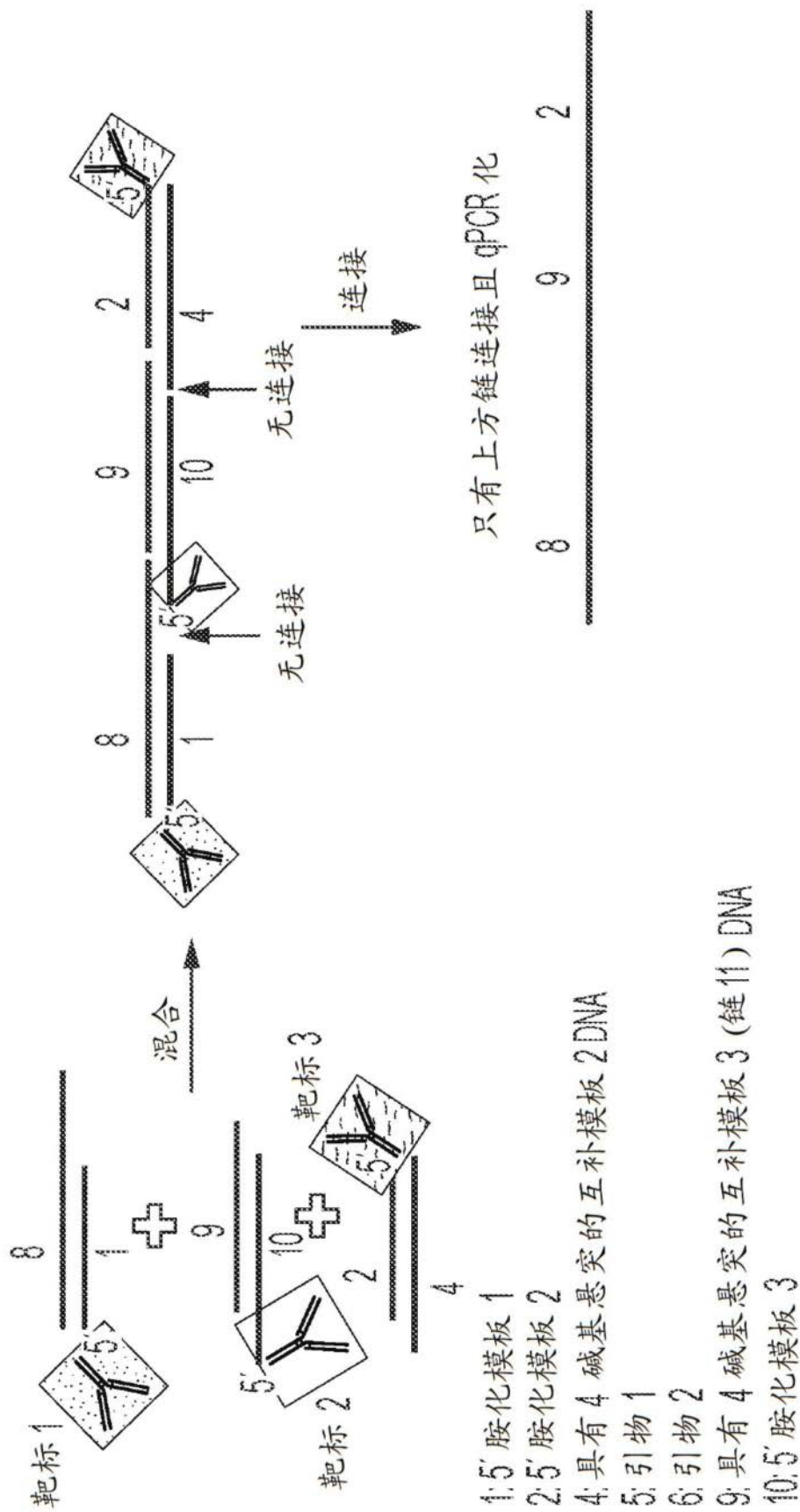


图15

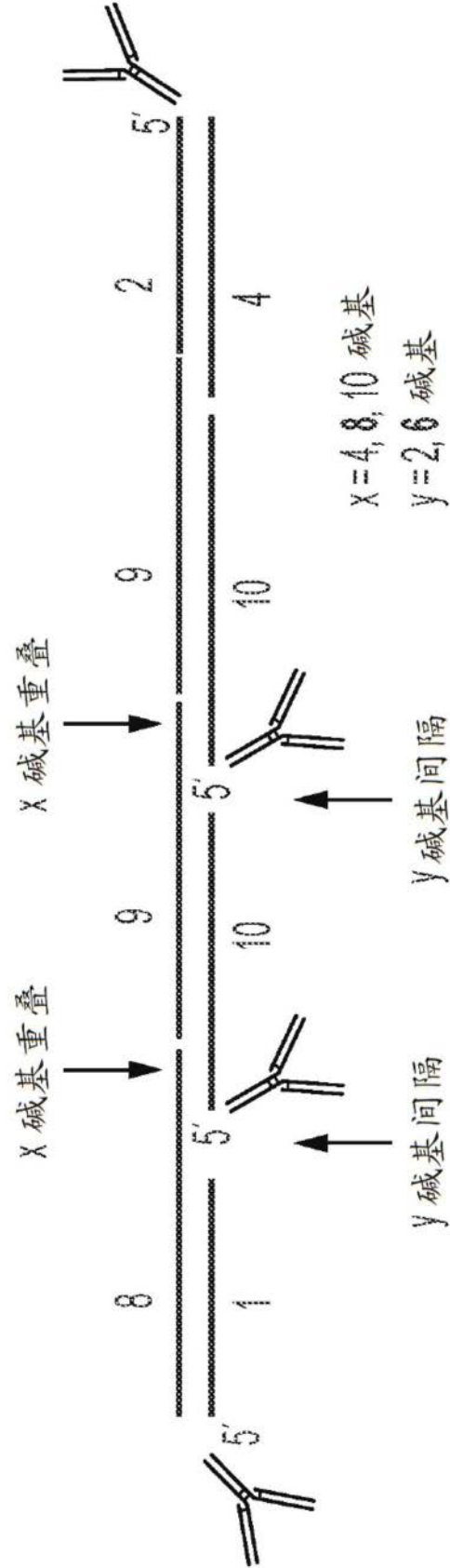


图16

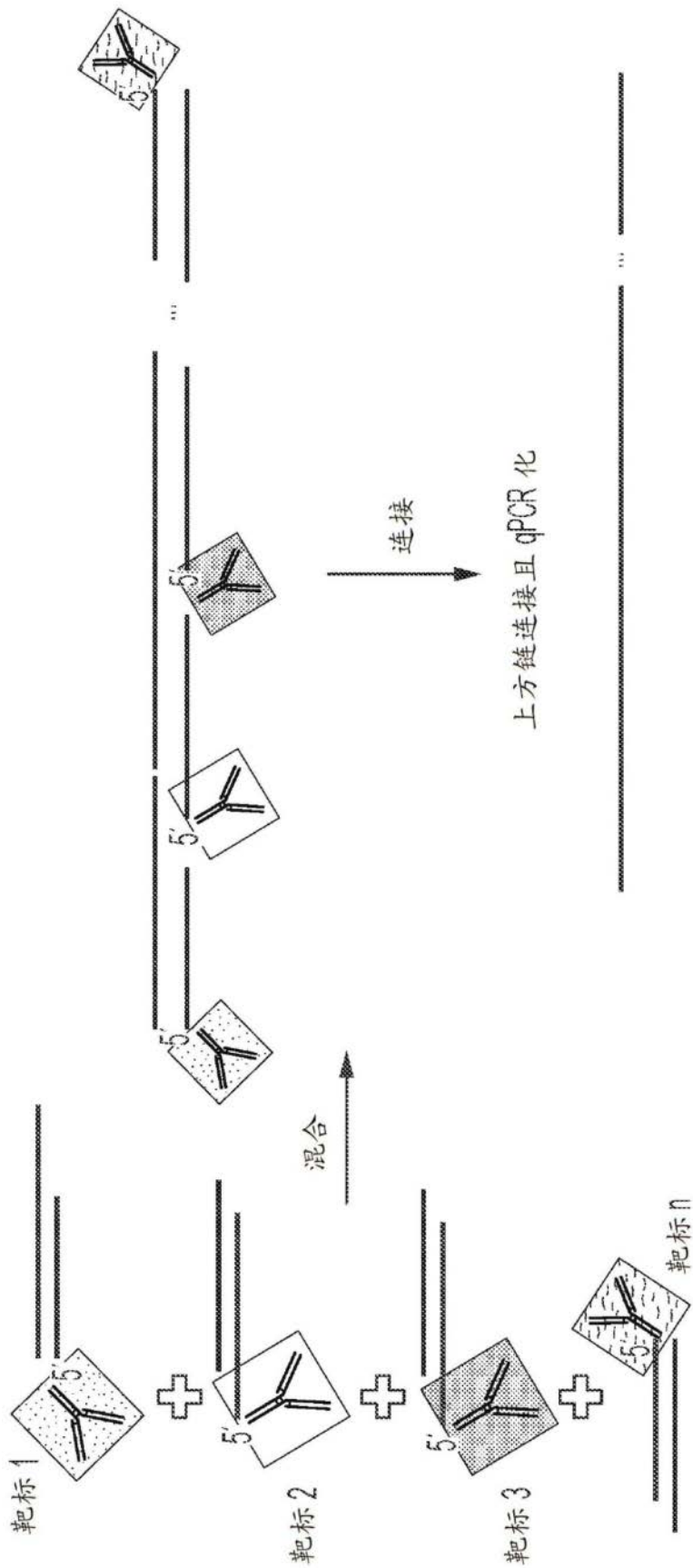


图17

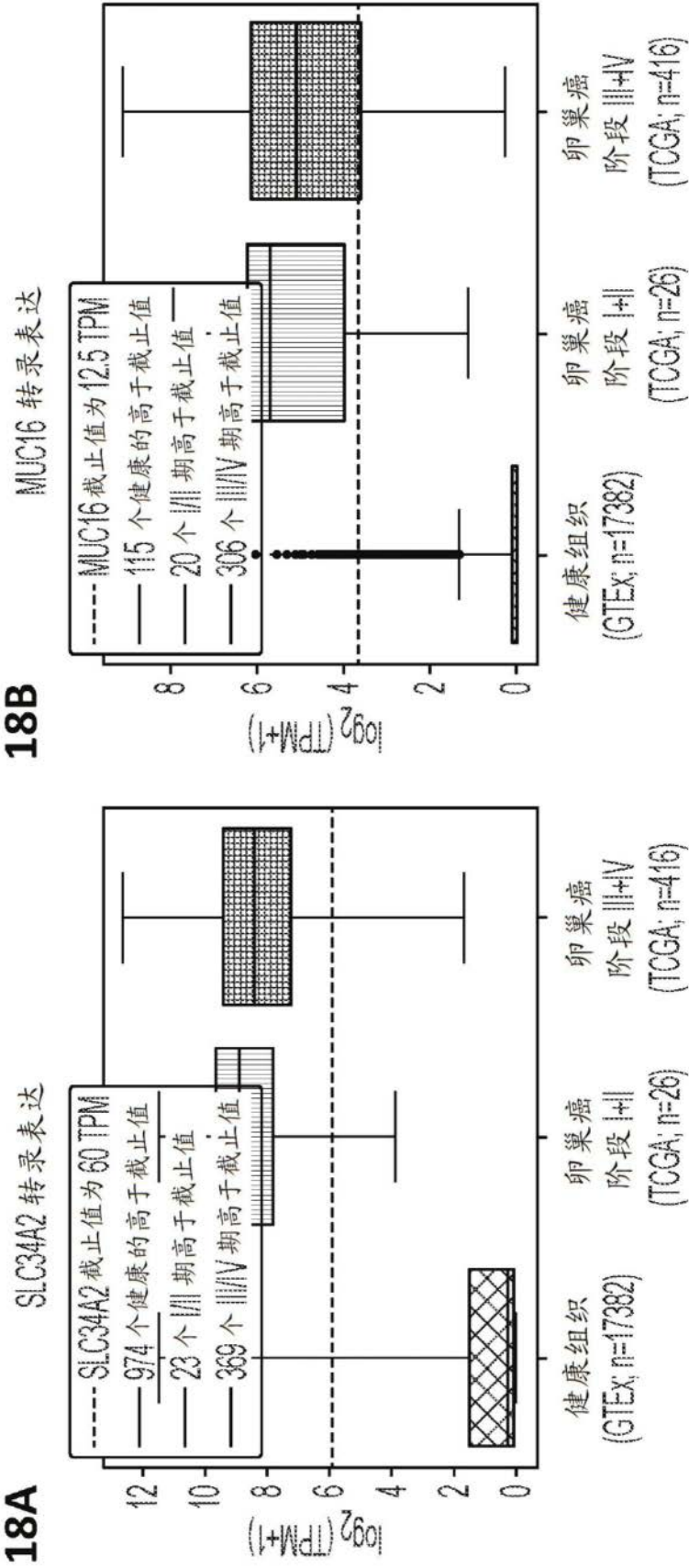


图18

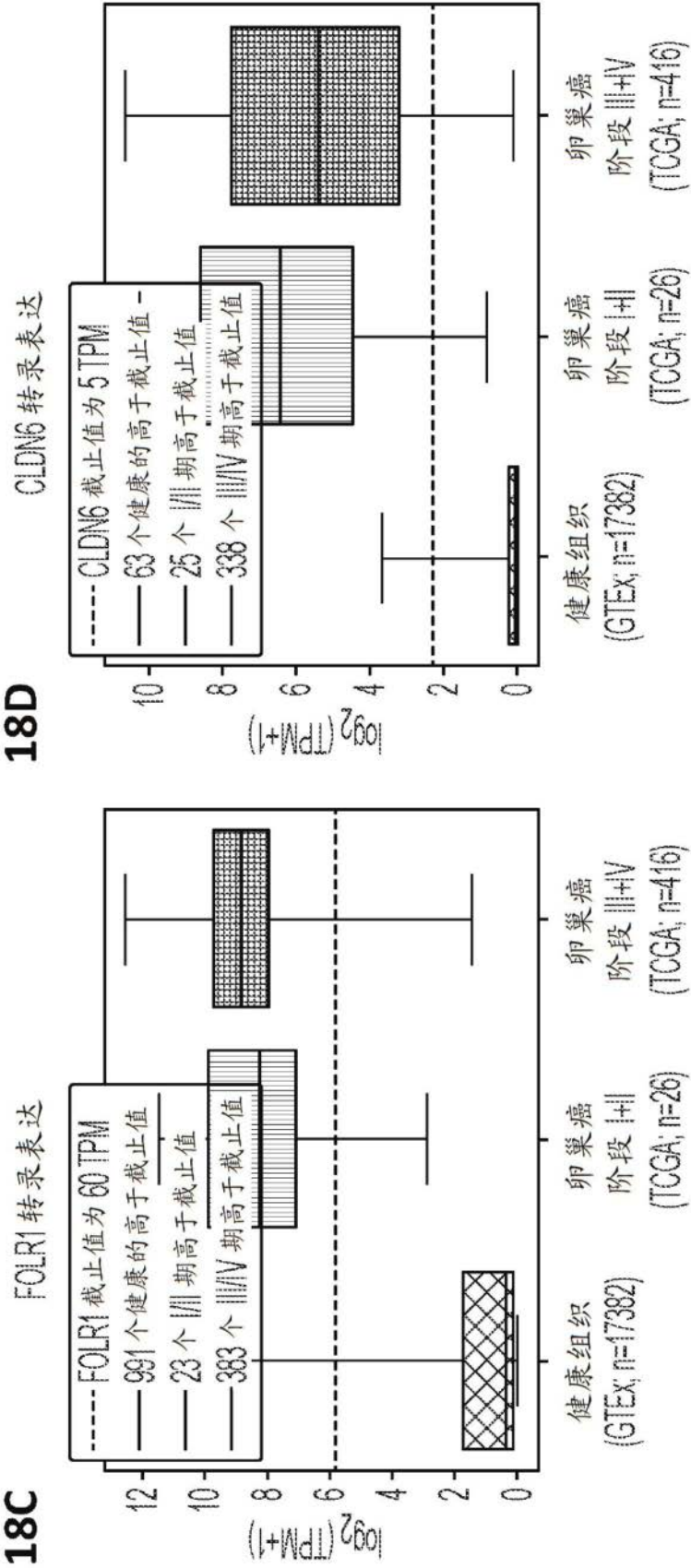


图18(续)

19A

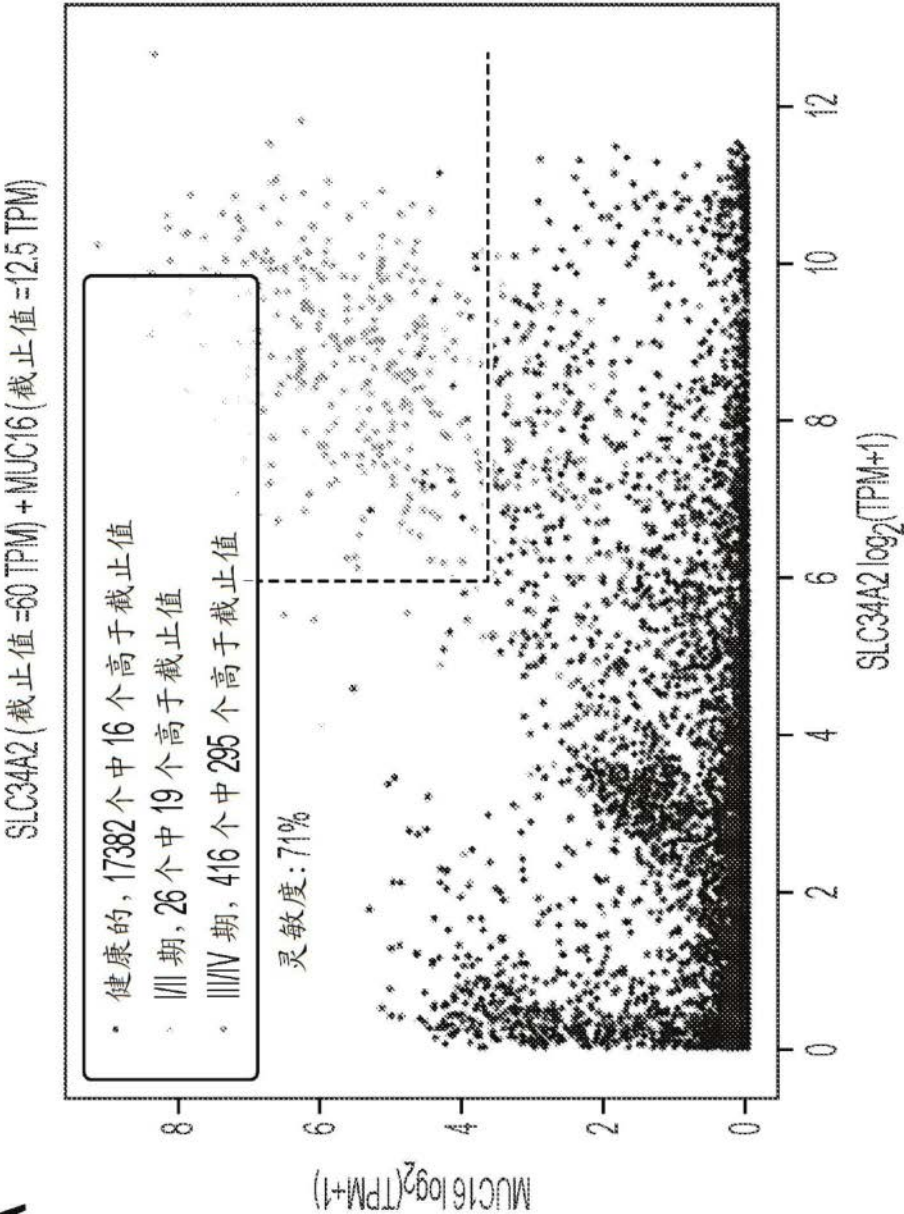


图19

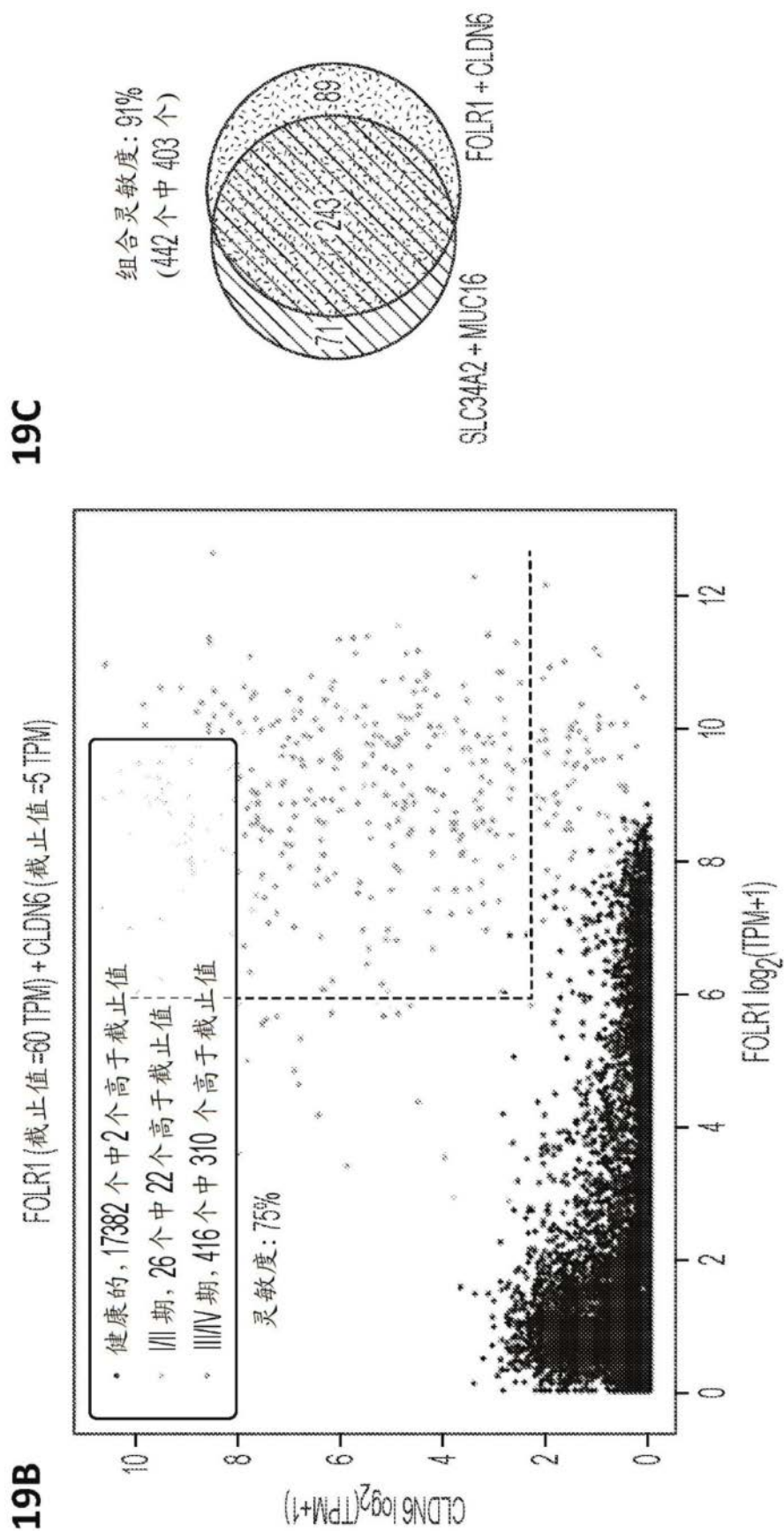


图19(续)

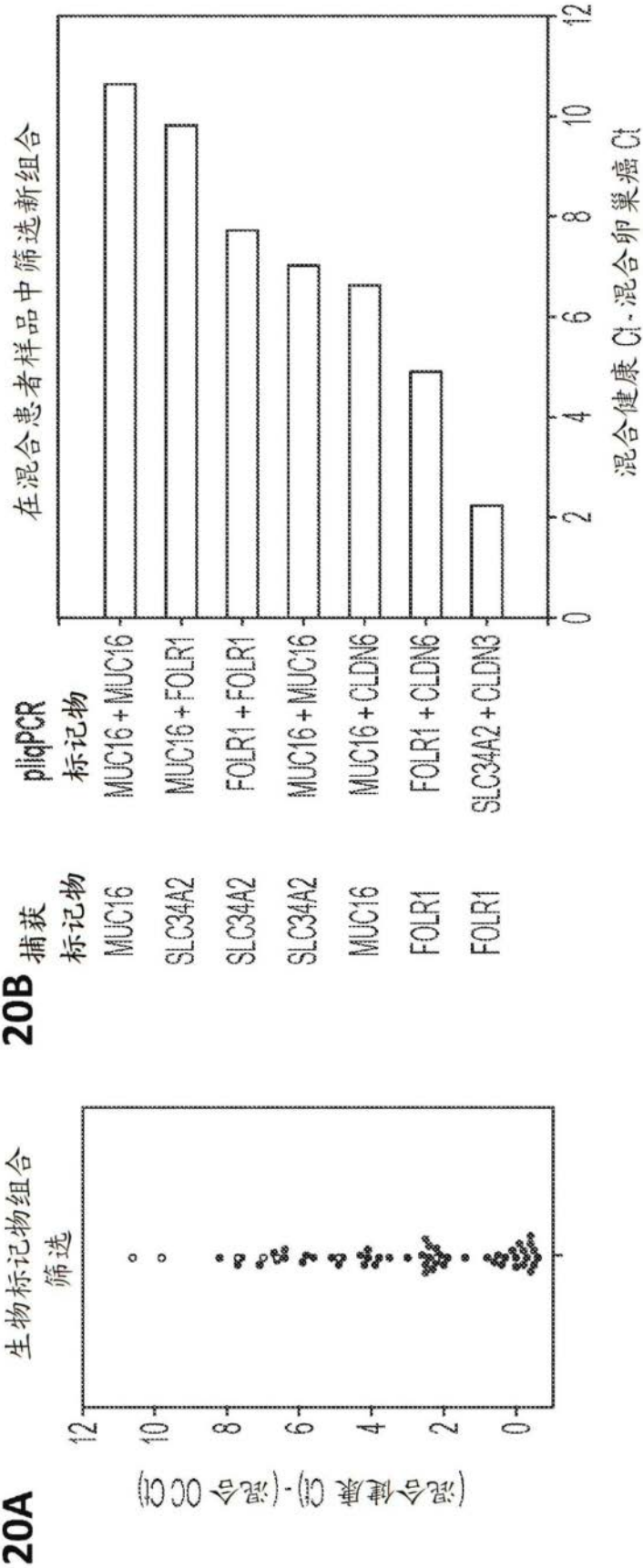


图20

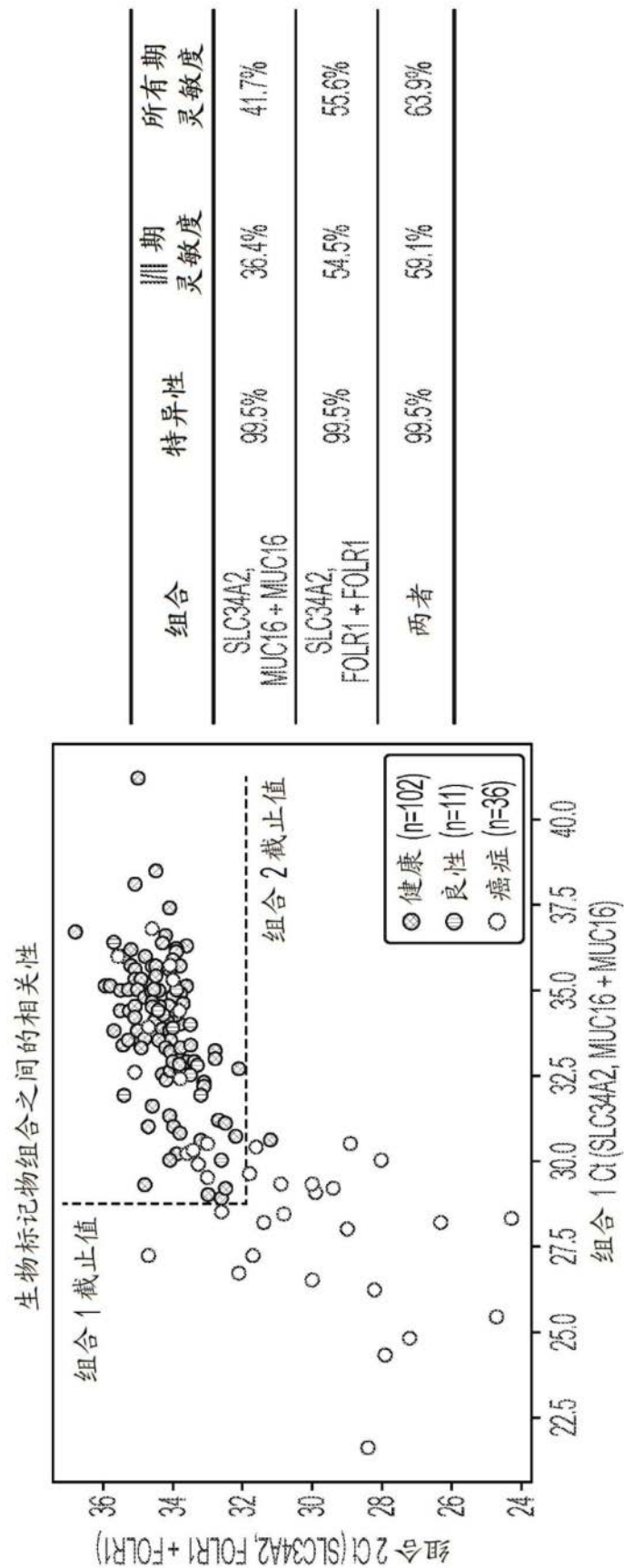


图21

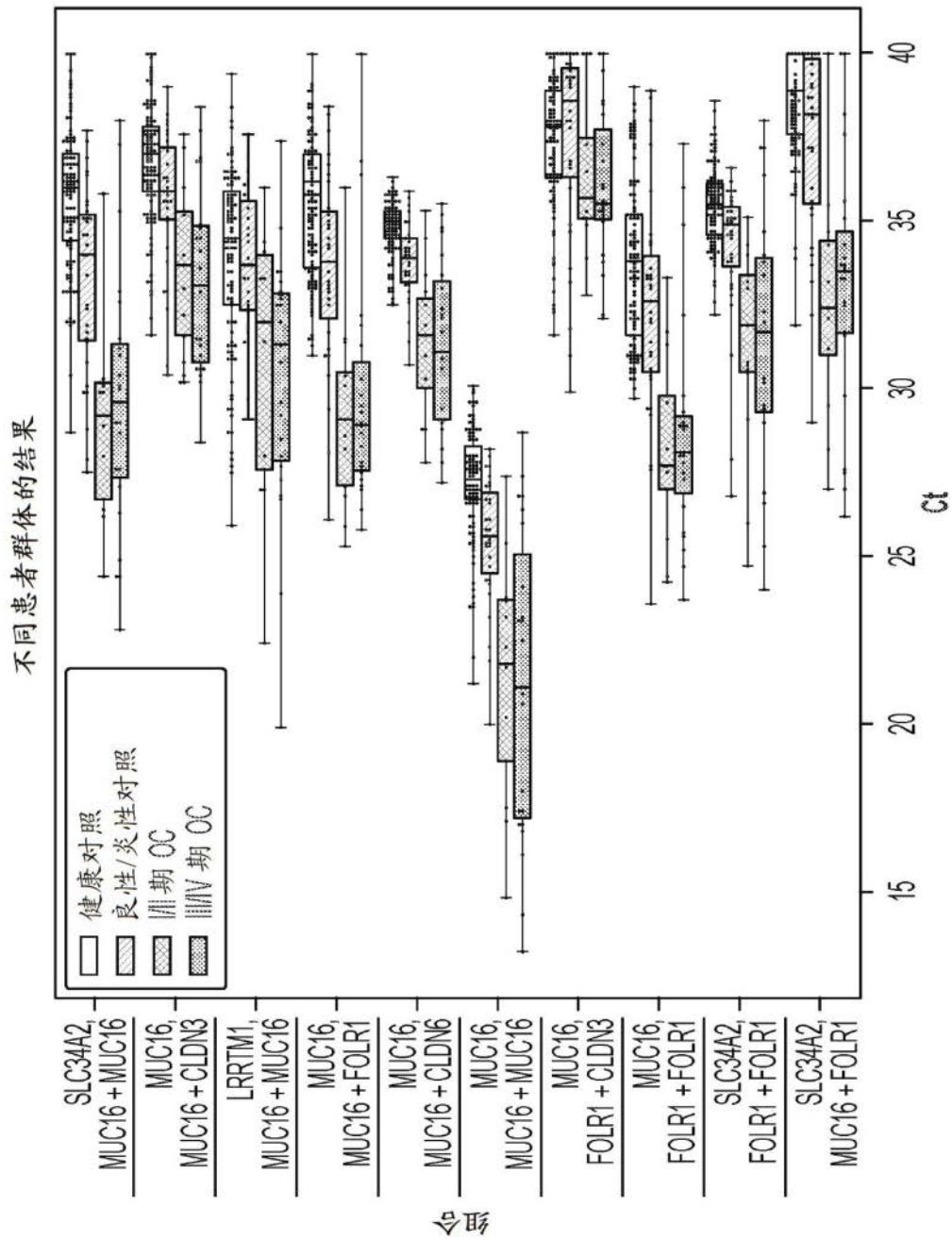


图22

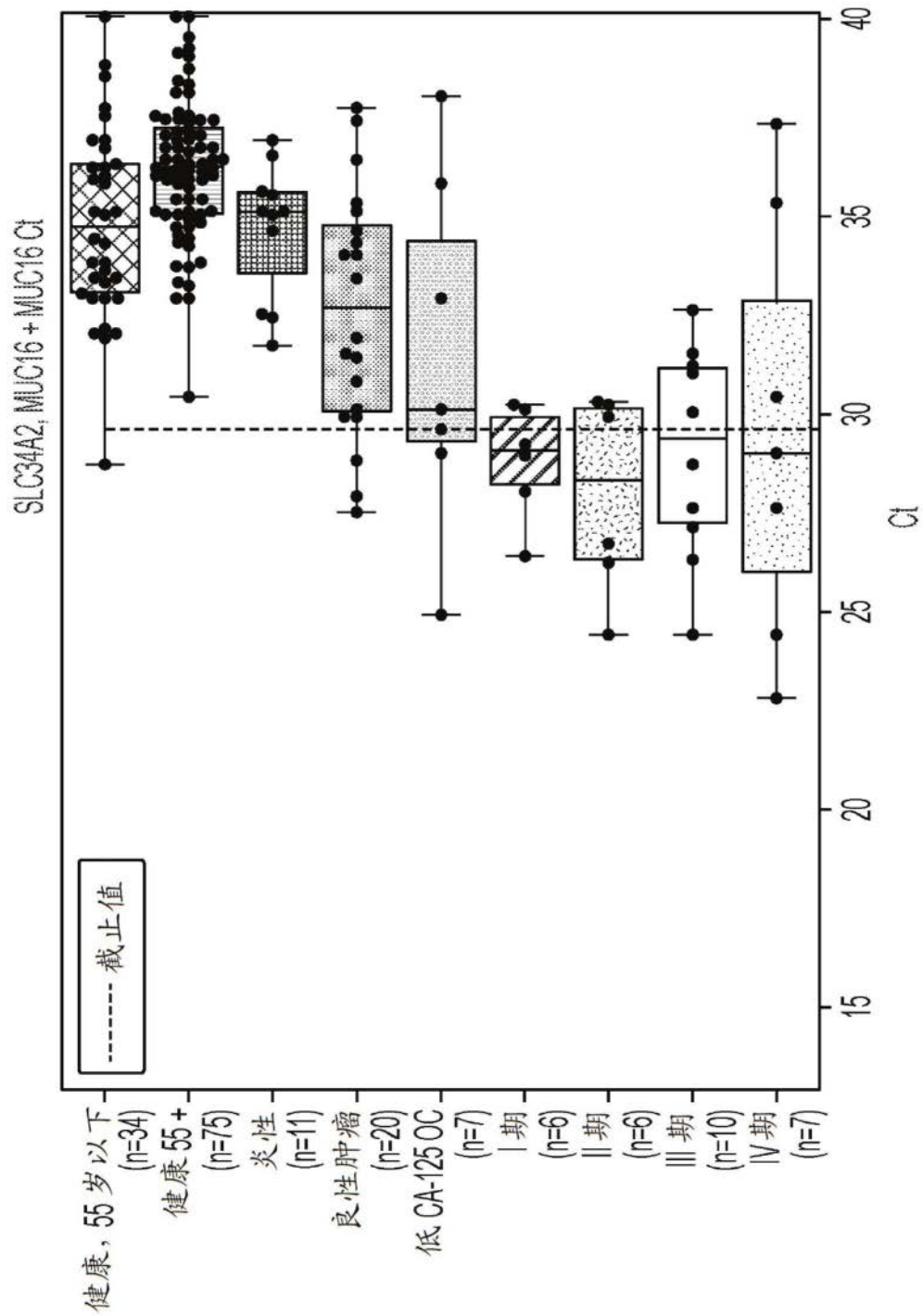


图23

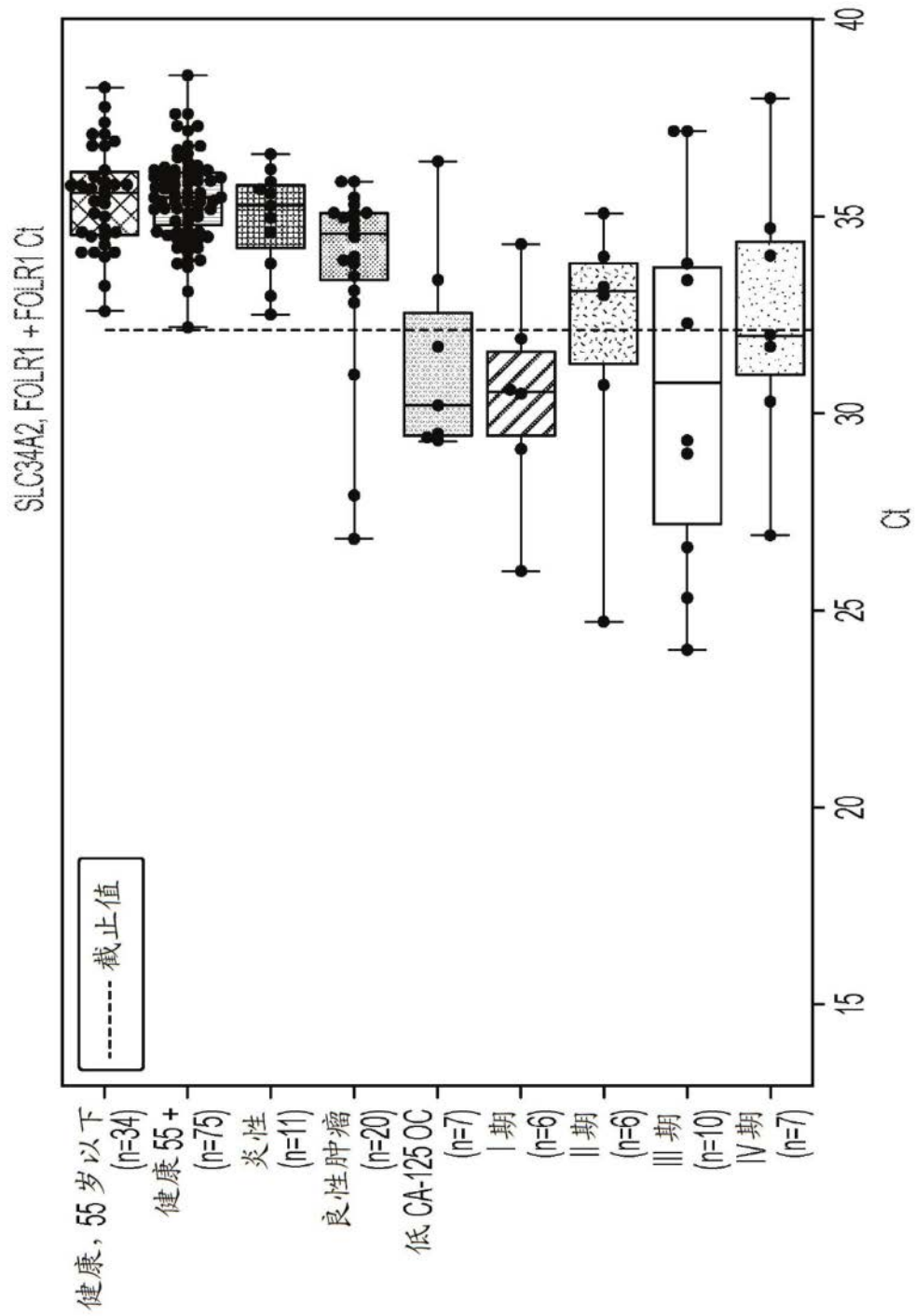


图24

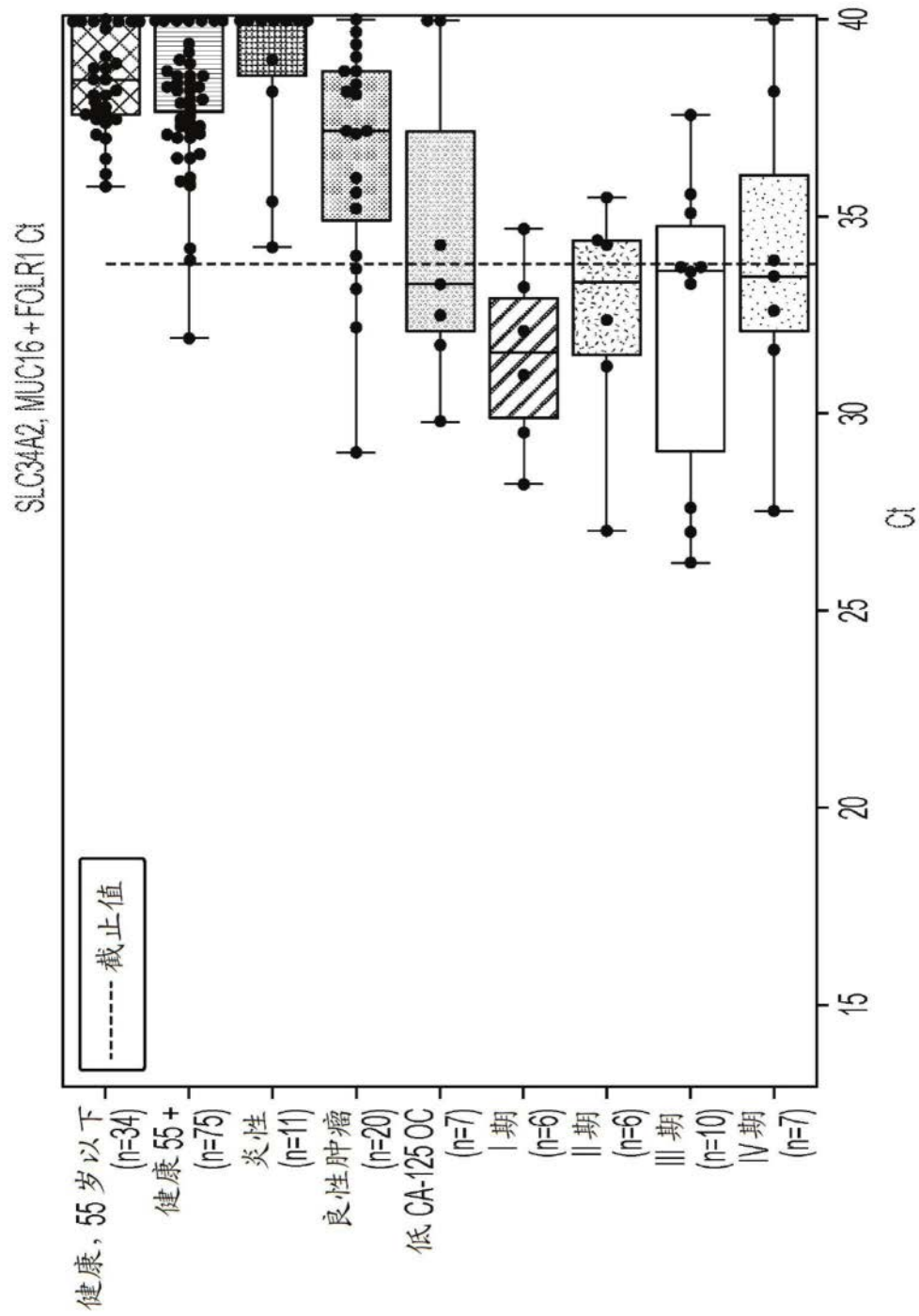


图25

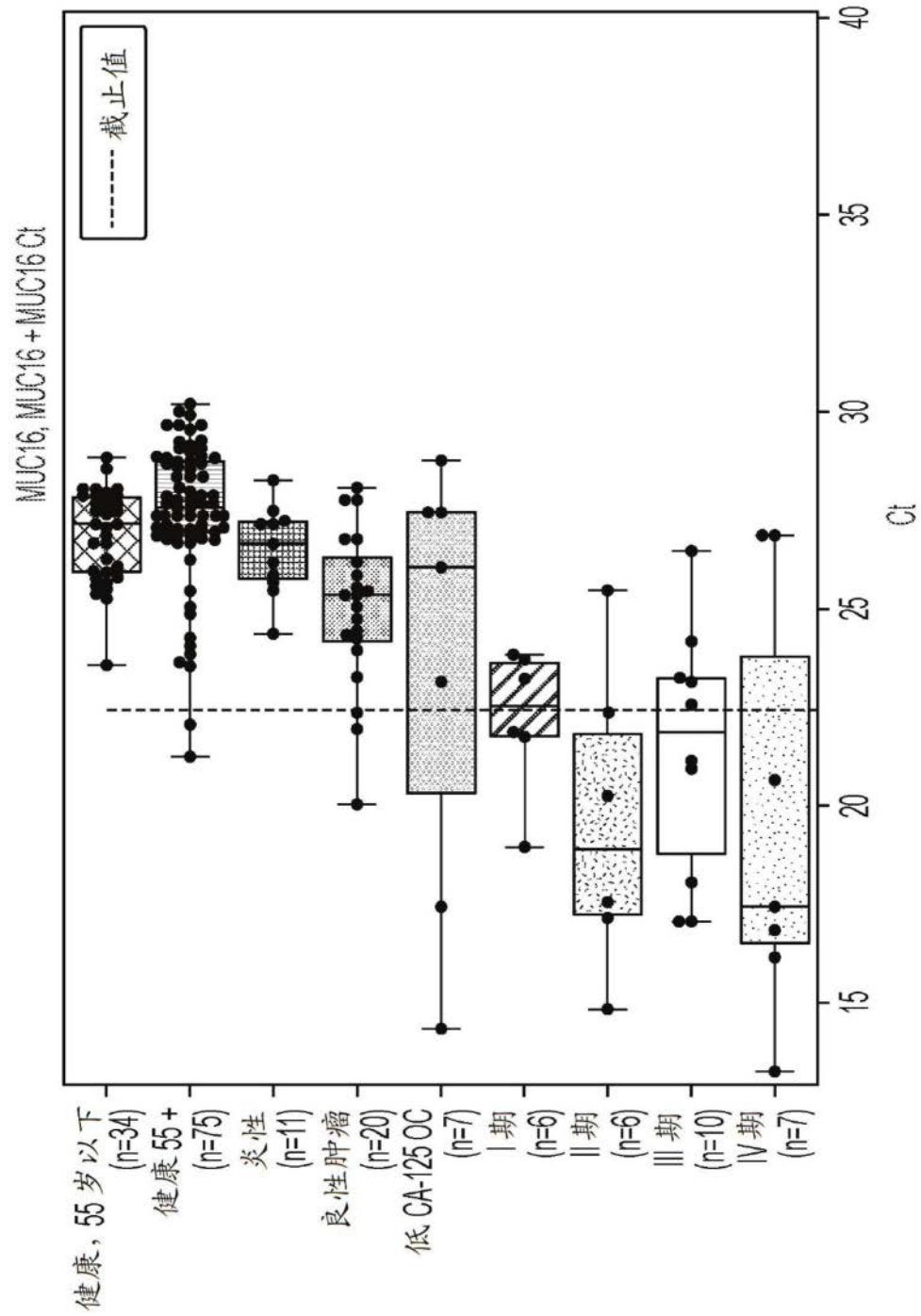


图26

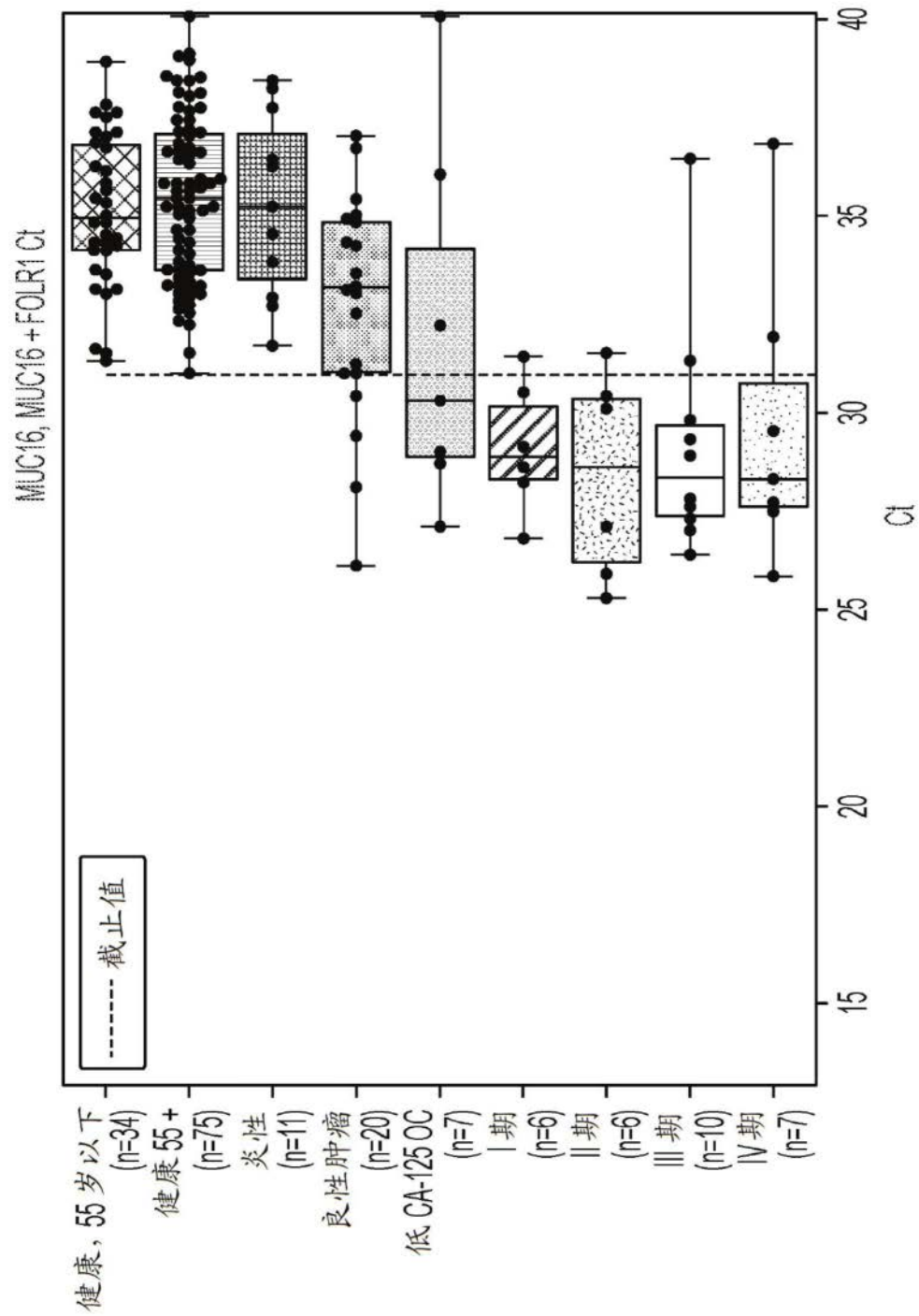


图27

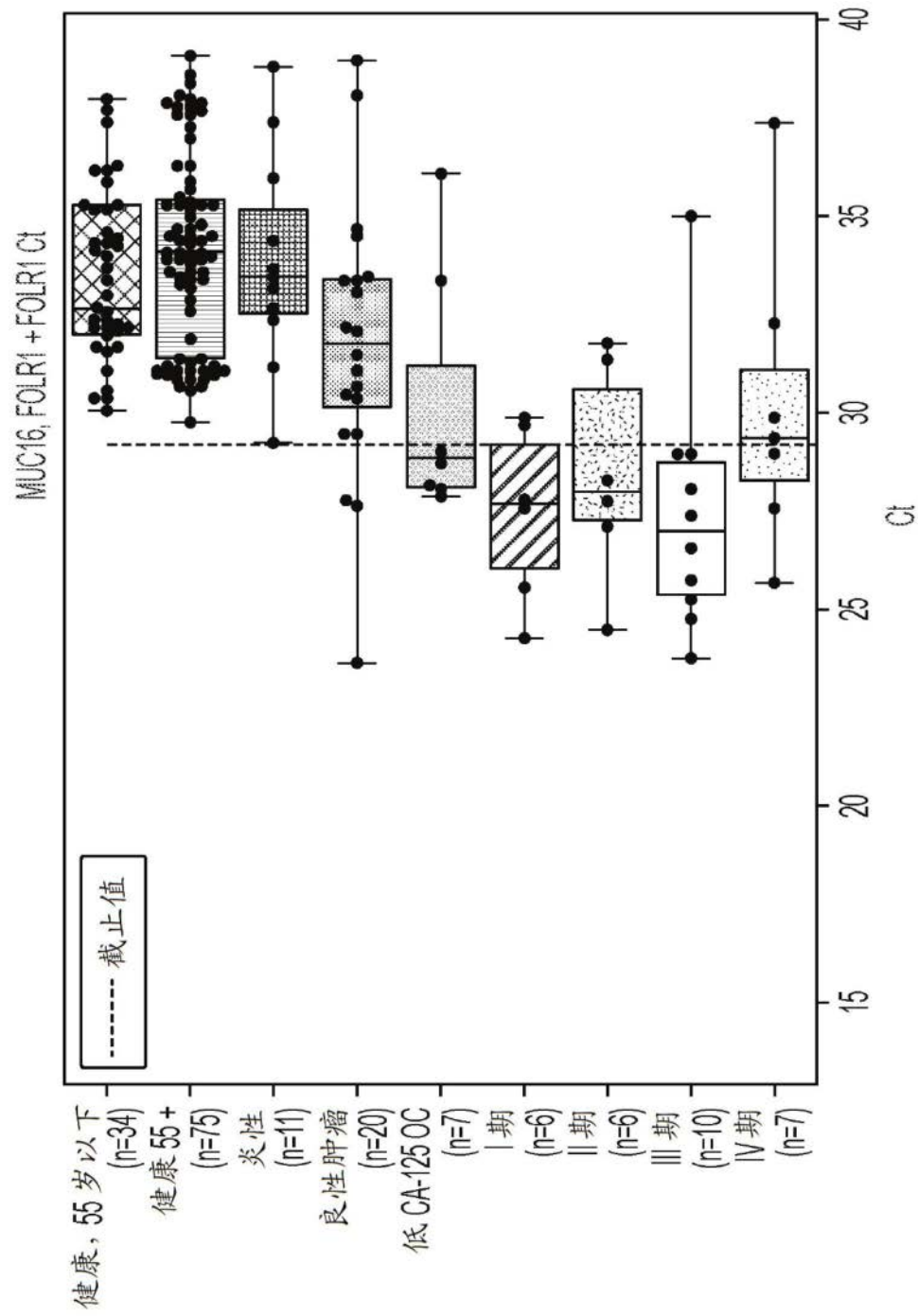


图28

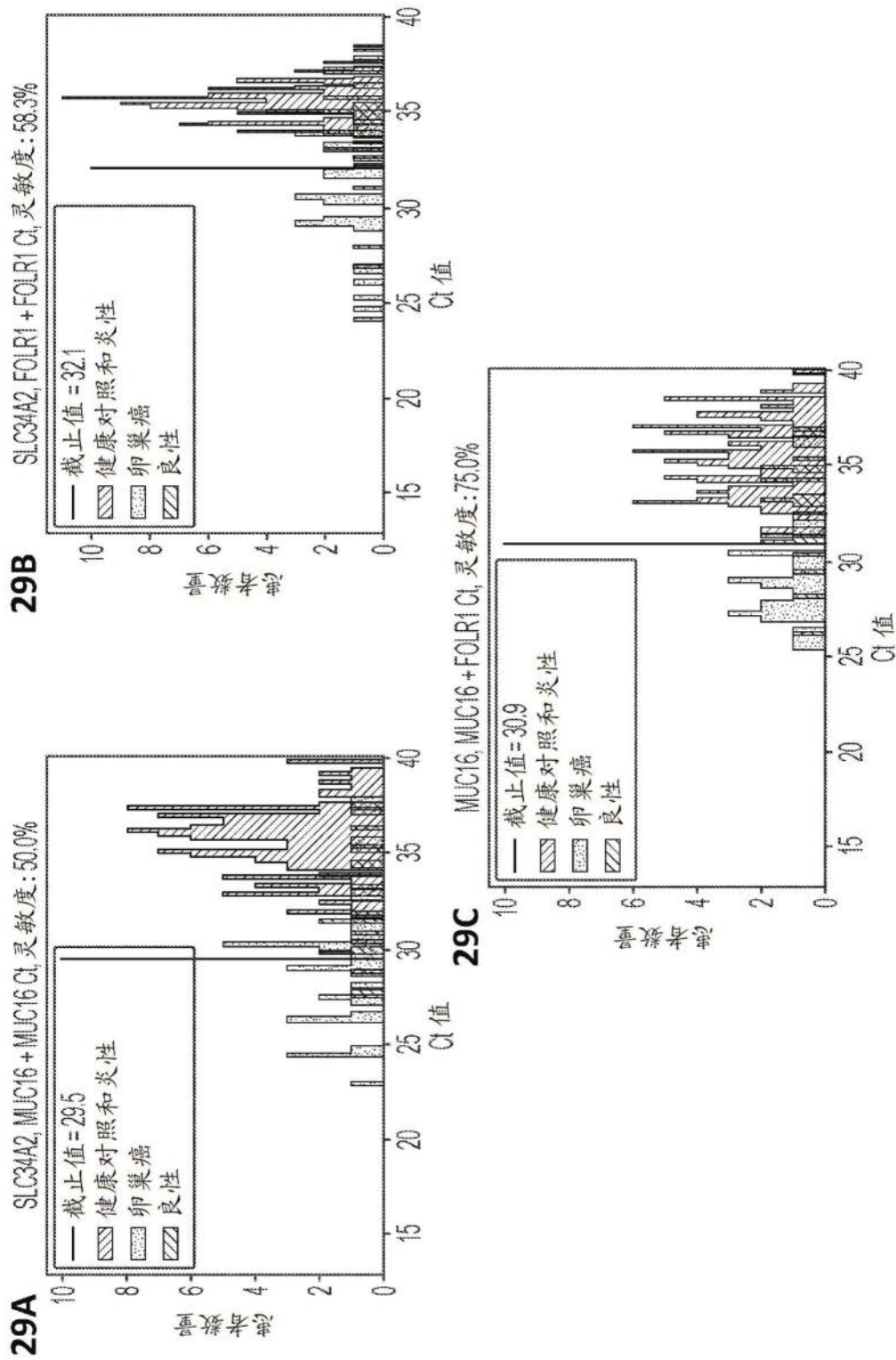


图29

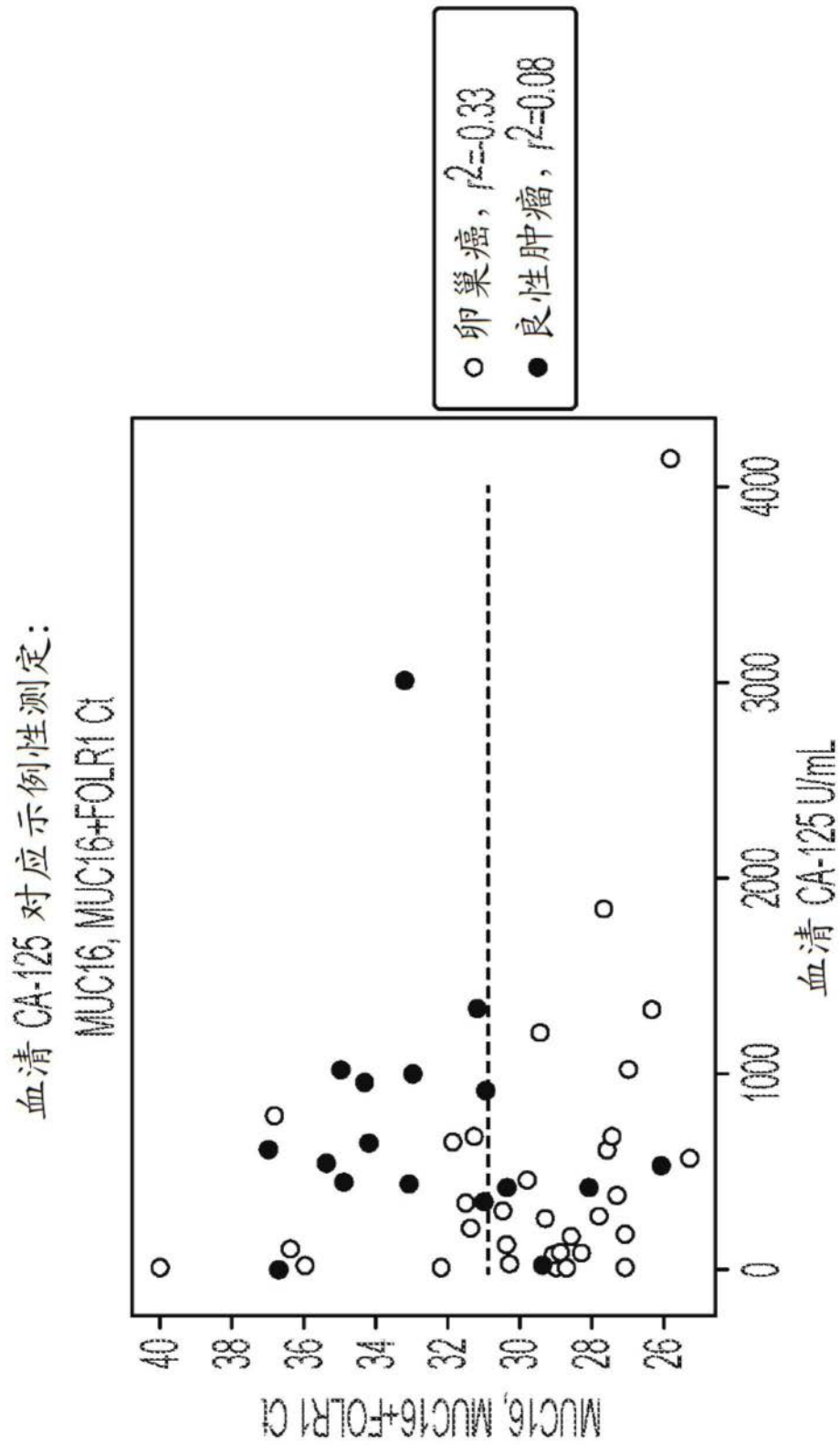


图30

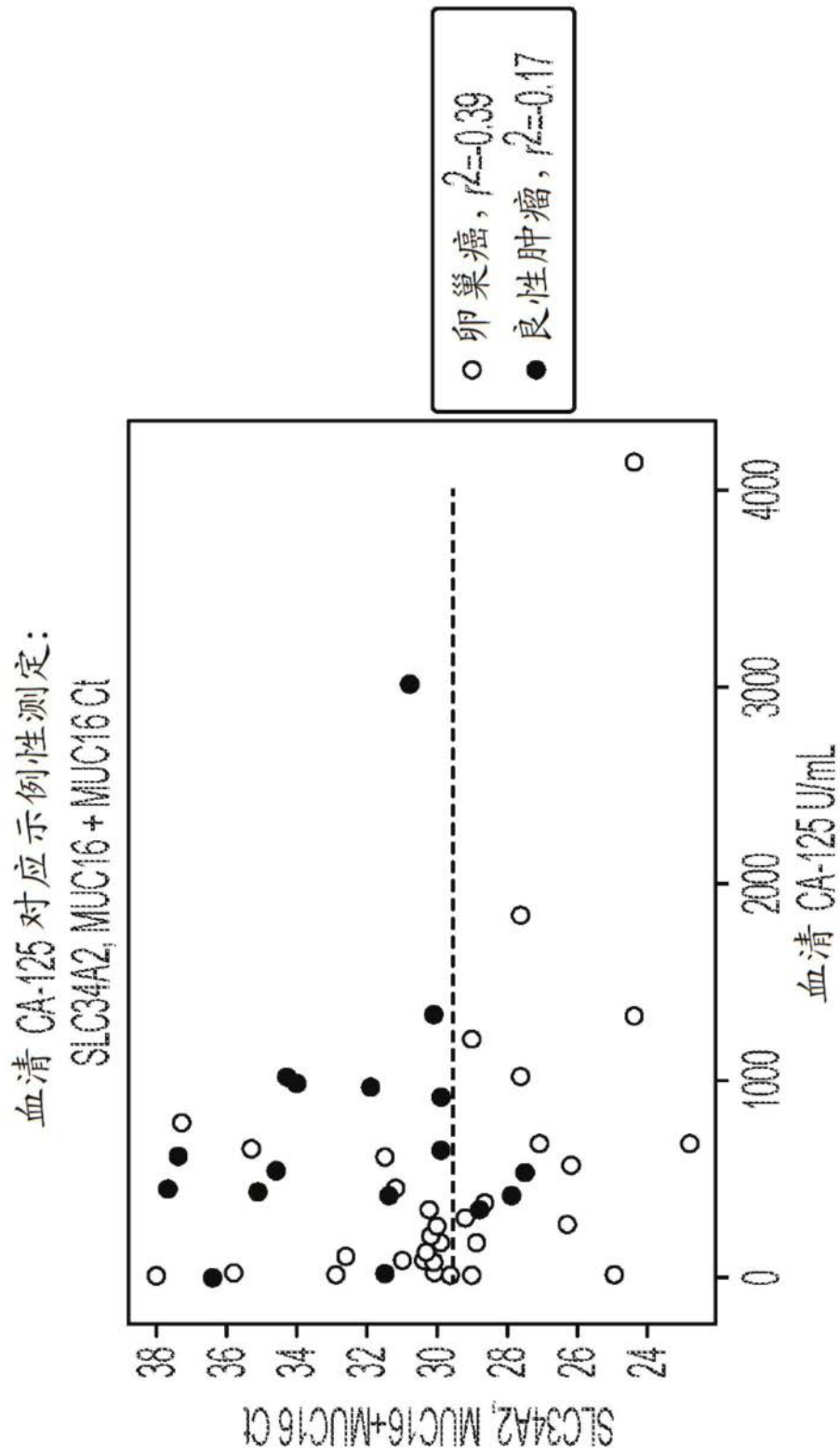


图31

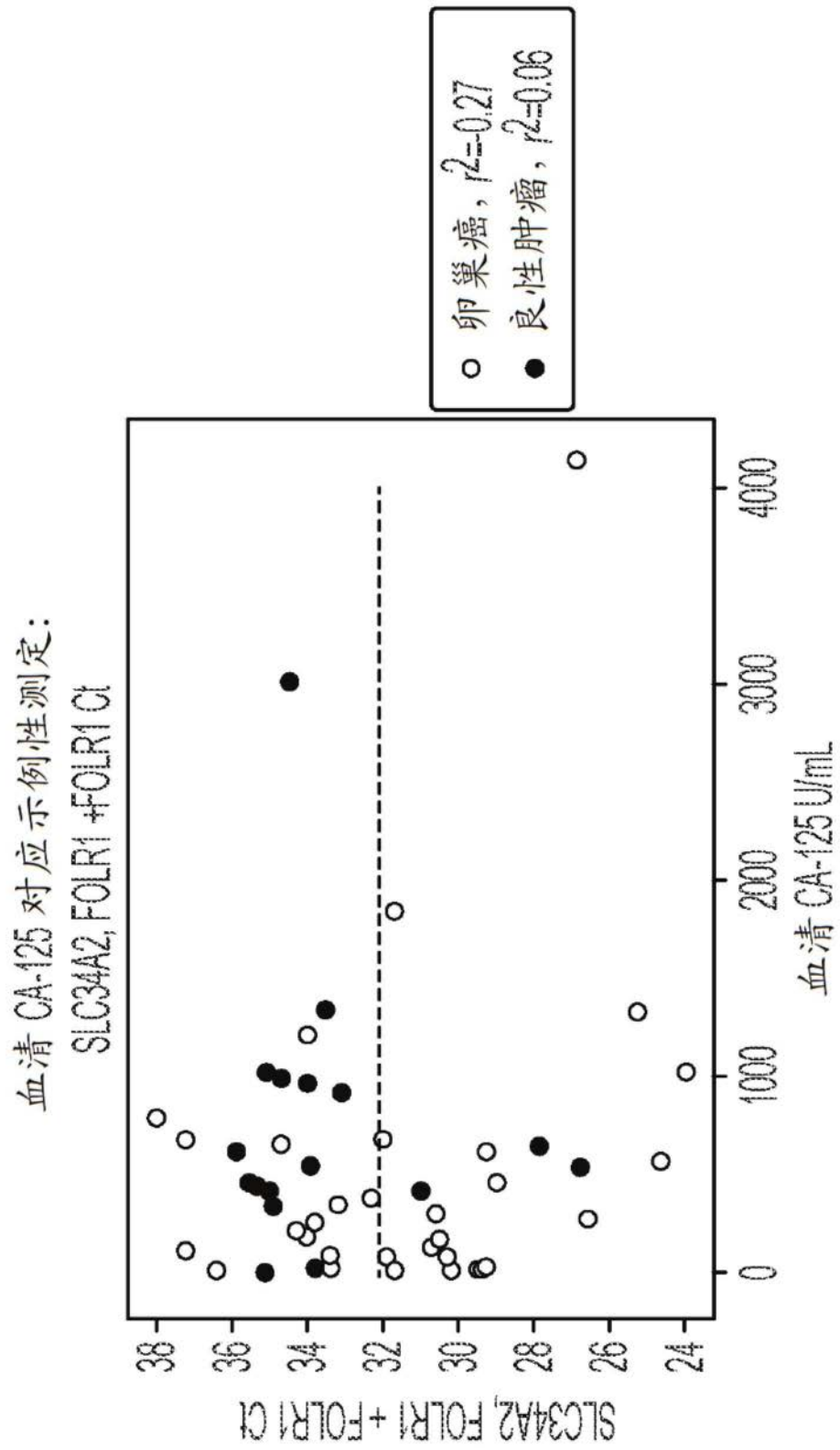


图32

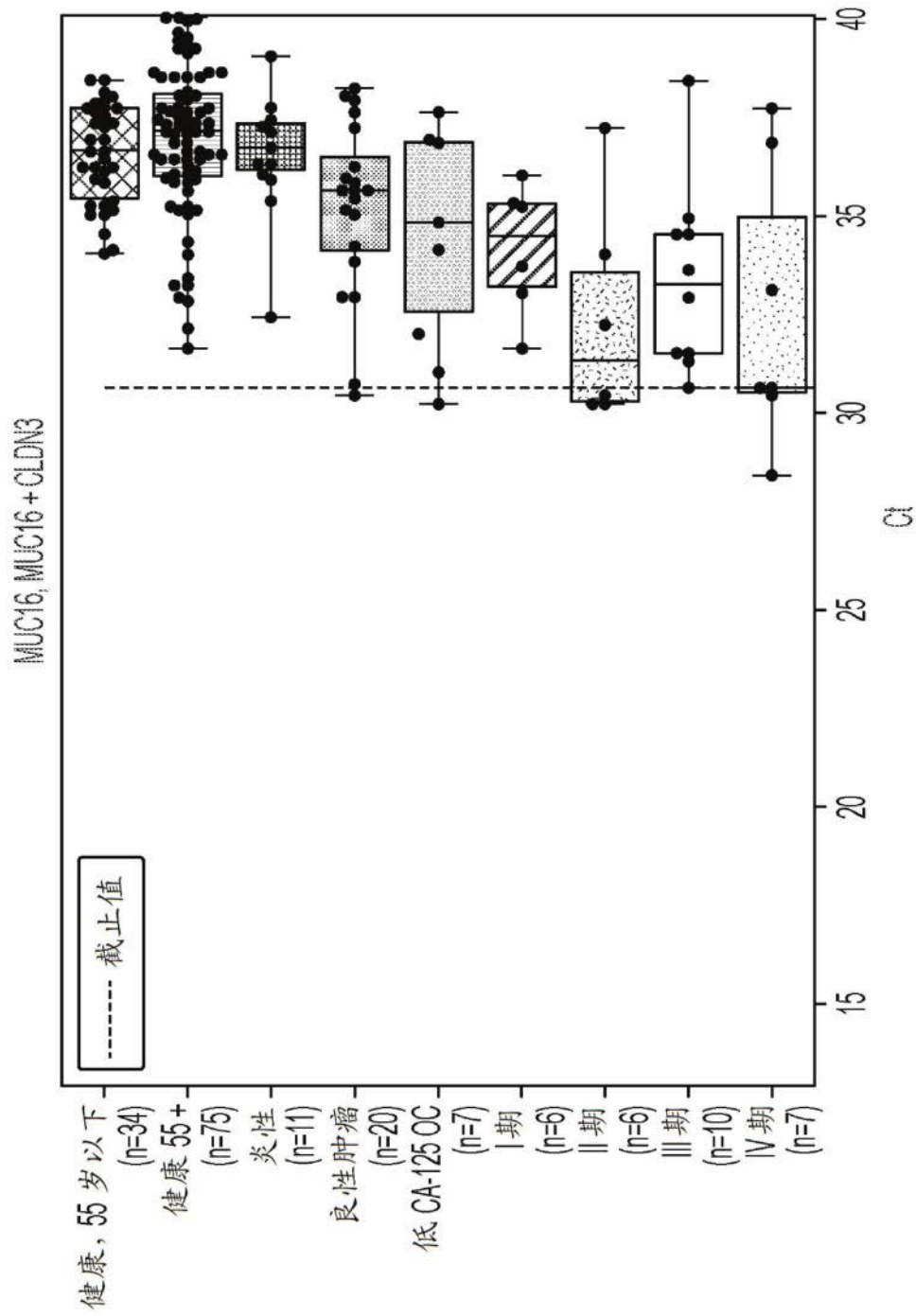


图33

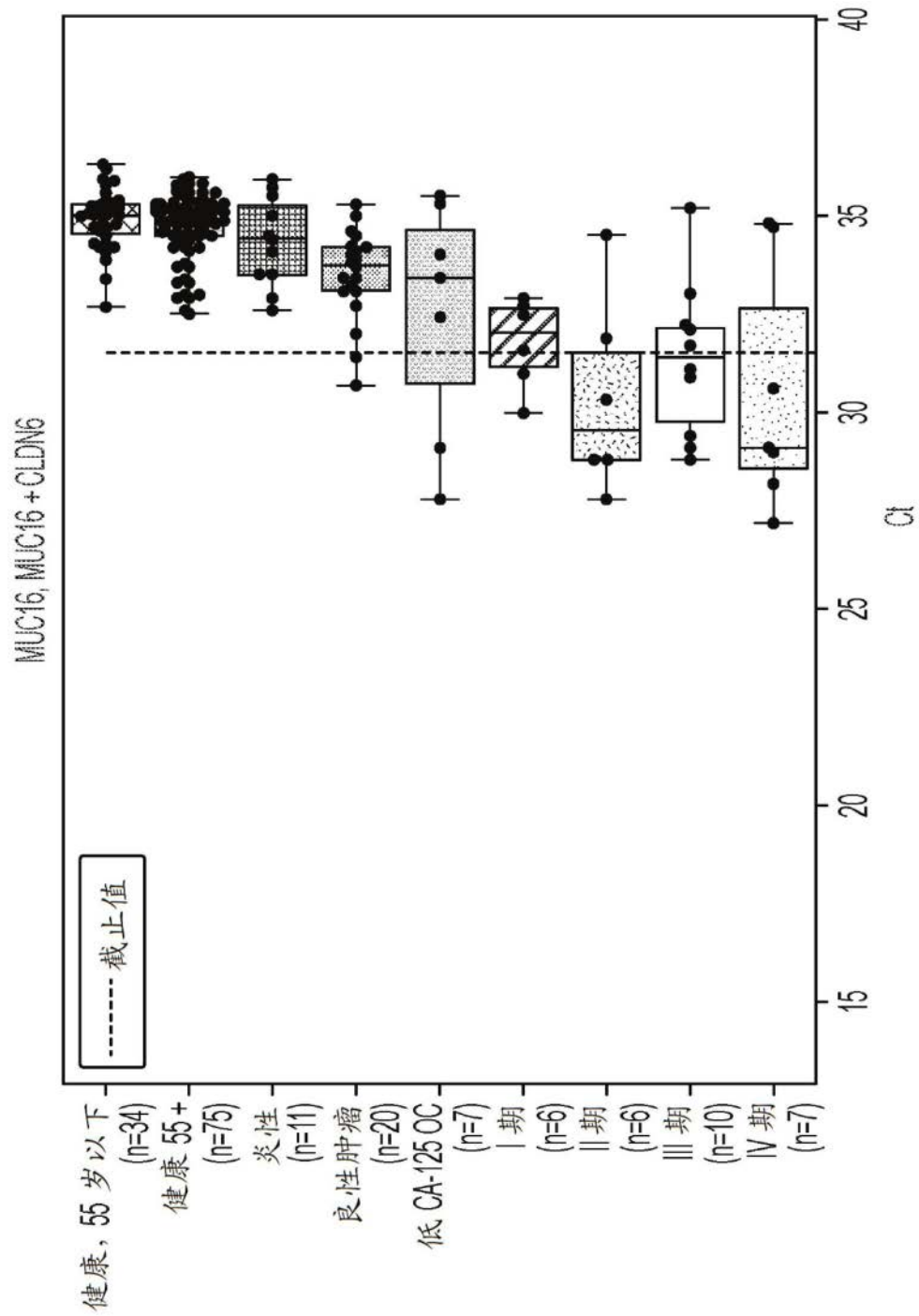


图34

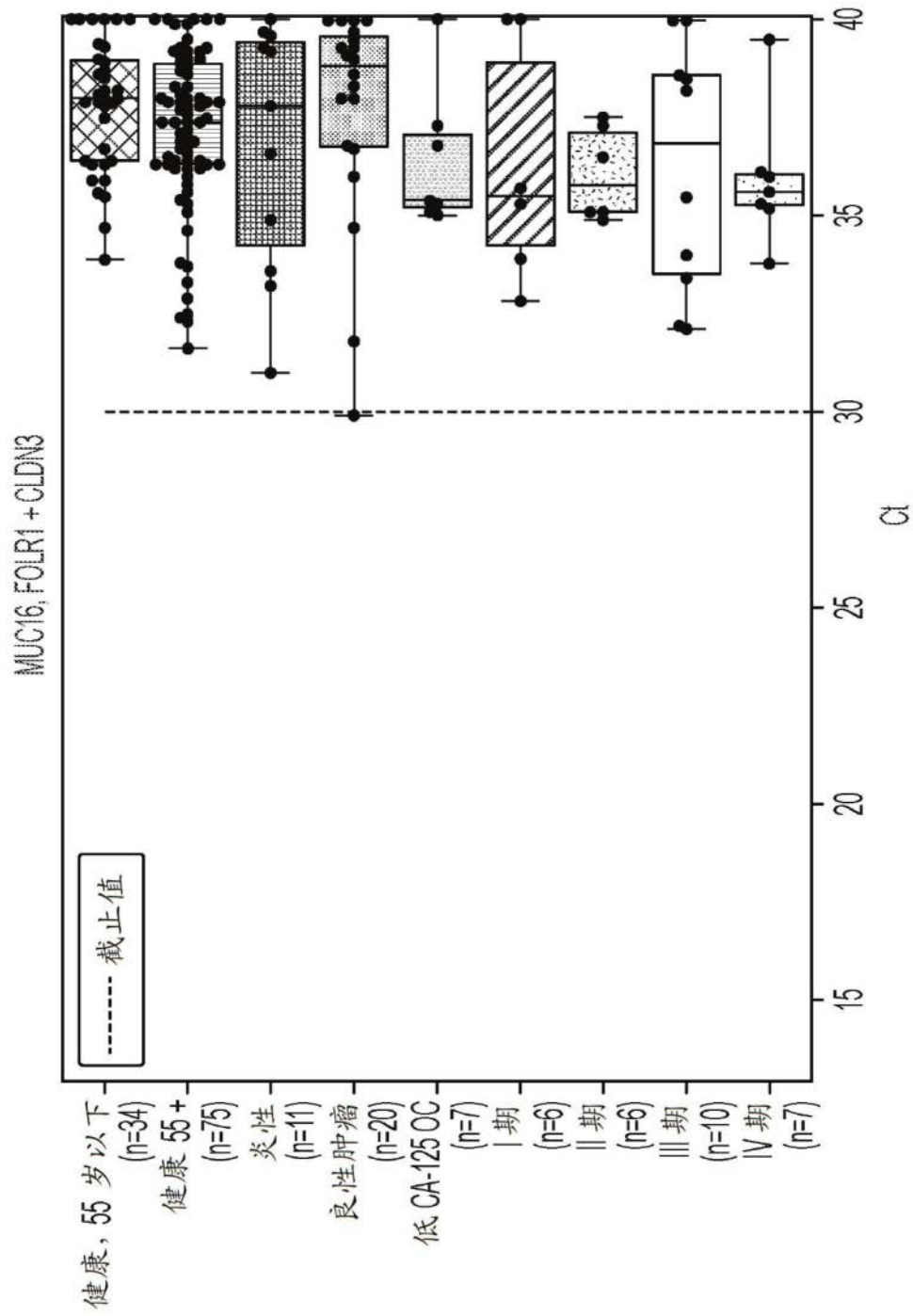


图35

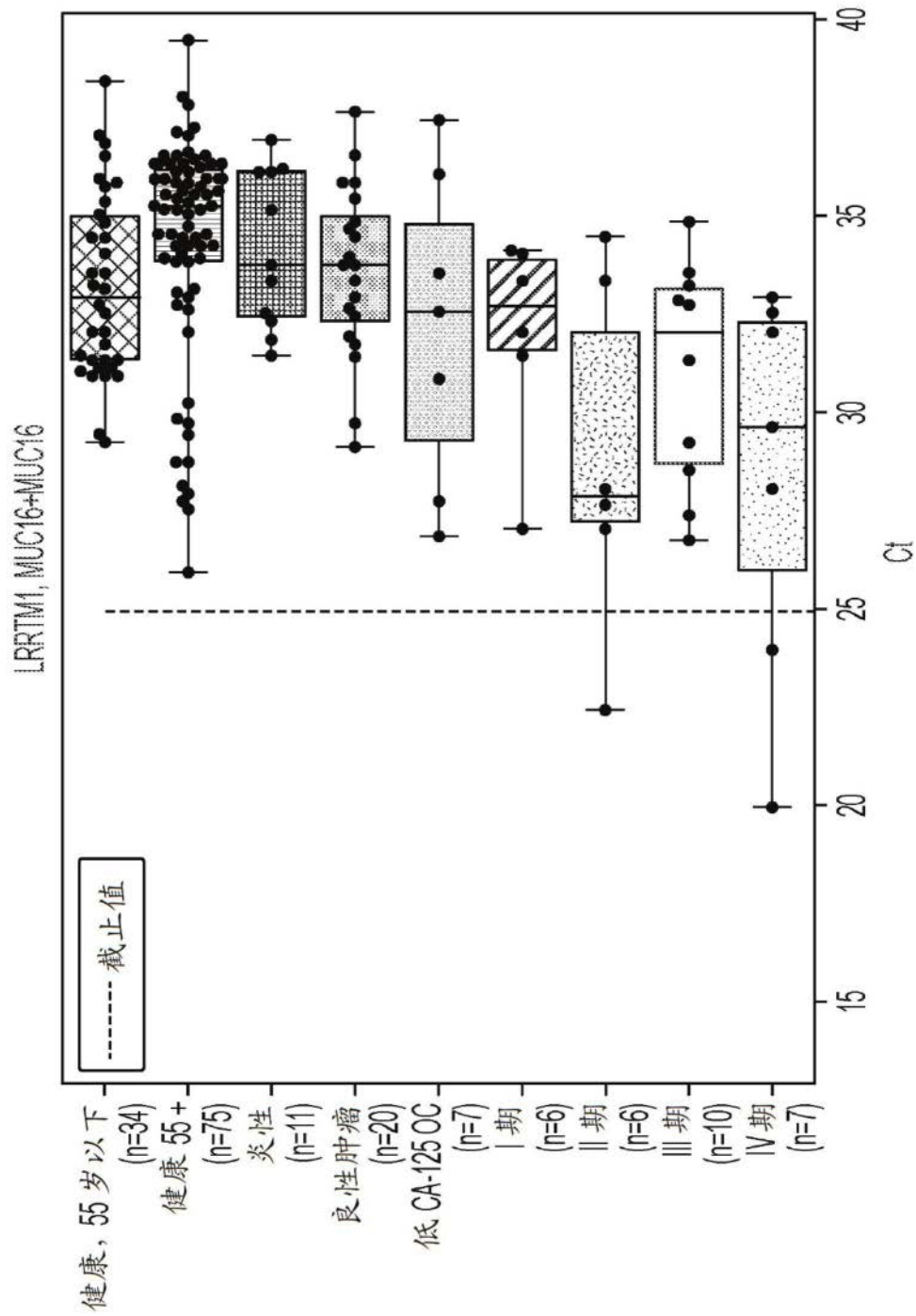


图36

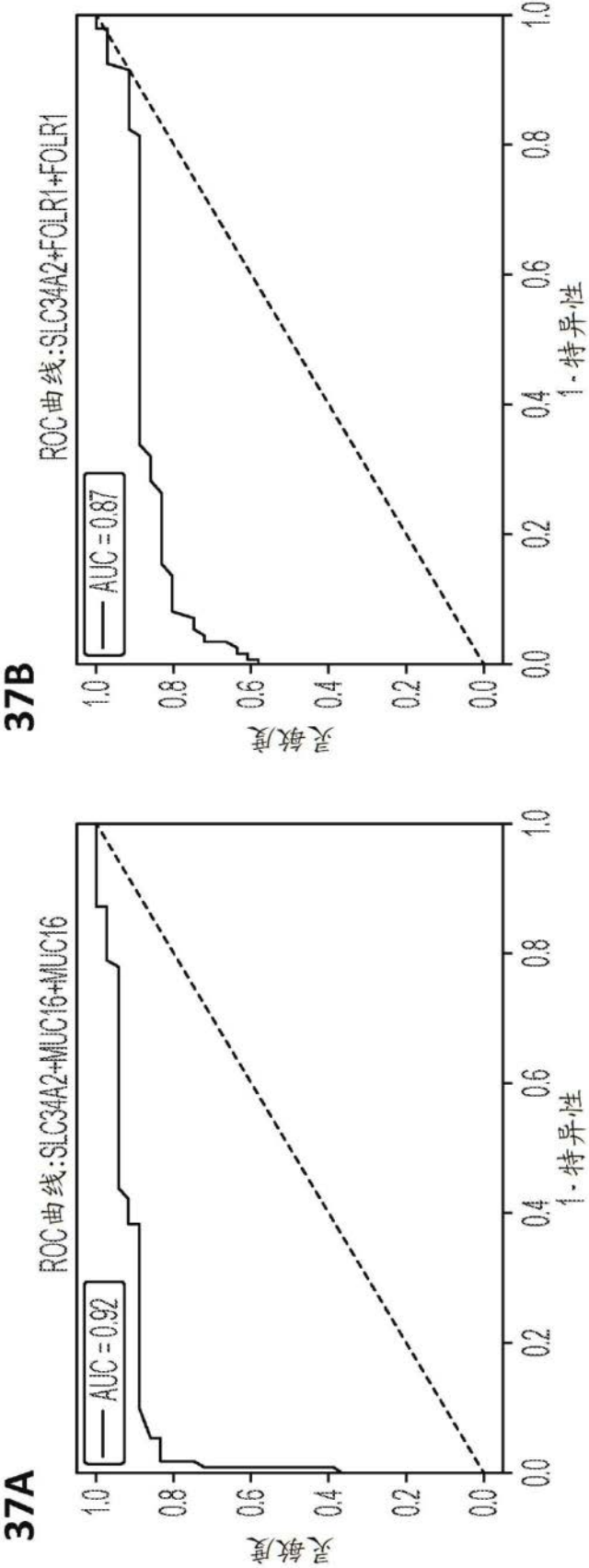


图37

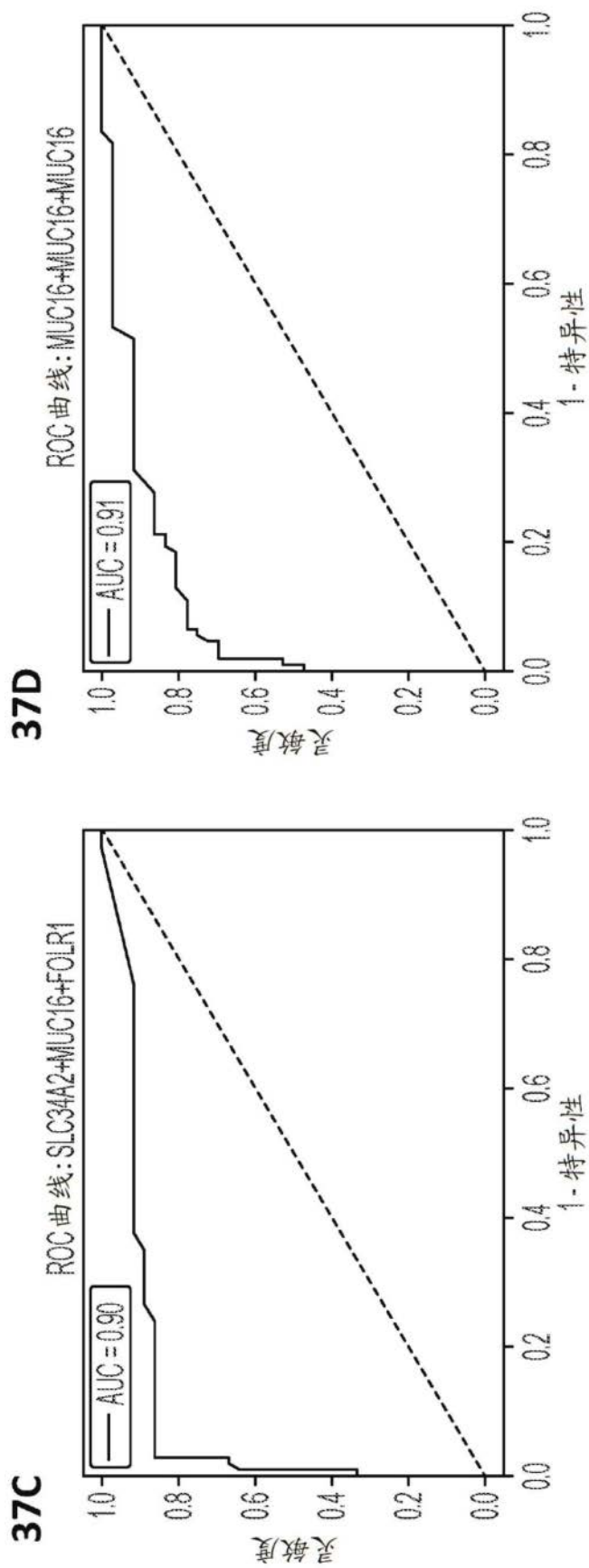


图37(续)

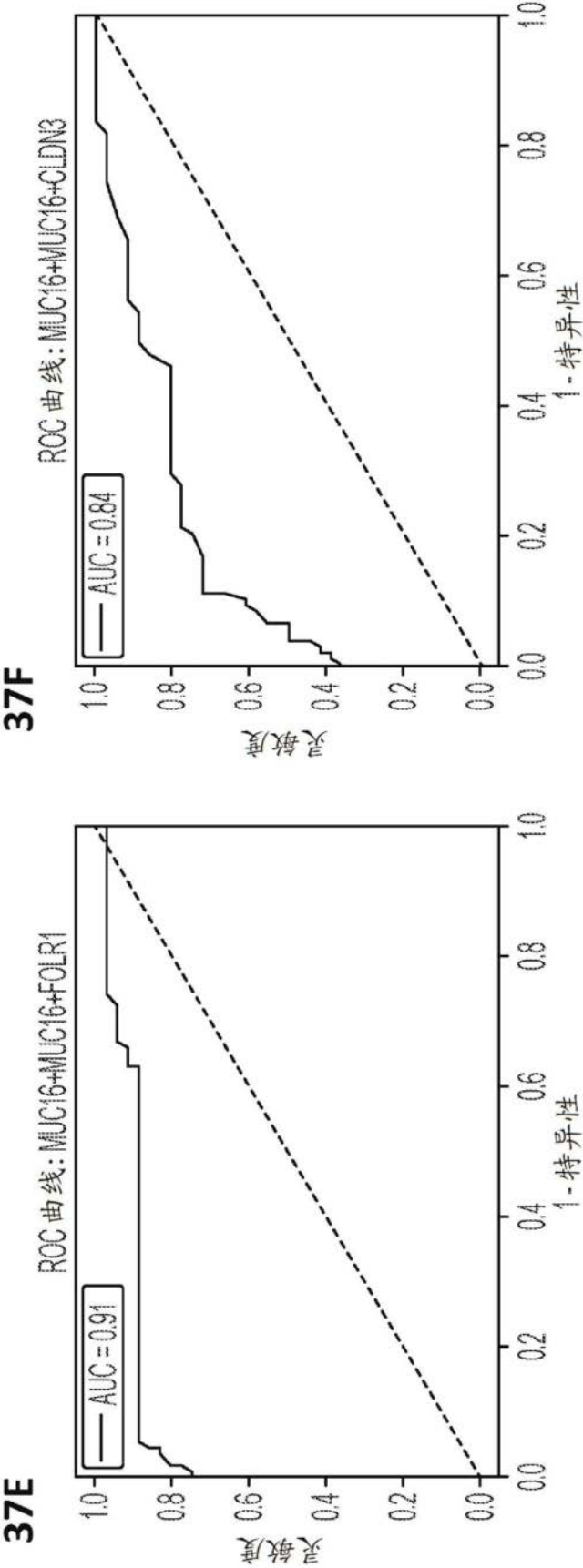


图37(续)

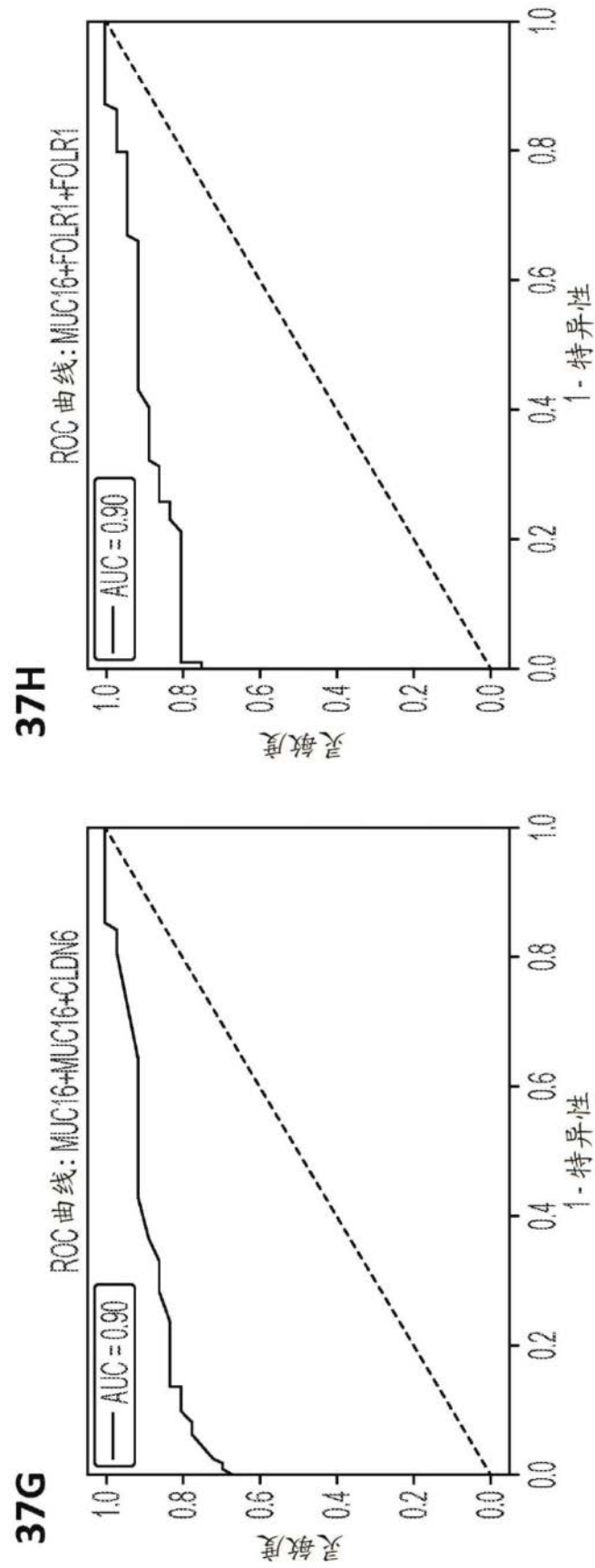


图37(续)

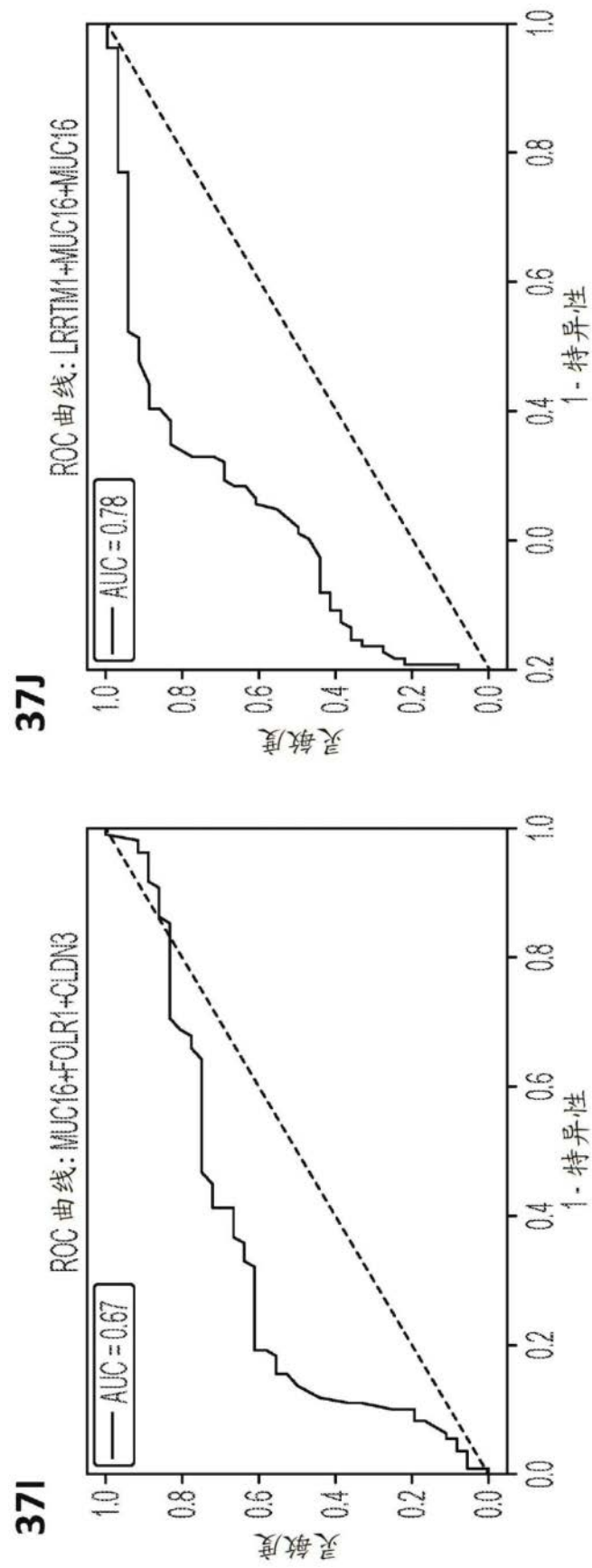
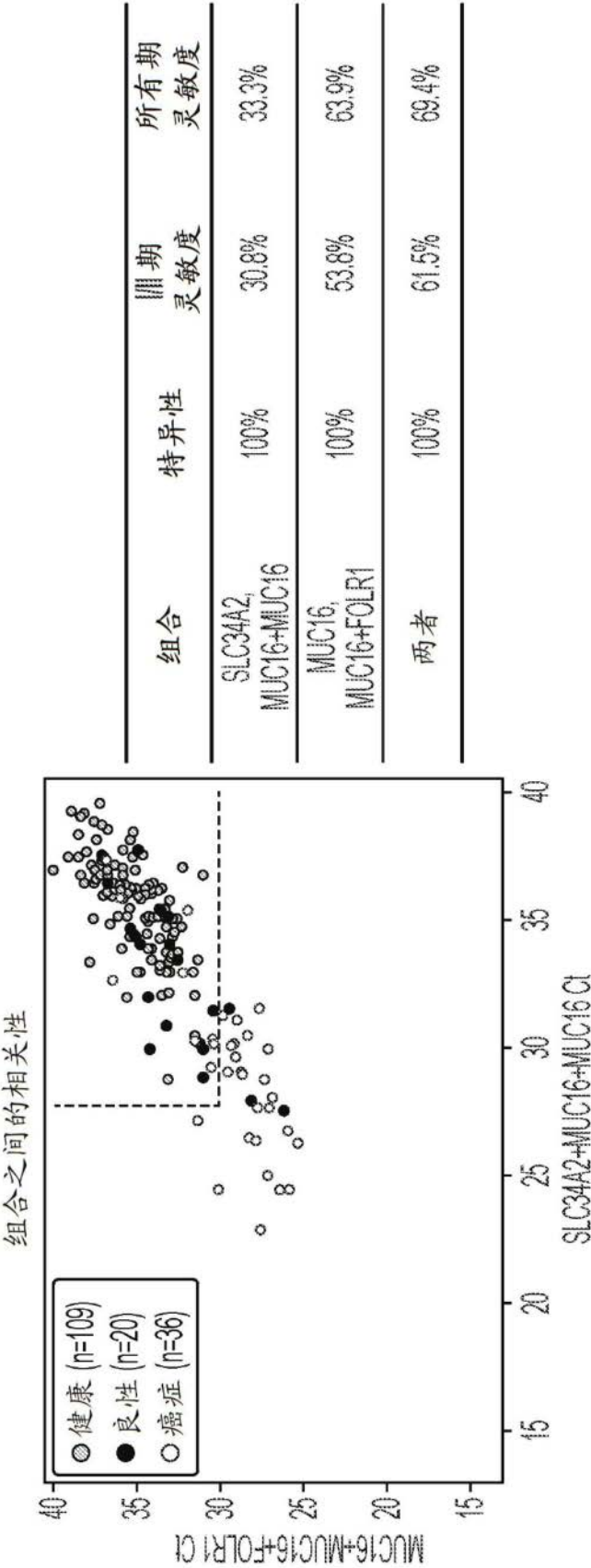


图37(续)



| 组合                      | 特异性  | III期<br>灵敏度 | 所有期<br>灵敏度 |
|-------------------------|------|-------------|------------|
| SLC34A2,<br>MUC16+MUC16 | 100% | 30.8%       | 33.3%      |
| MUC16,<br>MUC16+FOLR1   | 100% | 53.8%       | 63.9%      |
| 两者                      | 100% | 61.5%       | 69.4%      |

图38

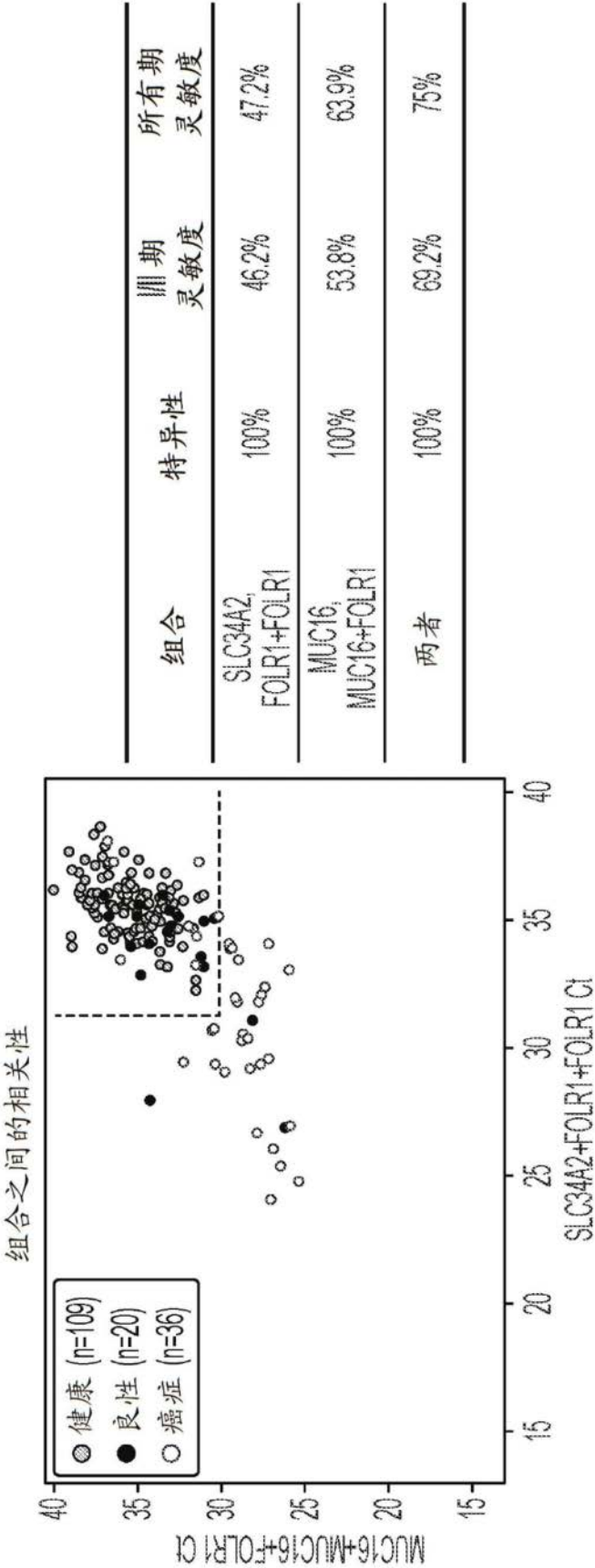


图39