

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-504786
(P2025-504786A)

(43)公表日 令和7年2月19日(2025.2.19)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/686(2018.01)	C 1 2 Q 1/686	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/6813(2018.01)	C 1 2 Q 1/6813	Z
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z
G 0 1 N 33/574(2006.01)	G 0 1 N 33/574	B

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全296頁)			
(21)出願番号	特願2024-540924(P2024-540924)	(71)出願人	521375346
(86)(22)出願日	令和5年1月6日(2023.1.6)		マーシー バイオアナリティクス, イン
(85)翻訳文提出日	令和6年9月4日(2024.9.4)		コーポレイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2023/010358		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1
(87)国際公開番号	WO2023/133299		7 6 0, ネイティック, ストラスモア
(87)国際公開日	令和5年7月13日(2023.7.13)		ロード 2 2
(31)優先権主張番号	63/297,684	(74)代理人	100078282
(32)優先日	令和4年1月7日(2022.1.7)		弁理士 山本 秀策
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413
(31)優先権主張番号	63/417,299		弁理士 森下 夏樹
(32)優先日	令和4年10月18日(2022.10.18)	(74)代理人	100181674
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 飯田 貴敏
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ	(74)代理人	100181641
	最終頁に続く		弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肺がんの検出のための組成物および方法

(57)【要約】

本開示は、一態様では、肺がんの検出、特に、肺がんの早期検出のための技術を提供する。別の態様では、本明細書に提供される技術は、肺がんを有するか、もしくはそれに罹患しやすいと決定された対象に投与される処置を選択するため、および／またはモニタリングするため、および／またはその有効性を評価するために有用である。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、例えば、治療薬と併せて腫瘍負荷および腫瘍負荷の変化を測定することによるコンパニオン診断の開発のために有用である。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、例えば、治療応答と関連する対象の体液試料（例えば、血液由来試料）中のバイオマーカーを同定することによるコンパニオン診断の開発のために有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 対象から生体試料を提供するまたは得るステップ；

(b) 前記生体試料において、約 30 nm～約 1000 nm の範囲内のサイズを有し、第 1 の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子（「第 1 の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子」）を検出するステップであって、前記第 1 の標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも 1 つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに

表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内 RNA バイオマーカーからなる群から選択される少なくとも 1 つの標的バイオマーカー

10

を含み、

前記表面バイオマーカーが、

【化 157】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274,

CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1,

HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、

MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN,

PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn

20

抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1,

CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2,

NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2,

RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP,

TMPRSS11D,

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア 1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトトリアオシルセラミド (Lc3)、フォルスマン抗原、およびその組合せから選択され；

30

前記小胞内バイオマーカーが、

【化 158】

AOC1, C12orf45, CRABP2,

CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D,

S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA,

ZC3H11A,

40

およびその組合せから選択され；

前記小胞内 RNA バイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：

【化 159】

ABCC3, AOC1, ARSL,

B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1,

CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2,

EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4,

50

【化 1 6 0】

HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR,
 MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D,
 PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2,
 SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22,
 SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
 TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

およびその組合せによってコードされる RNA 転写物（例えば、mRNA 転写物）から選
 択される、ステップ；

（c）前記生体試料における前記第 1 の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子
 のレベルを示す試料情報を、第 1 の参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；

（d）前記生体試料が、前記第 1 の参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて
 、第 1 の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、肺
 がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして前記対象を分類するステップ
 を含む方法。

20

【請求項 2】

前記少なくとも 1 つの標的バイオマーカーが、前記表面バイオマーカーのうちの 1 つま
 たは複数から選択される場合に、前記選択された表面バイオマーカーおよび前記少なくと
 も 1 つのナノ粒子関連表面バイオマーカーが、異なる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記（b）および（c）のステップが、少なくとも第 2 の標的バイオマーカーシグネチャー
 について繰り返され、前記分類カットオフが、前記第 1 の参照閾値レベル、および前
 記少なくとも第 2 の標的バイオマーカーシグネチャーに対応する少なくとも第 2 の参照閾
 値レベルを参照する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、

30

【化 1 6 1】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5,
 CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3,
 ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1,
 MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2,
 シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8,
 CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2,
 NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B,
 ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

40

シアリル-6 T 抗原（6-シアリルコア 1）、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis
 A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトリアオシ
 ルセラミド（Lc3）、フォルスマン抗原、もしくはその組合せであるか、またはそれ
 を含む、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記第 1 および／または第 2 の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも 1 つの

50

ナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

前記少なくとも2つの標的バイオマーカーが、以下の組合せ：

- －少なくとも2つの別個の表面バイオマーカー；
- －少なくとも2つの別個の小胞内バイオマーカー；
- －少なくとも2つの別個の小胞内RNAバイオマーカー；
- －表面バイオマーカーおよび小胞内バイオマーカー；
- －表面バイオマーカーおよび小胞内RNAバイオマーカー；ならびに
- －小胞内バイオマーカーおよび小胞内RNAバイオマーカー

10

のうちの1つを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

(a) 対象から生体試料を提供するまたは得るステップ；

(b) 前記生体試料において、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有し、第1の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子（「第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子」）を検出するステップであって、前記第1の標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに

少なくとも1つの標的バイオマーカーであって、前記標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーであるか、またはそれを含み、前記標的バイオマーカーシグネチャーが、表4Aまたは4Bに列挙されるバイオマーカーの組合せを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカー

20

を含む、ステップ；

(c) 前記生体試料における前記第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、第1の参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；

(d) 前記生体試料が、前記第1の参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして前記対象を分類するステップを含む方法。

30

【請求項8】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原および／もしくはMUC1であるか、またはそれを含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

前記第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、(i) sTn抗原もしくはMUC1であるか、またはそれを含む、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに(ii) 表面バイオマーカーまたは小胞内RNAバイオマーカーであり得る、CEACAM5、CEACAM6、MUC1、シアリルLewis X、Lewis Y、およびその組合せから選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項10】

前記第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、(i) sTn抗原もしくはMUC1であるか、またはそれを含む、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに(ii) そのそれぞれが表面バイオマーカーまたは小胞内RNAバイオマーカーであり得る、CEACAM5、CEACAM6、MUC1、シアリルLewis X、Lewis Y、およびその組合せから選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、(i) sTn抗原であるか、またはそれを含む、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、なら

50

びに (i i) そのそれぞれが表面バイオマーカーまたは小胞内 R N A バイオマーカーであり得る、M U C 1、C E A C A M 5、C E A C A M 6、およびその組合せから選択される少なくとも 2 つの標的バイオマーカー、あるいは (i) M U C 1 であるか、またはそれを含む、少なくとも 1 つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに (i i) C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、L e w i s Y、およびその組合せから選択される少なくとも 2 つの標的バイオマーカーを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記第 1 または第 2 の参照閾値レベルが、非がん対象の集団由来の比較可能な試料において観察される標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルによって決定される、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 3】

前記非がん対象の集団が、以下の対象集団：健康な対象、良性腫瘍と診断された対象、ならびに非肺関連疾患、障害、および／または状態を有する対象のうちの 1 つまたは複数を含む、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記生体試料が、サイズ排除クロマトグラフィーに供されて、ナノ粒子を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子が（例えば、前記生体試料から直接的に）単離される、請求項 1 ～ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記検出するステップが、捕捉アッセイを含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 6】

前記捕捉アッセイが、前記生体試料を、前記少なくとも 1 つのナノ粒子関連表面バイオマーカーに結合する標的捕捉部分を含む捕捉剤と接触させるステップを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

捕捉剤が、それらにコンジュゲートされた標的捕捉部分を含む固体基材であるか、またはそれを含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記固体基材が、磁気ビーズを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 1 9】

前記標的捕捉部分が、抗体剤であるか、またはそれを含む、請求項 1 6 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記検出するステップが、検出アッセイを含む、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記検出するステップが、捕捉アッセイおよび検出アッセイを含み、前記捕捉アッセイが、前記検出アッセイの前に行われる、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記第 1 および／または第 2 の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも 1 つの小胞内 R N A バイオマーカーを含む場合に、前記検出アッセイが、逆転写 q P C R を含む、請求項 2 0 ～ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 2 3】

前記第 1 および／または第 2 の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも 1 つの小胞内バイオマーカーを含む場合に、前記標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子が、前記検出アッセイの前に、固定および／または透過処理を含めて処理される、請求項 2 0 ～ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記第 1 および／または第 2 の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも 1 つの

50

表面バイオマーカーおよび／または小胞内バイオマーカーを含む場合に、前記検出アッセイが、免疫アッセイ（例えば、免疫PCR、および／または近接ライゲーションアッセイを含む）を含む、請求項20～23のいずれか一項に記載の方法。

【請求項25】

前記検出アッセイが、近接ライゲーションアッセイを含む、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記近接ライゲーションアッセイが、

（a）前記少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカーを発現する前記標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子（「ナノ粒子関連表面バイオマーカー発現ナノ粒子」）を、前記標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする検出プローブのセットと接触させるステップであって、そのセットが、前記ナノ粒子および前記検出プローブのセットを含む組合せが作成されるように、少なくとも2つの検出プローブを含み、

10

前記検出プローブが、

（i）前記標的バイオマーカーシグネチャーの前記標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに

（ii）前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、ステップ；

20

（b）前記組合せを、前記少なくとも2つの検出プローブが、前記標的バイオマーカーシグネチャーを発現する前記同じナノ粒子に結合して、二本鎖複合体を形成することができるように、前記検出プローブのセットの前記ナノ粒子上のそれらの個々の標的への結合を可能にする条件下で維持するステップ；

（c）前記二本鎖複合体を、核酸リガーゼと接触させて、ライゲーションされた鑄型を作成するステップ；

（d）前記ライゲーションされた鑄型を検出するステップであって、前記ライゲーションされた鑄型の存在が、前記標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子の前記生体試料における存在を示す、ステップ；ならびに

30

（e）必要に応じて、オルソゴナルな標的バイオマーカーシグネチャーを使用して、少なくともさらに1回、ステップa～dを繰り返すステップを含む、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、同じ標的バイオマーカーを対象にする、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、異なる、請求項27に記載の方法。

40

【請求項29】

前記捕捉アッセイの前記標的捕捉部分が、前記少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする少なくとも1つの抗体剤であるか、またはそれを含む、請求項19～28のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

前記対象における初期肺がん、末期肺がん、または再発性肺がんについてスクリーニングするために行われる、請求項1～29のいずれか一項に記載の方法。

【請求項31】

前記対象が、以下の特徴：

50

(i) 肺がん罹患しやすい（例えば、平均集団リスク（すなわち、遺伝的リスクなし）の、または肺がんについての遺伝的リスクを有する）無症候性対象；

(ii) 肺がんの家族歴を有する対象（例えば、肺がんの病歴を有する 1 人または複数人の第一度近親者を有する対象）；

(iii) 喫煙者であるか、または喫煙者であった、対象；

(iv) 二次喫煙、ラドンガス、アスベスト、瀝青質「煙の出る石炭」、および／または他の発癌物質（例えば、ヒ素、クロム、ニッケル、電離放射線、多環式芳香族炭化水素、一酸化窒素、高レベルの $< 2.5 \mu\text{m}$ の粒子状物質）に曝露された対象；

(v) 30 歳またはそれを超える対象；

(vi) 肺がんの 1 つまたは複数の非特異的症状を有する対象であって、必要に応じて、前記非特異的症状のうちの少なくとも 1 つが、非がん性疾患、障害、または状態と関連する 1 つまたは複数の一般的な呼吸症状、例えば、咳嗽、喀血、気道閉塞、および息切れに類似する、対象；

(vii) 胸部イメージング、例えば、X 線、CT スキャン、または低線量 CT スキャンが推奨される対象；

(viii) イメージングで確認される肺腫瘍と診断された対象；

(ix) 良性肺腫瘍を有する対象；

(x) 肺がんについて以前に処置された対象；

(xi) COPD を有すると決定された対象；

(xii) 肺線維症を有すると決定された対象；

(xiii) 慢性気管支炎、結核、および／または肺炎の病歴を有する対象；

(xiv) HIV および／または AIDS を有すると決定された対象；

(xv) 現在または過去の多量のアルコール摂取を有する対象；

(xvi) EGFR、チトクロム p 450 酵素、および／または DNA 修復遺伝子に遺伝性変異を有する対象；ならびに

(xvii) 放射線療法および／または化学療法に曝露された対象のうちの少なくとも 1 つまたは複数を有する、請求項 1～30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

以下の診断アッセイ；

(i) 前記対象の 1 年に 1 回の身体検査；

(ii) 胸部イメージング（例えば、X 線、CT スキャン、または低線量 CT スキャン）；

(iii) 喀痰細胞診；

(iv) 循環腫瘍 DNA および／またはがんに関連するタンパク質バイオマーカーにおける遺伝子変異について血漿をスクリーニングするための遺伝学的アッセイ；ならびに

(v) 細胞表現型およびマーカー発現を同定するための免疫蛍光染色と、それに続く増幅および次世代シーケンシングによる解析を含むアッセイのうちの 1 つまたは複数と組み合わせて使用される、請求項 1～31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

前記肺がんが、小細胞肺がんまたは非小細胞肺がんである、請求項 1～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

前記肺がんが、非小細胞肺がんである、請求項 1～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

前記非小細胞肺がんが、肺腺癌である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

抗肺がん療法（例えば、外科手術、放射線療法、化学療法、放射線手術、標的化薬物療法、免疫療法）の処置への応答についておよび／またはがんの再発／転移の検出について

10

20

30

40

50

および／または肺がんから良性肺腫瘍（例えば、小結節または病変）を識別することについて、肺がん患者をモニタリングするために行われる、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

前記方法が、ヒト血液試料由来のインタクトナノ粒子の表面上で、少なくとも 2 つのバイオマーカーの共局在を検出するステップであって、その組み合わせられた発現レベルが、がんに関連すると決定される、ステップ；前記検出された共局在レベルを、前記決定されたレベルと比較するステップ；および前記検出された共局在レベルが、前記決定されたレベルであるか、またはそれを上回る場合に、がんを検出するステップを含む、がんを検出するための請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 38】

前記方法が、エキソソームを含む試料を、前記エキソソーム上の表面バイオマーカーに特異的に結合する検出プローブのセットと接触させて、95%～100%の範囲内の特異度および30%～100%の範囲内の感度で、前記試料中のがん関連エキソソームを検出するステップを含む、がんを検出するための請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

前記エキソソーム上のがん特異的表面バイオマーカーと選択的に相互作用する捕捉剤を用いて、生体試料からエキソソームを捕捉するステップ；前記捕捉されたエキソソームを、前記エキソソーム上の表面バイオマーカーとそれぞれ選択的に相互作用する少なくとも 2 つの検出プローブの少なくとも 1 つのセットと接触させるステップ；および前記セットの前記少なくとも 2 つの検出プローブが、十分に近接している場合に形成される生成物を検出するステップであって、そのような検出が、前記表面バイオマーカーの共局在を示す、ステップを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 40】

エキソソームを含む試料を、前記エキソソーム上の表面バイオマーカーに特異的に結合するプローブのセットと接触させて、前記試料中のがん関連エキソソームを検出するステップであって、(i) 前記セット中のそれぞれのプローブが前記エキソソーム上の表面バイオマーカーを対象にする標的結合部分を含み；(ii) 前記セットが、少なくとも 1 つの捕捉プローブおよび少なくとも 2 つの検出プローブを含み、それぞれの検出プローブが、検出部分をさらに含む、ステップを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 41】

ヒト対象からのエキソソーム上の表面バイオマーカーシグネチャーを検出する近接アッセイを行うステップであって、前記行うステップが、以前のアッセイを行った後の期間に行われて、前記ヒト対象からのエキソソーム上の前記表面バイオマーカーシグネチャーを検出する、ステップ；および前記行われたアッセイの結果を、前記以前のアッセイの結果と比較するステップを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

エキソソームを、少なくとも 2 つの検出プローブと接触させるステップであって、それぞれの検出プローブが、(i) 結合部分；および(ii) オリゴヌクレオチド実体を含み、前記結合部分が、同じであり、前記オリゴヌクレオチド実体が、互いを補完する、ステップを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 43】

エキソソーム表面上でのマーカー近接性を検出するステップであって、前記エキソソームを、結合部分および近接部分をそれぞれ含む結合剤の少なくとも一対と接触させるステップを含む改善を含み、前記結合部分が、同じであり、前記近接部分が、互いを補完する、ステップ；ならびに前記近接部分間の相互作用を検出するステップを含む、請求項 1～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

50

肺がんの検出のためのキットであって、

(a) ナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤であって、前記ナノ粒子が、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有する、捕捉剤；ならびに

(b) 検出プローブの少なくとも1つのセットであって、そのセットが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、前記検出プローブが、

(i) 肺がんのための前記標的バイオマーカーシグネチャーの前記標的バイオマーカーに向けられた標的結合部分；ならびに

(ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記少なくとも2つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記少なくとも2つの検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含み；

肺がんのための前記標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに

表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカー

を含み、

前記表面バイオマーカーが、

【化162】

ALCAM, BCAP31, CD109,

CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR,

EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y

抗原, Lewis X 抗原, MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E,

ホスファチジルセリン, PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原, SLC34A2,

シアリル Tn 抗原, Tn 抗原, T 抗原, TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC,

TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1,

DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1,

LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6,

ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトトリアオシルセラミド (Lc3)、フォルスマン抗原、およびその組合せから選択され；

前記小胞内バイオマーカーが、

【化163】

AOC1, C12orf45,

CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF,

10

20

30

40

50

【化 1 6 4】

NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；

前記小胞内RNAバイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：

【化 1 6 5】

ABCC3, AOC1,

ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

20

およびその組合せによってコードされるRNA転写物（例えば、mRNA転写物）から選択される、検出プローブの少なくとも1つのセットを含むキット。

【請求項 4 5】

前記少なくとも1つの標的バイオマーカーが、前記表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、前記選択された表面バイオマーカーおよび前記少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカーが、異なる、請求項 4 4に記載のキット。

30

【請求項 4 6】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、

【化 1 6 6】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

40

シアリル-6T 抗原（6-シアリルコア1）、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトリアオシルセラミド（Lc3）、フォスマン抗原、およびその組合せであるか、またはそれを含む、請求項 4 4 または 4 5 に記載のキット。

【請求項 4 7】

50

肺がんの検出のためのキットであって、

(a) ナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤であって、前記ナノ粒子が、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有する、捕捉剤；ならびに

(b) 検出プローブの少なくとも1つのセットであって、そのセットが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、前記検出プローブが、

(i) 肺がんのための前記標的バイオマーカーシグネチャーの前記標的バイオマーカーに向けられた標的結合部分；ならびに

(ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記少なくとも2つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記少なくとも2つの検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含み；

肺がんのための前記標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに

少なくとも1つの標的バイオマーカーであって、前記標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーであるか、またはそれを含み、前記標的バイオマーカーシグネチャーが、表4Aまたは4Bに列挙されるバイオマーカーの組合せを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカー

を含む、検出プローブの少なくとも1つのセット

を含むキット。

【請求項48】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原および／もしくはMUC1であるか、またはそれを含む、請求項44～46のいずれか一項に記載のキット。

【請求項49】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記標的バイオマーカーシグネチャーの同じ標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項44～48のいずれか一項に記載のキット。

【請求項50】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ標的バイオマーカーが、CEACAM5、CEACAM6、もしくはMUC1であるか、またはそれを含み；あるいは前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、MUC1であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ標的バイオマーカーが、CEACAM5、シアリルLewis X、もしくはLewis Yであるか、またはそれを含む、請求項49に記載のキット。

【請求項51】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、異なる、請求項50に記載のキット。

【請求項52】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記標的バイオマーカーシグネチャーの別個の標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項44～48のいずれか一項に記載のキット。

【請求項53】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原および／もしくはMUC1であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、CEACAM5、CEACAM6、MUC1、シアリルLewis X、およびLewis Y、ならびにその組合せから選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを対象にする、請求項52に記

10

20

30

40

50

載のキット。

【請求項 5 4】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカが、s T n 抗原であるか、またはそれを含み、前記少なくとも 2 つの検出プローブが、M U C 1、C E A C A M 5、C E A C A M 6、およびその組合せから選択される少なくとも 2 つの標的バイオマーカを対象にするか；あるいは前記ナノ粒子関連表面バイオマーカが、M U C 1 であるか、またはそれを含み、前記少なくとも 2 つの検出プローブが、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、L e w i s Y、およびその組合せから選択される前記少なくとも 2 つの標的バイオマーカを対象にする、請求項 5 2 に記載のキット。

【請求項 5 5】

少なくとも 1 つの追加試薬（例えば、リガーゼ、固定剤、および／または透過処理剤）をさらに含む、請求項 4 4 ～ 5 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 6】

検出プローブの少なくとも 2 つのセット（例えば、少なくとも 3 つのセットを含む）を含み、そのそれぞれのセットが、肺がんのための別個の標的バイオマーカシグネチャーの標的バイオマーカをそれぞれ対象にする少なくとも 2 つの検出プローブを含む、請求項 4 4 ～ 5 5 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 7】

（a）標的捕捉部分を含む第 1 の捕捉剤；

（b）標的捕捉部分を含む第 2 の捕捉剤；

（c）検出プローブの少なくとも 2 つのセットであって、前記検出プローブが、

（i）標的表面バイオマーカに向けられた標的結合部分；ならびに

（i i）前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記少なくとも 2 つの検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブの少なくとも 2 つのセットを含む、請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 8】

（a）標的捕捉部分を含む第 1 の捕捉剤；

（b）標的捕捉部分を含む第 2 の捕捉剤；

（c）標的捕捉部分を含む第 3 の捕捉剤；

（d）検出プローブの少なくとも 3 つのセットであって、前記検出プローブが、

（i）標的表面バイオマーカに向けられた標的結合部分；ならびに

（i i）前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記少なくとも 2 つの検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブの少なくとも 3 つのセットを含む、請求項 4 4 ～ 4 6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 5 9】

（a）約 3 0 n m ～ 約 1 0 0 0 n m の範囲内のサイズを有し、肺がんのための標的バイオマーカシグネチャーを発現するナノ粒子であって、前記標的バイオマーカシグネチャーが、

少なくとも 1 つのナノ粒子関連表面バイオマーカ、ならびに

表面バイオマーカ、小胞内バイオマーカ、および小胞内 R N A バイオマーカから

10

20

30

40

50

なる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、

前記表面バイオマーカーが、
【化167】

ALCAM, BCAP31, CD109,
CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR,
EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y
抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E,
ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2,
シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC,
TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1,
DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1,
LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6,
ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

10

シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis
A 抗原 (CA19-9)、G l o b o H、G b 5 (S S E A-3)、ラクトトリアオシ
ルセラミド (L c 3)、フォルスマン抗原、およびその組合せから選択され；

20

前記小胞内バイオマーカーが、
【化168】

AOC1, C12orf45,
CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF,
NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2,
SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

30

およびその組合せから選択され；

前記小胞内RNAバイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：
【化169】

ABCC3, AOC1,
ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6,
CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1,
DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2,
GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG,
LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,
PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1,
SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4,
SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4,
TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

40

およびその組合せによってコードされるRNA転写物（例えば、mRNA転写物）から選

50

扱され；

前記ナノ粒子が、前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む固体基材上に固定化される、ナノ粒子；

(b) 前記ナノ粒子にそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、それぞれの検出プローブが、

(i) 前記腫瘍標的バイオマーカーシグネチャーの前記標的バイオマーカーのうちの1つを対象にする標的結合部分；ならびに

(ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記第1および第2の検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインを含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む複合体。

【請求項60】

前記少なくとも1つの標的バイオマーカーが、前記表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、前記選択された表面バイオマーカーおよび前記少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカーが、異なる、請求項59に記載の複合体。

【請求項61】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、

【化170】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、フォルスマン抗原、もしくはその組合せであるか、またはそれを含む、請求項59または60に記載の複合体。

【請求項62】

(a) 約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有し、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子であって、前記標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに

少なくとも1つの標的バイオマーカーであって、前記標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーであるか、またはそれを含み、前記標的バイオマーカーシグネチャーが、表4Aもしくは4Bに列挙されるバイオマーカーの組合せであるか、またはそれを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み；

前記ナノ粒子が、前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む固体基材上に固定化される、ナノ粒子；

(b) 前記ナノ粒子にそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブ

であって、それぞれの検出プローブが、

(i) 前記腫瘍標的バイオマーカーシグネチャーの前記標的バイオマーカーのうちの1つを対象にする標的結合部分；ならびに

(ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記第1および第2の検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインを含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む複合体。

【請求項63】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原もしくはMUC1であるか、またはそれを含む、請求項59～61のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項64】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記標的バイオマーカーシグネチャーの同じ標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項59～62のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項65】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ標的バイオマーカーが、CEACAM5、CEACAM6、もしくはMUC1であるか、またはそれを含み；あるいは前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、MUC1であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ標的バイオマーカーが、CEACAM5、シアリルLewis X、もしくはLewis Yであるか、またはそれを含む、請求項64に記載の複合体。

【請求項66】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、異なる、請求項64に記載の複合体。

【請求項67】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記標的バイオマーカーシグネチャーの別個の標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項59～62のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項68】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原もしくはMUC1であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、CEACAM5、CEACAM6、MUC1、シアリルLewis X、Lewis Y、およびその組合せから選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを対象にする、請求項67に記載の複合体。

【請求項69】

前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、sTn抗原であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、MUC1、CEACAM5、CEACAM6、およびその組合せから選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを対象にするか；あるいは前記ナノ粒子関連表面バイオマーカーが、MUC1であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、CEACAM5、シアリルLewis X、Lewis Y、およびその組合せから選択される前記少なくとも2つの標的バイオマーカーを対象にする、請求項67に記載の複合体。

【請求項70】

前記固体基材が、磁気ビーズを含む、請求項59～69のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項71】

前記標的捕捉部分が、抗体剤であるか、またはそれを含む、請求項59～70のいずれか一項に記載の複合体。

10

20

30

40

50

【請求項 7 2】

(a) その表面上に少なくとも1つの標的バイオマーカーを有するエキソソーム；ならびに (b) 前記エキソソームにそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、前記第1の検出プローブおよび前記第2の検出プローブのそれぞれが、(i) 前記エキソソームによって発現される標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに (ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、前記第1および第2の検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインを含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む、請求項 5 9～7 1 のいずれか一項に記載の複合体。

10

【請求項 7 3】

少なくとも2つのプローブのセットに結合したヒト血液試料由来のナノ粒子を含み、そのそれぞれが、バイオマーカー結合部分およびオリゴヌクレオチドドメインを含み、2つまたはそれよりも多くの結合したプローブが、それらのオリゴヌクレオチドドメインが互いにハイブリダイズして、ライゲーション可能なハイブリッドを形成するように、互いに近位にある、請求項 5 9～7 1 のいずれか一項に記載の複合体。

【請求項 7 4】

(a) がん関連標的バイオマーカーシグネチャーを含むエキソソーム；ならびに (b) 前記エキソソームにそれぞれ結合した少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、前記検出プローブのそれぞれが、(i) 前記標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする標的結合部分；ならびに (ii) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、前記検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも部分的に相補的である、オリゴヌクレオチドドメインを含む、少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む、請求項 5 9～7 1 のいずれか一項に記載の複合体。

20

【請求項 7 5】

プローブのそれぞれのセットが、(a) がん細胞由来のナノ粒子上の表面バイオマーカーに特異的に結合するバイオマーカー結合部分であって、前記ナノ粒子が、約 3 0 n m ～ 約 1 0 0 0 n m の範囲内のサイズを有する、バイオマーカー結合部分；ならびに (b) オリゴヌクレオチドドメインであって、前記セット内のプローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、前記プローブがそれらの標的バイオマーカーに結合する場合に、それらのオリゴヌクレオチドドメインが、互いにハイブリダイズして、前記標的バイオマーカーが互いに近位にある場合にのみライゲーション可能なハイブリッドを形成するように、配列および構築される、オリゴヌクレオチドドメインを含む、請求項 1 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法、キット、または複合体における使用のためのプローブのセット。

30

【請求項 7 6】

肺がんから良性肺腫瘍（例えば、小結節および／または病変）を識別するための方法であって、

40

(a) 肺腫瘍を有すると決定された対象からの血液由来試料において、約 3 0 0 n m ～ 約 1 0 0 0 n m の範囲内のサイズを有するナノ粒子の表面上で、少なくとも1つの捕捉バイオマーカーおよび少なくとも1つの検出バイオマーカーを含む少なくとも1つのバイオマーカーの組合せの共局在を検出するステップであって、前記少なくとも1つの捕捉バイオマーカーおよび前記少なくとも1つの検出バイオマーカーが、

【化 1 7 1】

ALCAM, BCAP31,

50

【化 1 7 2】

CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

10

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、G l o b o H、G b 5 (S S E A-3)、ラクトトリアオシルセラミド (L c 3)、フォルスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される、ステップ；

(b) 前記検出された共局在レベルを、参照レベルと比較するステップ；ならびに

(c) 前記検出された共局在レベルが、前記参照レベルであるか、またはそれと同等である場合に、前記対象の前記肺腫瘍を良性である可能性があると同定するステップ；あるいは前記検出された共局在レベルが、前記参照レベルを上回る場合に、前記肺腫瘍をがん性であると同定するステップ

20

を含む、方法。

【請求項 7 7】

肺がんから良性肺腫瘍を識別するための前記方法が、90%~100%の範囲内の特異度および65%~95%の範囲内の感度を有する、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

初期肺がんの検出のための方法であって、

(a) 対象からの血液由来試料において、約300nm~約1000nmの範囲内のサイズを有するナノ粒子の表面上で、少なくとも1つの捕捉バイオマーカーおよび少なくとも1つの検出バイオマーカーを含む少なくとも1つのバイオマーカーの組合せの共局在を検出するステップであって、前記少なくとも1つの捕捉バイオマーカーおよび前記少なくとも1つの検出バイオマーカーが、

30

【化 1 7 3】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2,

40

【化 1 7 4】

NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis

50

A 抗原 (CA19-9)、G l o b o H、G b 5 (S S E A-3)、ラクトトリアオシルセラミド (L c 3)、フォルスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される、ステップ；

(b) 前記検出された共局在レベルを、参照レベルと比較するステップ；ならびに

(c) 前記検出された共局在レベルが、前記参照レベルであるか、またはそれと同等である場合に、前記対象を肺がんについて陰性であると同定するステップ；あるいは前記検出された共局在レベルが、前記参照レベルを上回る場合に、前記対象を肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすい可能性があると同定するステップを含む、方法。

【請求項 79】

初期肺がんの検出のための前記方法が、90%～100%の範囲内の特異度および80%～95%の範囲内の感度を有する、請求項78に記載の方法。

【請求項 80】

前記検出するステップが、前記ナノ粒子の表面上で、前記少なくとも1つのバイオマーカーの組合せの共局在を検出するステップであって、前記少なくとも1つのバイオマーカーの組合せが、以下：

(i) C E A C A M 5、C E A C A M 6、および／またはM U C 1と組み合わせられた s T n 抗原；ならびに

(i i) C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、および／またはL e w i s Yと組み合わせられたM U C 1

のうちの1つから選択される、ステップを含む、請求項76～79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 81】

前記検出するステップが、前記ナノ粒子の表面上で、前記少なくとも1つのバイオマーカーの組合せの共局在を検出するステップであって、前記少なくとも1つのバイオマーカーの組合せが、以下の組合せ：

(i) (s T n 抗原、C E A C A M 5)；

(i i) (s T n 抗原、C E A C A M 5、M U C 1)；

(i i i) (s T n 抗原、M U C 1)；

(i v) (s T n 抗原、C E A C A M 6)；

(v) (s T n 抗原、C E A C A M 5、C E A C A M 6)；

(v i) (s T n 抗原、M U C 1、C E A C A M 6)；

(v i i) (M U C 1、C E A C A M 5)；

(v i i i) (M U C 1、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X 抗原)；および

(i x) (M U C 1、C E A C A M 5、L e w i s Y 抗原)

のうちの1つから選択される、ステップを含む、請求項76～79のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 82】

前記検出するステップが、

(a) 前記ナノ粒子上の前記少なくとも1つの捕捉バイオマーカーと選択的に相互作用する捕捉プローブを用いて、前記血液由来試料から前記ナノ粒子を捕捉するステップ；

(b) 前記捕捉されたナノ粒子を、前記ナノ粒子上の前記少なくとも1つの検出バイオマーカーとそれぞれ選択的に相互作用する少なくとも2つの検出プローブの少なくとも1つのセットと接触させるステップ；ならびに

(c) 前記セットの前記少なくとも2つの検出プローブが、個々のナノ粒子上で十分に近接している場合に形成される生成物を検出するステップ

を含む、請求項76～81のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 83】

前記捕捉プローブが、前記捕捉バイオマーカーに結合する標的捕捉部分を含む、請求項82に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 8 4】

前記標的捕捉部分が、前記捕捉バイオマーカーを対象にする抗体剤であるか、またはそれを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記捕捉バイオマーカーが、ヒト遺伝子 M U C 1、もしくはシアリル T n (s T n) 抗原によってコードされるポリペプチドであるか、またはそれを含む、請求項 7 6 ~ 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 6】

前記捕捉プローブが、それらにコンジュゲートされた前記標的捕捉部分を含む固体基材であるか、またはそれを含む、請求項 8 2 ~ 8 5 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 8 7】

前記固体基材が、磁気ビーズを含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記少なくとも 2 つの検出プローブが、

(i) 前記少なくとも 1 つの検出バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに

(i i) 前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

前記検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメイン

20

をそれぞれ含む、請求項 8 2 ~ 8 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記セットの前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズして、二本鎖複合体を形成するように、前記生成物が、前記セットの前記少なくとも 2 つの検出プローブが個々のナノ粒子上で十分に近接している場合に形成された、請求項 8 2 ~ 8 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記形成された生成物が、前記二本鎖複合体が核酸リガーゼと接触する際に、ライゲーションされた鑄型を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

30

【請求項 9 1】

前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記標的結合部分が、同じ検出バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項 8 2 ~ 9 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 2】

前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、異なる、請求項 9 1 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記捕捉バイオマーカーが、 s T n 抗原であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ検出バイオマーカーが、 C E A C A M 5、C E A C A M 6、もしくは M U C 1 であるか、またはそれを含み；あるいは前記捕捉バイオマーカーが、M U C 1 であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ検出バイオマーカーが、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、もしくは L e w i s Y であるか、またはそれを含む、請求項 9 1 または 9 2 に記載の方法。

40

【請求項 9 4】

前記少なくとも 2 つの検出プローブの前記標的結合部分が、別個の検出バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項 8 2 ~ 9 0 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記捕捉バイオマーカーが、 s T n 抗原および／もしくは M U C 1 であるか、またはそれを含む場合に、前記少なくとも 2 つの検出プローブが、C E A C A M 5、C E A C A M 6、M U C 1、シアリル L e w i s X、および L e w i s Y、ならびにその組合せか

50

ら選択される少なくとも2つの検出バイオマーカを対象にする、請求項94に記載の方法。

【請求項96】

前記捕捉バイオマーカが、sTn抗原であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、MUC1、CEACAM5、CEACAM6、およびその組合せから選択される少なくとも2つの検出バイオマーカを対象にするか；あるいは前記捕捉バイオマーカが、MUC1であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、CEACAM5、シアリルLewis X、Lewis Y、およびその組合せから選択される前記少なくとも2つの検出バイオマーカを対象にする、請求項94に記載の方法。

10

【請求項97】

前記ナノ粒子が、インタクト細胞外小胞であるか、またはそれを含む、請求項76～96のいずれか一項に記載の方法。

【請求項98】

肺がんの検出に特異的なバイオマーカの組合せのためのプローブの少なくとも1つのセットであって、前記バイオマーカの組合せが、約300nm～約1000nmの範囲内のサイズおよびナノ粒子上の少なくとも1つの検出バイオマーカを有する前記ナノ粒子上の少なくとも1つの捕捉バイオマーカを含み、前記捕捉バイオマーカおよび前記検出バイオマーカが、

20

【化175】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原, Lewis X 抗原, MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン, PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリルLewis X 抗原, SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原, T 抗原, TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

30

シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリルLewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、フォスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択され、

前記プローブの少なくとも1つのセットが、

前記捕捉バイオマーカを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉プローブ；および

40

前記少なくとも1つの検出バイオマーカを対象にする標的結合部分をそれぞれ含む少なくとも2つの検出プローブ

を含む、プローブの少なくとも1つのセットを含むキット。

【請求項99】

複数のプローブのセットを含み、それぞれのセットが、肺がんの検出に特異的な別個のバイオマーカの組合せに対するものである、請求項98に記載のキット。

【請求項100】

前記バイオマーカの組合せが、以下：

(i) CEACAM5、CEACAM6、および／またはMUC1と組み合わされた sTn 抗原；ならびに

50

(i i) C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、および／または L e w i s Y と組み合わされた M U C 1

のうちの 1 つから選択される、請求項 98 または 99 に記載のキット。

【請求項 101】

前記バイオマーカーの組合せが、以下：

(i) (s T n 抗原、C E A C A M 5) ；

(i i) (s T n 抗原、C E A C A M 5、M U C 1) ；

(i i i) (s T n 抗原、M U C 1) ；

(i v) (s T n 抗原、C E A C A M 6) ；

(v) (s T n 抗原、C E A C A M 5、C E A C A M 6) ；

(v i) (s T n 抗原、M U C 1、C E A C A M 6) ；

(v i i) (M U C 1、C E A C A M 5) ；

(v i i i) (M U C 1、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X 抗原) ；および

(i x) (M U C 1、C E A C A M 5、L e w i s Y 抗原)

のうちの 1 つから選択される、請求項 98 または 99 に記載のキット。

【請求項 102】

前記捕捉プローブおよび検出プローブが、90%～100%の範囲内の特異度および65%～95%の範囲内の感度で、前記ナノ粒子上の個々のバイオマーカーに選択的に結合する、請求項 98～101 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 103】

前記検出プローブが、前記標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、前記オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、および前記オリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、前記少なくとも2つの検出プローブの前記一本鎖オーバーハング部分が、前記少なくとも2つの検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれさらに含む、請求項 98～102 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 104】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記ナノ粒子上の同じ検出バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項 98～103 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 105】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記オリゴヌクレオチドドメインが、異なる、請求項 104 に記載のキット。

【請求項 106】

前記捕捉バイオマーカーが、s T n 抗原であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ検出バイオマーカーが、C E A C A M 5、C E A C A M 6、もしくは M U C 1 であるか、またはそれを含む；あるいは前記捕捉バイオマーカーが、M U C 1 であるか、またはそれを含む場合に、前記検出プローブが対象にする前記同じ検出バイオマーカーが、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、もしくは L e w i s Y であるか、またはそれを含む、請求項 104 または 105 に記載のキット。

【請求項 107】

前記少なくとも2つの検出プローブの前記標的結合部分が、前記ナノ粒子上の別個の検出バイオマーカーをそれぞれ対象にする、請求項 98～103 に記載のキット。

【請求項 108】

前記捕捉バイオマーカーが、s T n 抗原および／もしくは M U C 1 であるか、またはそれを含み、前記少なくとも2つの検出プローブが、C E A C A M 5、C E A C A M 6、M U C 1、シアリル L e w i s X、および L e w i s Y、ならびにその組合せから選択される少なくとも2つの検出バイオマーカーを対象にする、請求項 107 に記載のキット。

。

10

20

30

40

50

【請求項 109】

前記捕捉バイオマーカが、s T n 抗原であるか、またはそれを含み、前記少なくとも 2 つの検出プローブが、M U C 1、C E A C A M 5、C E A C A M 6、およびその組合せから選択される少なくとも 2 つの検出バイオマーカを対象にするか；あるいは前記捕捉バイオマーカが、M U C 1 であるか、またはそれを含み、前記少なくとも 2 つの検出プローブが、C E A C A M 5、シアリル L e w i s X、L e w i s Y、およびその組合せから選択される前記少なくとも 2 つの検出バイオマーカを対象にする、請求項 107 に記載のキット。

【請求項 110】

少なくとも 1 つの追加試薬（例えば、リガーゼ、固定剤、および／または透過処理剤）をさらに含む、請求項 98～109 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 111】

前記ナノ粒子が、インタクト細胞外小胞であるか、またはそれを含む、請求項 98～110 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

本出願は、2022 年 1 月 7 日に提出された米国仮出願第 63 / 297684 号および 2022 年 10 月 18 日に提出された米国仮出願第 63 / 417299 号に基づく利益を主張し、それらの内容は、それらの全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

20

【背景技術】

【0002】

背景

がんの早期検出は、処置の成功の機会を大いに増加させる。しかしながら、肺がんを含む多くのがんは、効果的なスクリーニングの推奨を依然として欠いている。がんスクリーニング検査のための典型的な課題としては、限定的な感度および特異度が挙げられる。高い偽陽性率の結果は、それが、望ましくない副作用を潜在的に有し得る抗がん療法を不必要に投与したくない（または受けたくない）臨床医および患者に対する困難な管理上の判断を作り出し得るので、特に関心事であり得る。逆に、高い偽陰性率の結果は、療法を必要とする患者が見逃され、処置の遅延およびその結果として成功の可能性の低減をもたらすので、スクリーニング検査の目的を満たすことができない。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

要旨

本開示は、数ある中でも、生体試料からの有効な肺がんスクリーニングを達成するための洞察および技術を提供する。一部の実施形態では、そのような生体試料は、体液由来試料、例えば、一部の実施形態では、血液由来試料であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、非小細胞肺がんスクリーニングのために特に有用である洞察および技術を提供する。一部の実施形態では、提供される技術は、初期肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）の検出のために有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、無症候性個体を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合でさえ有効である（例えば、十分に高い感度および／または低い偽陽性率および／または偽陰性率の結果に起因する）。一部の実施形態では、提供される技術は、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を発生する遺伝的リスクなしの個体（例えば、無症候性個体）を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、症候性個体（例えば、肺がんの 1 つまたは複数の症状を患っている個体）を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、肺がんについてのリスクがある個

40

50

体（例えば、肺がんについての遺伝性および／または生活歴関連リスク因子を有する個体）を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、本明細書に提供される開示を読む当業者に明らかであろうように、1つまたは複数の組成物（例えば、分子実体または複合体、系、細胞、コレクション、組合せ、キットなど）および／もしくは方法（例えば、作製する、使用する、査定する方法など）であり得るか、またはそれを含み得る。

【0004】

一部の実施形態では、本開示は、例えば、肺がんの検出および診断に対するある特定の従来のアプローチを含む、ある特定の以前の技術による課題の起源を同定する。例えば、本開示は、多くの従来の診断アッセイ、例えば、X線イメージング、喀痰検査、低線量CTスキャニング、ならびに／または無細胞核酸、血清バイオマーカー（例えば、癌胎児抗原（CEA）、サイトケラチン19断片（CYFRA 21-1）、ニューロン特異的エノラーゼ（NSE）、プロガストリン放出ペプチド（ProGRP）、および／もしくは扁平上皮細胞癌抗原（SCCA））に基づく分子検査、ならびに／または細胞外小胞のバルク分析が、時間がかかり、高価で、ならびに／または信頼できる総合的な診断査定を提供するのに十分な感度および／または特異度を欠き得ることを認識する。一部の実施形態では、本開示は、そのような課題を、数ある中でも、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有する個々のナノ粒子における肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーの共局在を検出することによって解決する技術（システム、組成物、および方法を含む）を提供し、これは、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、膜結合および／または膜会合ポリペプチドを含む）、ならびに表面バイオマーカー、内部バイオマーカー、およびRNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、本開示は、そのような課題を、数ある中でも、出願人によって開発され、US 2020/0299780号およびWO 2020180741号に記載された標的実体検出アプローチを使用して肺がんのそのような標的バイオマーカーシグネチャーを検出することによって解決する技術（システム、組成物、および方法を含む）を提供し、これは、個々のナノ粒子、例えば、細胞外小胞における少なくとも2つまたはそれよりも多くの標的実体（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー）の相互作用および／または共局在に基づく。

【0005】

一部の実施形態では、本明細書に記載される検出のための細胞外小胞は、サイズ排除に基づく方法によって、対象の体液から単離することができる。当業者によって理解されるであろうように、一部の実施形態では、サイズ排除に基づく方法は、ナノ粒子を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を含む試料を提供し得る。したがって、一部の実施形態では、本開示の提供される技術は、ナノ粒子を含む目的のサイズ範囲（例えば、一部の実施形態では、約30nm～約1000nm）を有する個々のナノ粒子において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを形成する少なくとも2つまたはそれよりも多くの表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）の共局在化の検出を包含する。本開示を読む当業者は、「ナノ粒子」の文脈で本明細書に記載されるさまざまな実施形態が、本明細書に記載される「ナノ粒子」の文脈においても適用可能であり得ることを理解するであろう。

【0006】

一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、無症候性個体のスクリーニング、例えば、症状の発生前、またはそうでなければその非存在下での定期的なスクリーニングが、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）の有効な管理（例えば、処置の成功）のために有益であり、さらに重要であり得るという洞察を提供する。一部の実施形態では、本開示は、初期がん、一部の実施形態では、無症候性個体における初期がんを含む、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を検出するために実行され得る、肺がんのスクリーニングシステムを提供する。一部の実施形態では、提供される技術は、無症候性個体の定期的なスクリーニングを達成するために実行される。本開示は、

例えば、1人または複数人の個体（例えば、症候性または無症候性個体）の定期的な検査を含む戦略を含む、組成物（例えば、試薬、キット、構成要素など）、ならびにそれらを提供するおよび／または使用する方法を提供する。本開示は、そのようなシステムの有用性を規定し、それらを実行するための組成物および方法を提供する。

【0007】

一部の実施形態では、提供される技術は、提供される技術の単回および／または定期的（例えば、周期的）査定への有用な適用を可能にするのに適切な感度および／または特異度（例えば、偽陽性率および／または偽陰性率の結果）を伴う、肺がんの1つまたは複数の特色（例えば、発生率、進行、療法に対する応答性、再発など）の検出（例えば、早期検出、例えば、無症候性個体および／または集団における早期検出）を達成する。一部の
10 実施形態では、提供される技術は、定期的な検診、例えば、限定されるものではないが、身体検査、一般開業医の訪問、コレステロール／脂質血液検査、糖尿病（2型）スクリーニング、大腸内視鏡検査、血圧スクリーニング、甲状腺機能検査、前立腺がんスクリーニング、マンモグラム、HPV／Papスミア、および／またはワクチン接種と併せて有用である。一部の実施形態では、提供される技術は、処置レジメンと併せて有用であり、一部の実施形態では、提供される技術は、そのような処置レジメンの1つまたは複数の特徴（例えば、許容されるパラメーターによる成功率）を改善し得る。

【0008】

一部の態様では、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類する使用のため
20 の技術が提供される。一部の実施形態では、本開示は、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類するための方法またはアッセイを提供する。一部の実施形態では、提供される方法またはアッセイは、（a）それを必要とする対象からの生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料
30 など）において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子（細胞外小胞を含む、目的のサイズ範囲を有する）を検出するステップであって、標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、膜結合および／または膜会合ポリペプチドを含む）、ならびに表面バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、小胞内バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、表面バイオマーカーが、

【化1】

ADGRF1, ALCAM,

ABCC3, ARSL, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1),
CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1,
DSG2, EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1,
GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B, LARGE2,
40 LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM, PIGT, PODXL2,
PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2, Lewis X 抗原、シアリル Lewis
X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11,
SMIM22, SMPDL3B, ST14, TACSTD2, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1

およびその組合せから選択され；小胞内バイオマーカーが、

10

20

30

40

50

【化 2】

AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2,

【化 3】

SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカーが、

10

【化 4】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

20

およびその組合せから選択される、ステップ；（b）生体試料における標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；ならびに（c）生体試料が、参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む。

30

【0009】

一部の態様では、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類する使用のための技術が提供される。一部の実施形態では、本開示は、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類するための方法またはアッセイを提供する。一部の実施形態では、提供される方法またはアッセイは、（a）それを必要とする対象からの生体試料において、肺がん（例えば、一部の実施形態では、非小細胞肺がん）の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子を検出するステップであって、標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、小胞内バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、ステップ；（b）生体試料における標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；ならびに（c）生体試料が、参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上

40

50

昇を示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、シアリル T n (s T n) 抗原、シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア1)、T 抗原、【化5】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン抗原、ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X, Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、【化6】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3,

10

20

30

40

50

【化 7】

IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

10

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア 1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、G l o b o H、G b 5 (S S E A-3)、ラクトトリアシルセラミド (L c 3)、フォルスマン抗原、およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのそのような標的バイオマーカーは、

【化 8】

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AOC1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C12orf45, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CST1, CSTA, CTSC, CTSE, CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, ETV4, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXA2, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2, GRHL2, GSTA1, HCK, HMGB3, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS3BP, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2, MDFI, MIF, MYBL2, MYH14, MZB1, NAPSA, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PPP1R14D, PRAME, PTPN6, RBP1, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SBK1, SCGB3A2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINK1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

20

30

40

およびその組合せから選択される小胞内バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのそのような標的バイオマーカーは、

50

【化 9】

ABCA3,

【化 10】

ABCC1, ABCC3, ABRACL, ACP5, ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2,
 AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1, AOC1, AP1M2,
 APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2, ARSL, ASF1B, ATP8B1, AURKB,
 B3GNT3, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C12orf45, C15orf48, C19orf33, C1S,
 C8orf4, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24,
 CD53, CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3,
 CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1,
 CHMP4C, CLCA2, CLDN1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CNN2, COL17A1,
 CPA3, CRABP2, CST1, CSTA, CTSC, CTSE, CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1,
 CYP4F11, DAPL1, DMBT1, DPYSL3, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS,
 EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2, ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3,
 EPHX1, EPHX3, ESRP1, ETV4, EVA1A, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3, FAM129B,
 FAM60A, FAM83A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G, FERMT1,
 FGFR2, FGFR3, FOLR1, FOXA2, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB1,
 GJB2, GJB3, GJB5, GJB6, GNA15, GPC1, GPC3, GPC4, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2,
 GRHL2, GSTA1, HAS3, HCK, HMGB3, HOXB7, HS6ST2, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG,
 IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4, ITGB6, IVL, JAG2, JUP, KCNS3, KDELR3,
 KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17,
 KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, KRTCAP3, LAMB3,
 LAMP3, LAPTM5, LFNG, LGALS3BP, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3,
 MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MANEAL, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MIF,
 MMP14, MPZL2, MSLN, MUC1, MUC21, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NAPSA, NCF2,
 NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD,
 PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR, PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2,
 PLVAP, PMP22, PODXL2, POSTN, PPL, PPP1R14C, PPP1R14D, PRAME, PROM2, PRRG4,
 PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25, RAB38, RAET1L, RARRES1,
 RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, ROS1, RPS4Y1, RRM2, S100A10, S100A11,
 S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SBK1, SCGB3A2, SCNN1A, SDC1, SERINC2,
 SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SH3BP4,
 SHISA2, SLC1A5, SLC2A1, SLC34A2, SLC40A1, SLC44A4, SLC6A14, SLC6A8, SLC7A7,
 SLC7A8, SMIM22, SMPDL3B, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINK1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A,

10

20

30

40

50

【化 1 1】

SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMC5, TMEM30B, TMEM45B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A, TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TSPAN8, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANGL2, WLS, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

およびその組合せから選択される小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）であるか、またはそれを含む。

【0010】

一部の態様では、肺がん（例えば、一部の実施形態では、例えば、肺腺癌（LUAD）および／または肺扁平上皮細胞癌（LUSC）などの非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類する使用のための技術が提供される。一部の実施形態では、本開示は、肺がん（例えば、一部の実施形態では、例えば、LUADおよび／またはLUSCなどの非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類するための方法またはアッセイを提供する。一部の実施形態では、提供される方法またはアッセイは、（a）それを必要とする対象からの生体試料において、肺がん（例えば、一部の実施形態では、例えば、LUADおよび／またはLUSCなどの非小細胞肺がん）の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子を検出するステップであって、標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、小胞内バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、ステップ；（b）生体試料における標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；ならびに（c）生体試料が、参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、肺がん（例えば、一部の実施形態では、例えば、LUADおよび／またはLUSCなどの非小細胞肺がん）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

20

30

【化 1 2】

ABCA3, ACBD3,

ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP1B1, ATP6AP2, BCAP31, B3GNT5, BSPRY, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLPTM1L, CLSTN1, CPD, DPY19L1, DSG2, EGFR, EPCAM, FAM241B, FXYP3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLPH3L, GRHL2, HACD3,

40

50

【化 1 3】

IER3IP1, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, HAS3, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LSR, MAL2, MAGT1, MARCKSL1, MET, MGAT1, MUC4, NCSTN, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NUP210, PEX13, PIGN, PIGT, PLEC, PTPRF, PRSS21, SLC7A11, QSOX1, RAB25, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TTC33, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, LAG3, UCHL1, Lewis X, Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

10

およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのそのような標的バイオマーカーは、

20

【化 1 4】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

30

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア 1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトトリアオシルセラミド (Lc3)、フォルスマン抗原、およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つのそのような標的バイオマーカーは、

40

【化 1 5】

ABRACL, ACP5, AIF1, ALDH1A1, ALG1L, AP1M2, APOBEC3C, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C12orf45, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEP55, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CST1, CTSC, DPYSL3, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, ETV4, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83A, FAM83H, GNA15, GRHL2, HCK, HMGB3, HOXB7, ID1, IMPA2, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT18, KRT19, KRT8, LGALS3BP, LSP1, MDFI, MIF, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT, NUP210, NUSAP1, PALLD, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PTPN6, RIN2, RIPK4, RPS4Y1,

10

【化 1 6】

RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, SBK1, SH3BP4, SPI1, SPINT1, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBS2, TK1, TOP2A, TPD52, TPX2, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217,

20

およびその組合せから選択される小胞内バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

30

40

50

【化 1 7】

ABCA3, ABRACL, ACP5,
 AIF1, ALDH1A1, ALG1L, ANTXR1, AP1M2, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARSL, ASF1B,
 ATP8B1, AURKB, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C12orf45, C15orf48, C19orf33, C1S,
 C8orf4, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD24, CD53, CD74, CDC20, CDC42EP1, CDCA5,
 CDCP1, CDH1, CDH3, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CELSR1, CEP55, CHMP4C, CLDN4,
 CLDN7, CNN2, CPA3, CRABP2, CST1, CTSC, CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, DMBT1,
 DPYSL3, DSG2, EFNA1, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2, ENAH,
 EPCAM, EPHA2, EPHX1, EPHX3, ESRP1, ETV4, EVA1A, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3,
 FAM129B, FAM60A, FAM83A, FAM83H, FAT1, FBLIM1, FCER1G, GALNT3, GNA15,
 GPC4, GRHL2, HCK, HMGB3, HOXB7, HS6ST2, ID1, IL2RG, IMPA2, ITGA2, ITGB4,
 ITGB6, JAG2, KCNS3, KDELRL3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT18,
 KRT19, KRT8, KRTCAP3, LAMB3, LAMP3, LAPTM5, LFNG, LGALS3BP, LRP11, LSP1,
 LSR, MAL2, MANEAL, MAOA, MARCO, MDFI, MET, MIF, MMP14, MPZL2, MYBL2,
 MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NUP210, NUSAP1, OSMR,
 PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PIGT, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22,
 PODXL2, POSTN, PPL, PROM2, PRSS8, PTGES, PTPN6, PTPRF, RAB25, RARRES1, RGS1,
 RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, SBK1,
 SCNN1A, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC40A1, SLC7A7, SPI1,
 SPINT1, SPINT2, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2,
 TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMEM30B, TMEM54,
 TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TOP2A, TP53I11, TPD52, TPX2, TREM2, TRIP13,
 TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, VAMP8, WLS, YAP1,
 ZC3H11A, ZNF217,

10

20

30

およびその組合せから選択される小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）であるか、またはそれを含む。

40

【0011】

一部の態様では、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、肺腺癌（LUAD））を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類する使用のための技術が提供される。一部の実施形態では、本開示は、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUAD）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類するための方法またはアッセイを提供する。一部の実施形態では、提供される方法またはアッセイは、（a）それを必要とする対象からの生体試料において、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUAD）の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子を検出するステップであって、標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、小胞内バイオ

50

マーカー（本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、ステップ；（b）生体試料における標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；ならびに（c）生体試料が、参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUAD）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む。一部の実施形態では、LUADを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

10

【化18】

ABCC3, ACSL5, ATP11A, CD55, CEACAM5, CEACAM6, CLIC6, FOLR1, GOLM1, LPCAT1, MSLN, MUC1, NT5E, PLA2G4A, PLCH1, SLC34A2, SMPDL3B, TESC, TMC5, ERBB3, KDR,

およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、LUADを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

20

【化19】

AGR2, AOC1, CTSE, FBP1, FOXA2, KRT7, NAPSA, PPP1R14D, S100P, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1,

およびその組合せから選択される小胞内バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、LUADを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

30

【化20】

ABCC3, AGR2, AOC1, B3GNT3, CEACAM5, CEACAM6, CLDN18, CLDN3, CLIC6, CTSE, FBP1, FOLR1, FOXA2, GJB1, GPRC5A, KRT7, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGR, PPP1R14D, ROS1, S100P, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, TMC5, TMEM45B,

【化21】

TMPRSS2, TSPAN8,

40

およびその組合せから選択される小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ある特定の前述の標的バイオマーカーは、LUSCからLUADを区別するのに特に有用である。

【0012】

一部の態様では、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、肺扁平上皮細胞癌（LUSC））を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類する使用のための技術が提供される。一部の実施形態では、本開示は、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUSC）を有するか、または

50

それに罹患しやすいとして対象（例えば、無症候性対象）を分類するための方法またはアッセイを提供する。一部の実施形態では、提供される方法またはアッセイは、（a）それを必要とする対象からの生体試料において、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUSC）の標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子を検出するステップであって、標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、小胞内バイオマーカー（本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、ステップ；（b）生体試料における標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；ならびに（c）生体試料が、参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、ある特定の種類の肺がん（例えば、特定の実施形態では、LUSC）を有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む。一部の実施形態では、LUSCを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

10

【化22】

ABCC1, ATP11B, B4GALT4, CD109, CD9, CLCA2, CLDN1, CNTN1, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DSC2, DSC3, DSG3, EPHB3, FAT2, FBXO45, FERMT1, IGSF3, KLRG2, LAMC2, NECTIN1, PARL, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, RAB38, RAB6B, RAP2B, SLC2A1, TFRC, TMTC3, TRPV4, UGT1A6, UPK1B, XXYLT1, TNFSF18,

20

およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、LUSCを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

【化23】

ADH7, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH3A1, ALDH3B2, APOBEC3B, ARNTL2, CA9, CALML3, CAPNS2, CDC45, CDCA4, CENPW, CES1, CSTA, CYP2S1, EFS, FAM83D, FERMT1, FOXE1, FOXM1, GBP6, GPX2, GSTA1, IGF2BP2, IRF6, IVL, JUP, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, LGALS7B,

30

【化24】

MAGEA4, MAGEA6, MCM2, NRARP, OSGIN1, PITX1, PKP1, PPP1R14C, PRAME, RBP1, S100A2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SNAI2, SOX2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, TP63, TRIM29, ZNF750,

40

およびその組合せから選択される小胞内バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、LUSCを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するために特に有用である少なくとも1つのそのような標的バイオマーカーは、

50

【化 2 5】

ABCC1,

ADAM23, ADH7, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH3A1, ALDH3B2, APOBEC3B,
 ARNTL2, B3GNT5, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CD109, CD9, CDC45, CDCA4,
 CENPW, CES1, CLCA2, CLDN1, COL17A1, CSTA, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DSC2,
 DSC3, DSG3, DSP, EFS, EPHB3, FAM83D, FAT2, FERMT1, FGFR2, FGFR3, FOXE1,
 FOXM1, FXYD3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3, GJB5, GJB6, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87,
 GPX2, GSTA1, HAS3, IGF2BP2, IGSF9, IRF6, ITGA6, IVL, JUP, KRT13, KRT14, KRT15,
 KRT16, KRT17, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, LGALS7B, LRRC4, LYPD3, MAGEA4,
 MAGEA6, MCM2, NRARP, NTRK2, OSGIN1, PERP, PITX1, PKP1, PPP1R14C, PRAME,
 PRRG4, PTGFRN, PTPRZ1, RAB38, RAET1L, RBP1, RHCG, S100A2, SERPINB13,
 SERPINB3, SERPINB5, SLC2A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPRR1A, SPRR1B,
 SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, THBD, TMPRSS11D, TNS4, TP63, TRIM29, UPK1B,
 VANGL2, ZNF750,

10

20

およびその組合せから選択される小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ある特定の前述の標的バイオマーカーは、L U A DからL U S Cを区別するのに特に有用である。

【0013】

一部の実施形態では、本明細書に記載される方法またはアッセイは、少なくとももう1つの追加標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、またはそれよりも多くの追加標的バイオマーカーシグネチャーを含む）のために行われてもよい。一部のそのような実施形態では、分類カットオフは、それぞれの追加標的バイオマーカーシグネチャーに対応する追加参照閾値レベルを参照してもよい。

30

【0014】

一部の実施形態では、本明細書で使用および／または記載される肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーにおける使用のためのナノ粒子関連表面バイオマーカーは、腫瘍特異的バイオマーカーおよび／もしくは組織特異的バイオマーカー（例えば、肺組織特異的バイオマーカー）であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、非特異的マーカーであってもよく、またはそれを含んでもよく、例えば、これは、1つもしくは複数の非標的腫瘍および／または1つもしくは複数の非標的組織に存在する。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、

40

【化 2 6】

ALCAM, B3GNT3,
 CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4,
 DSG2, EGFR, EPCAM, FOLR1, GJB1, GJB2, IG1FR, LAMB3, MET, MSLN, MUC1, PIGT,
 PODXL2, ROS1, SDC1, SLC34A2, sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SMPDL3B, ST14,
 TACSTD2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN8,

およびその組合せから選択されるバイオマーカーのうちの1つもしくは複数であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、SLC34A2、CEACAM5、CEACAM6、および／もしくはEPCAMであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、ALCAM、CD55、CDH1、CDH3、CD274 (PD-L1)、CEACAM5、CEACAM6、DSG2、EGFR、EPCAM、FOLR1、IG1FR、MET、MSLN、MUC1、SLC34A2、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2、TNFRSF10B、もしくはその組合せであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、SLC34A2 ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、CEACAM5 ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、CEACAM6 ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、EPCAM ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、sTn 抗原および／もしくはMUC1 ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。

10

20

【0015】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも1つ（例えば、1、2、3、またはそれよりも多くを含む）の追加標的表面バイオマーカーを含み、これは、一部の実施形態では、

30

【化 2 7】

ALCAM, ABCC3, ARSL, B3GNT3, CDCP1, CDH1, CDH3,
 CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4,
 CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2, EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FOLR1, GJB1, GJB2,
 GPC4, HS6ST2, IG1FR, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LSR, MANEAL, MET,
 MSLN, MUC1, MUC21, PIGT, PODXL2, PRRG4, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2,
 SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, ST14, sTn 抗原、Tn
 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
 TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8,

40

もしくはその組合せであってもよく、またはそれを含んでもよい。

【0016】

一部の実施形態では、本明細書で使用および／または記載される肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーにおける使用のためのナノ粒子関連表面バイオマーカーは、腫瘍特異

50

的バイオマーカーおよび／もしくは組織特異的バイオマーカー（例えば、肺組織特異的バイオマーカー）であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、非特異的マーカーであってもよく、またはそれを含んでもよく、例えば、これは、１つもしくは複数の非標的腫瘍および／または１つもしくは複数の非標的組織に存在する。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、本明細書に記載される表面バイオマーカーのうちの１つもしくは複数であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、シアリル T n (s T n) 抗原、シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア1)、T 抗原、
【化 2 8】

10

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン抗原、ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X, Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

20

30

40

およびその組合せから選択されるバイオマーカーのうちの１つもしくは複数であってもよく、またはそれを含んでもよい。
【0 0 1 7】

50

一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、
【化 2 9】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55,
CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3,
IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1,
MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis
X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原、(sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2,
TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2,
CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3,
Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1,
GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

10

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア 1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis
A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、
フォルスマン抗原、およびその組合せから選択される表面バイオ
マーカーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

20

【0018】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面
バイオマーカー (例えば、本明細書に記載されるもの)、および少なくとも 1 つ (例えば
、1、2、3、またはそれよりも多くを含む) の追加標的表面バイオマーカーを含み、こ
れは、一部の実施形態では、シアリル Tn (sTn) 抗原、シアリル-6 T 抗原 (6-シ
アリルコア 1)、T 抗原、

【化 3 0】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV,
LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB,
SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A
抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン抗原、
ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A,
APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY,
CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1,
CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD,
CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM,
EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3,
GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3,
IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3,
LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1,
MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4,
NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC,

30

40

50

【化 3 1】

PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYL1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X, Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX)としても公知), NeuGcGM3,

10

およびその組合せであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、少なくとも1つ（例えば、1、2、3、またはそれよりも多くを含む）の追加標的表面バイオマーカーは、

【化 3 2】

20

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

30

シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、フォスマン抗原、およびその組合せから選択される表面バイオマーカーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0019】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも1つの標的小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカーを含み、これは、一部の実施形態では、以下のヒト遺伝子：

40

50

【化 3 3】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3,
C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3,
CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A,
FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3,

【化 3 4】

LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,
PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2,
SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7,
SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2,
TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

もしくはその組合せによってコードされる少なくとも1つのRNA転写物（例えば、mRNA転写物）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0020】

20

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも1つの標的小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカーを含み、これは、一部の実施形態では、以下のヒト遺伝子：

30

40

50

【化 3 5】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5,
 ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1,
 ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2,
 ASF1B, ATP8B1, AURKB, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33,
 C1S, C8orf4, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24,
 CD53, CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3,
 CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1,
 CHMP4C, CLCA2, CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA,
 CTSC, CTSE, CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3,
 DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4,
 EMP1, EMP2, ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1,
 F3, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G,
 FERMT1, FGFR2, FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3,
 GJB5, GJB6, GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1,
 HAS3, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4,
 ITGB6, IVL, JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13,
 KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7,
 KRT8, KRTCAP3, LAMP3, LAPTM5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3,
 MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2,
 MUC1, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2,
 NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR,

10

20

30

40

50

【化 3 6】

PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C, PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25, RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1, SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A, TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANGL2, WLS, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

もしくはその組合せによってコードされる少なくとも1つのRNA転写物（例えば、mRNA転写物）であってもよく、またはそれを含んでもよい。

20

【0021】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも1つの追加標的小胞内バイオマーカーを含み、これは、一部の実施形態では、以下のヒト遺伝子：AOC1、C12orf45、CRABP2、CST1、ETV4、FAM83A、FOXA2、HMGB3、LGALS3BP、MIF、NAPSA、PPP1R14D、S100A14、SBK1、SCGB3A2、SFTA2、SFTPA1、SFTPA2、SFTPB、SPINK1、TGFA、ZC3H11A、もしくはその組合せによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカーを含み、これは、SLC34A2ポリペプチドおよび／もしくはCEACAM5ポリペプチド；ならびに少なくとも1つの表面バイオマーカーSLC34A2、CEACAM5、CEACAM6および／もしくはEPCAMであり、またはそれを含む。

30

【0022】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも1つの追加標的小胞内バイオマーカーを含み、これは、一部の実施形態では、以下のヒト遺伝子：

【化 3 7】

40

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE, CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4,

50

【化 3 8】

ENAH, ESRP1, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2, GRHL2, GSTA1, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2, MDFI, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PRAME, PTPN6, RBP1, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

もしくはその組合せによってコードされる少なくとも1つのポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。

20

【0023】

一部の実施形態では、本明細書に記載される提供される方法またはアッセイにおける使用のための参照閾値レベルは、非肺がん対象の集団からの比較可能な試料において観察された標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルによって決定される。

【0024】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーは、親和性剤（例えば、限定されるものではないが、抗体に基づく薬剤）を使用して検出されてもよい。一部の実施形態では、ナノ粒子関連表面バイオマーカーは、抗体に基づく薬剤を含む捕捉アッセイを使用して検出されてもよい。例えば、一部の実施形態では、ナノ粒子におけるナノ粒子関連表面バイオマーカーの存在を検出するための捕捉アッセイは、ナノ粒子を含む生体試料を、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする捕捉剤と接触させるステップを含んでもよい。一部の実施形態では、そのような捕捉剤は、ナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする結合部分（例えば、本明細書に記載されるもの）を含んでもよく、これは、必要に応じて、固体基材にコンジュゲートされていてもよい。限定されないが、ナノ粒子関連表面バイオマーカーのための例示的な捕捉剤は、固体基材（例えば、磁気ビーズ）およびナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする結合部分（例えば、抗体剤）であってもよく、またはそれを含んでもよい。

30

【0025】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる標的バイオマーカーは、当技術分野において公知の適切な方法を使用して検出されてもよく、これは、検出される分析物の種類（例えば、表面分析物対小胞内分析物；ならびに／またはポリペプチドおよび／もしくはグリコフォーム対炭水化物対RNA）により変わり得る。例えば、本開示を読む当業者は、一部の実施形態では、表面バイオマーカーおよび／または小胞内バイオマーカーが、親和性剤（例えば、抗体に基づく薬剤）を使用して検出されてもよい一方で、一部の実施形態では、小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）は、核酸に基づく薬剤を使用して、例えば、定量的逆転写PCRを使用して、検出されてもよいことを認識するであろう。

40

50

【0026】

例えば、標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーおよび／もしくは小胞内マーカーであるか、またはそれを含む一部の実施形態では、そのような標的バイオマーカーは、ナノ粒子関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書で使用および／または記載されるもの）を示すナノ粒子を捕捉するための近接ライゲーションアッセイ、例えば、以下の捕捉アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）を含んで、検出されてもよい。一部の実施形態では、そのような近接ライゲーションアッセイは、ナノ粒子を含む生体試料を、標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする検出プローブのセットと接触させるステップであって、そのセットが、ナノ粒子および検出プローブのセットを含む組合せが作成されるように、少なくとも2つの別個の検出プローブを含み、2つの検出プローブが、（i）表面バイオマーカーおよび／または小胞内バイオマーカーを対象にする結合部分；ならびに（ii）結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含む、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、ステップを含んでいてもよい。検出プローブのそのような一本鎖オーバーハング部分は、検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いとハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる。ナノ粒子および検出プローブのセットを含むそのような組合せは、次いで、それらのオリゴヌクレオチドドメインが、アニールして、二本鎖複合体を形成するのに十分に近接するように、検出プローブのセットのナノ粒子上のそれらの個々の標的への結合を可能にする条件下で維持される。そのような二本鎖複合体は、二本鎖複合体を、核酸リガーゼと接触させて、ライゲーションされた鑄型を作成するステップ；およびライゲーションされた鑄型を検出するステップによって検出することができる。一部の実施形態では、ライゲーションされた鑄型は、定量的PCRを使用して検出することができる。そのようなライゲーションされた鑄型の存在は、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーについて陽性であるナノ粒子の存在を示す。そのような近接ライゲーションアッセイは、他の既存の近接ライゲーションアッセイよりも良好に、例えば、より高い特異度および／または感度で行われ得るが、本開示を読む当業者は、当技術分野において公知である他の形態の近接ライゲーションアッセイが代わりに使用されてもよいことを認識するであろう。

【0027】

標的バイオマーカーが、小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、p i w i 相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）マーカーであるか、またはそれを含む一部の実施形態では、そのような標的バイオマーカーは、核酸検出アッセイを含んで、検出されてもよい。一部の実施形態では、例示的な核酸検出アッセイは、逆転写PCRであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0028】

標的バイオマーカーが、小胞内バイオマーカー（例えば、小胞内バイオマーカーおよび／もしくは小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、p i w i 相互作用RNA、マイクロRNA、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、p i w i 相互作用RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカー）であるか、またはそれを含む一部の実施形態では、そのような標的バイオマーカーは、検出アッセイ（例えば、本明細書に記載される近接ライゲーションアッセイ）の前に、その後の検出のためにナノ粒子内のそのようなバイオマーカーを曝露する試料の処理（例えば、固定および／または透過処理）を含んで、検出されてもよい。

【0029】

本開示は、数ある中でも、単一細胞外小胞の分解能においてよりもむしろ、バルク試料（例えば、細胞外小胞のバルク試料）に基づく単一の肺がん関連血清タンパク質または多数の肺がん関連バイオマーカーの検出が、典型的には、その試料が得られた対象が、肺が

んを患っているか、またはそれに罹患しやすい可能性があるかどうかの決定において、十分な特異度および／または感度を提供しないことを認識する。本開示は、数ある中でも、例えば、検出のための細胞外小胞を含む、目的のサイズ範囲を有する個々のナノ粒子が、少なくとも1つまたは複数の細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび少なくとも1つまたは複数の標的バイオマーカーの組合せを含む標的バイオマーカーシグネチャーの存在によって特徴付けられることを特異的に必要とすることによってを含む、そのような課題を解決する、システム、組成物、および／または方法を含む技術を提供する。特定の実施形態では、本開示は、肺がんのそのような標的バイオマーカーシグネチャーの存在によって（例えば、発現によって）特徴付けられるそのような個々のナノ粒子を必要とする技術を教示するが、標的バイオマーカーシグネチャーを含まないナノ粒子は、検出可能なシグナル（例えば、参照レベルを上回る、例えば、少なくとも10%またはそれよりも高く上回るレベル、ここで、一部の実施形態では、参照レベルは、そのような標的バイオマーカーシグネチャーを含む個々のナノ粒子が存在しない試料などの陰性対照試料において観察されるレベルであってもよい）を生じない。

10

【0030】

当業者に理解されるであろうように、一部の実施形態では、細胞外小胞を含む試料はまた、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を含んでいてもよい。そのため、一部の実施形態では、本開示の提供される技術は、細胞外小胞の文脈において、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子の検出にも適用可能である、したがって、一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲（例えば、一部の実施形態では、約30nm～約1000nm）を有する個々のナノ粒子において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを形成する少なくとも2つまたはそれよりも多くの表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）の共局在化の検出のための技術を提供する。

20

【0031】

一部の実施形態では、本開示は、（a）対象の体液由来試料（例えば、血液由来試料など）から単離された、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有するナノ粒子を含む試料を提供するまたは得るステップ；（b）ナノ粒子の表面上で、その組み合わせられた発現レベルが肺がんに関連すると決定されている少なくとも2つの表面バイオマーカーの共局在を検出するステップであって、表面バイオマーカーが、（i）以下のヒト遺伝子：

30

【化39】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1,

40

50

【化 4 0】

MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

10

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または（i i）以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル T n（s T n）抗原、シアリル－6 T 抗原（6－シアリルコア 1）、T 抗原、ホスファチジルセリン、T n 抗原、シアリル L e w i s A 抗原（C A 1 9－9）、G l o b o H、G b 5（S S E A－3）、ラクトトリアオシルセラミド、（L c 3）、フォルスマン抗原、L e w i s X、L e w i s Y／B 抗原、L Y 6 E、L e w i s Y／C D 1 7 4、シアリル L e w i s X（s L e x）（シアリル S S E A－1（S L X）としても公知）、N e u G c G M 3、およびその組合せから選択される、ステップ；（c）検出された共局在レベルを、決定されたレベルと比較するステップ；ならびに（d）検出された共局在レベルが、決定されたレベルであるか、またはそれを上回る場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む方法を記載する。

20

【0 0 3 2】

一部の実施形態では、第 1 の表面バイオマーカーおよび第 2 の表面バイオマーカーは、（i）以下のヒト遺伝子：

【化 4 1】

30

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYP3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1,

40

50

【化 4 2】

MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

10

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または（i i）以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル Tn（sTn）抗原、シアリル-6T 抗原（6-シアリルコア1）、T 抗原、ホスファチジルセリン、Tn 抗原、シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトトリアオシルセラミド、（Lc3）、フォルスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B 抗原、LY6E、Lewis Y/CD174、シアリル Lewis X（sLex）（シアリル SSEA-1（SLX）としても公知）、NeuGcGM3、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

20

【0033】

一部の実施形態では、第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーは、
【化 4 3】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

30

40

シアリル-6T 抗原（6-シアリルコア1）、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトトリアオシルセラミド（Lc3）、フォルスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

【0034】

したがって、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、対象および／または対象の集団全体における肺がんの発生または再発の検出のために有用であり得る。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がんの検出のために選択されてもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、例えば、限定されるものではないが、肺腺癌、小細胞肺がん、扁平上皮細胞および移行細胞肺がん、大細胞肺が

50

ん、非小細胞癌、他の既定された癌種、肉腫、ならびに他の既定された種類の当技術分野において公知の肺がん（例えば、SEER Cancer Statistics Review 1975－2017を参照されたい）を含む、肺がんの特異的なカテゴリーの検出のために選択されてもよい。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術を、定期的に（例えば、毎年）使用して、初期肺がんまたは肺がんの再発について、ヒト対象またはヒト対象の集団全体をスクリーニングすることができる。

【0035】

一部の実施形態では、肺がんの発生または再発の検出のための本明細書に提供される技術に適した対象は、無症候性ヒト対象および／または無症候性集団全体であってもよい。そのような無症候性対象は、肺がんの家族歴を有する対象、肺がんについて以前に処置された対象、がん処置後に肺がん再発のリスクがある対象、肺がん処置後に寛解である対象、ならびに／あるいは胸部X線、喀痰分析、低線量CTによる肺がんの存在、ならびに／または少なくとも1つの肺がん血清バイオマーカー、例えば、限定されるものではないが、CEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／もしくはSCCA血清タンパク質の存在について以前にまたは定期的にスクリーニングされている対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような無症候性対象は、例えば、胸部X線、喀痰分析、低線量CT分析、または血清CEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／もしくはSCCAレベルから正常な医療診断結果を有すると決定されている対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような無症候性対象は、非肺がん対象および／または正常な健康な対象において典型的に観察される結果と比較した場合に、例えば、胸部X線、喀痰分析、低線量CT分析、ならびに／またはCEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／もしくはSCCAレベルの血清レベルから異常な医療診断結果を有すると決定されている対象であってもよい。あるいは、一部の実施形態では、無症候性対象は、肺がんについて以前にスクリーニングされていない対象、肺がんについて診断されていない対象、および／または肺がん療法を以前に受けていない対象であってもよい。

【0036】

一部の実施形態では、対象または対象の集団は、年齢、人種、地理的位置、遺伝歴、病歴、個人歴および／または病歴（例えば、喫煙、アルコール、薬物、発がん物質、食事、肥満、糖尿病、身体活動、日光曝露、放射線曝露、ウイルスなどの感染病原体への曝露、および／または職業上の危険）などの1つまたは複数の特徴に基づいて選択されてもよい。

【0037】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、肺がんを患っているか、それに罹患しやすい対象に対して、外科手術または療法を選択するために有用であり得る。一部の実施形態では、肺がんの療法および／または補助療法は、本明細書に提供される技術に基づく知見を考慮して選択することができる。

【0038】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、対象（例えば、肺がん対象）に投与される療法の有効性をモニタリングおよび／または評価するために有用であり得る。

【0039】

一部の実施形態では、本開示は、例えば、1人もしくは複数人の個々の対象および／または対象の集団全体について、患者ケアを管理するための技術を提供する。いくつかの例を挙げるが、一部の実施形態では、本開示は、スクリーニング（例えば、時間的にもしくは偶発的に動機付けられたスクリーニングおよび／または非時間的にもしくは偶発的に動機付けられたスクリーニング、例えば、周期的スクリーニング、1年に1回、1年に2回、2年に1回、またはいくつかの他の頻度による）において利用され得る技術を提供する。例えば、一部の実施形態では、時間的に動機付けられたスクリーニングにおける使用のための提供される技術は、ある特定の年齢よりも高齢（例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70歳を超える、またはそれよりも高齢）である1人もしくは

は複数人の個々の対象または対象の集団（例えば、無症候性対象）全体をスクリーニングするために有用であり得る。例えば、一部の実施形態では、時間的に動機付けられたスクリーニングにおける使用のための提供される技術は、ある特定の数よりも上のタバコパック年歴（例えば、5 パック年、10 パック年、15 パック年、20 パック年、25 パック年、30 パック年、および／または35 パック年超；1 パック年は、1 年間、1 日あたり1 パックの喫煙に等しく、一方で、1 年間、1 日あたり2 パックの喫煙は、2 パック年に等しいか、または2 年間、1 日あたり1 / 2 パックの喫煙は、1 パック年に等しい、など）を有する1 人もしくは複数人の個々の対象または対象の集団（例えば、無症候性対象）全体をスクリーニングするために有用であり得る。一部の実施形態では、偶発的に動機付けられたスクリーニングにおける使用のための提供される技術は、本明細書に記載される肺がんについてのスクリーニングを動機付ける出来事または事象を経験した可能性がある個々の対象をスクリーニングするために有用であり得る。例えば、一部の実施形態では、がんまたはがんへの易罹患性の1 つまたは複数の指標の決定に関する偶発的な動機付けは、例えば、それらの家族歴に基づく出来事（例えば、血族などの近親者が以前に肺がんと診断された）、肺がんに関連する1 つまたは複数のリスク因子（例えば、限定されるものではないが、例えば、喫煙、アルコール、食事、肥満、職業上の危険などを含む、生活歴リスク因子）の同定、および／または遺伝子検査（例えば、ゲノムシーケンシング）からの以前の偶発的な所見、および／またはイメージング診断検査（例えば、X 線、超音波、コンピューター断層撮影（CT）、低線量CT、および／または磁気共鳴イメージング（MRI）スキャン）、肺がんの1 つもしくは複数の徴候または症状の特徴（例えば、異常なイメージング結果、および／または肺がんを潜在的に示す症状など）の発生であつてもよく、あるいはそれを含んでいてもよい。

10

20

【0040】

一部の実施形態では、患者ケアを管理するために提供される技術は、処置および／または支払い（例えば、処置についての払い戻し）の判断および／または行動に情報を与えることができる。例えば、一部の実施形態では、提供される技術は、個々の対象が、肺がんの発生または再発の1 つまたは複数の指標を有するかどうかの決定を提供し、それによって、そのような所見を考慮して、医師および／または患者に、いつ療法を開始するかの情報を与えることができる。加えて、または代替的に、一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、特異的応答性バイオマーカー（例えば、肺がん応答性バイオマーカー）の所見に基づいて、医師および／または患者に、処置の選択の情報を与えることができる。一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、肺がんに関連する分子標的の1 つまたは複数のレベルの変化の所見に基づいて個々の対象が現在の処置に応答性であるかどうかの決定を提供し、それによって、そのような所見を考慮して、医師および／または患者に、そのような療法の有効性および／または療法を維持もしくは変更する判断の情報を与えることができる。

30

【0041】

一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、（1）スクリーニングそれ自体のために（例えば、周期的／定期的なスクリーニングのためにのみ利用可能な、または時間的および／もしくは偶発的に動機付けられたスクリーニングのためにのみ利用可能な払い戻し）；ならびに／または（2）提供される技術による所見を考慮して、療法を開始する、維持する、および／もしくは変更するために、健康保険提供者が払い戻しを行う（または行わない）かどうかに関する判断を行うのに情報を提供することができる。例えば、一部の実施形態では、本開示は、（a）本明細書に記載されるスクリーニングの結果を受け取ること、ならびにスクリーニングのおよび／または特定の治療レジメンの払い戻しの請求も受け取ること；（b）スクリーニングが適切なスケジュールまたは関連する出来事に対する応答に従って対象に対して行われた場合にスクリーニングの払い戻しを承認すること、および／または受け取ったスクリーニング結果を考慮して、適切な処置を表す場合に治療レジメンの払い戻しを承認すること；ならびに必要に応じて、（c）払い戻しを実行すること、または払い戻しが拒否された通知を提供することに関する方法を提供する。一部

40

50

の実施形態では、治療レジメンは、受け取ったスクリーニング結果が関連する治療レジメンについて承認されたバイオマーカーを表すバイオマーカーを検出する場合に、受け取ったスクリーニング結果を考慮して、充当される（例えば、処方情報ラベルで、および／または承認されたコンパニオン診断を介して述べられ得る通り）。代替的に、または加えて、本開示は、本明細書に記載されるスクリーニング結果および／または払い戻し判断の報告および／または処理を許可または容易にする報告システム（例えば、適切な電子デバイスおよび／または通信システムを介して実行される）を企図する。

【0042】

本明細書に提供される一部の態様は、提供される技術における使用のためのシステムおよびキットに関する。一部の実施形態では、システムまたはキットは、肺がんの腫瘍バイオマーカーシグネチャーのための検出剤（例えば、本明細書に記載されるもの）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムまたはキットは、肺がんに関連するナノ粒子に存在する細胞外小胞関連表面バイオマーカーのための捕捉剤（例えば、本明細書で使用されるものおよび／または記載されるもの）；ならびに（b）肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の標的バイオマーカーを対象にする少なくとも1つまたは複数の検出剤であって、追加表面バイオマーカー（例えば、本明細書で使用されるものおよび／または記載されるもの）、小胞内バイオマーカー（例えば、本明細書で使用されるものおよび／または記載されるもの）、および／または小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカー（例えば、本明細書で使用されるものおよび／または記載されるもの）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい、検出剤を含んでいてもよい。

【0043】

一部の実施形態では、システムおよび／またはキットに含まれる捕捉剤は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする結合部分（例えば、本明細書に記載されるもの）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのような結合部分は、固体基材にコンジュゲートされていてもよく、これは、一部の実施形態では、固体基材であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのような固体基材は、磁気ビーズであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットに含まれる例示的な捕捉剤は、固体基材（例えば、磁気ビーズ）、およびそれにコンジュゲートされた細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする親和性試薬（例えば、限定されるものではないが、抗体剤）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0044】

標的バイオマーカーが表面バイオマーカーおよび／または小胞内バイオマーカーを含む一部の実施形態では、システムおよび／またはキットは、近接ライゲーションアッセイを行うための検出剤（例えば、本明細書に記載されるもの）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、近接ライゲーションアッセイを行うためのそのような検出剤は、標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする検出プローブのセットを含んでいてもよく、このセットは、少なくとも2つの検出プローブを含み、2つの検出プローブは、（i）標的バイオマーカーを対象にするポリペプチド結合部分；ならびに（ii）結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、検出プローブが同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む。

【0045】

一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、多数（例えば、2、3、4、5、またはそれよりも多く）の検出プローブのセットを含んでいてもよく、そ

のそれぞれのセットは、2つまたはそれよりも多く（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20またはそれよりも多く）の検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブの少なくとも1つのセットは、肺がんの検出を対象にするものであってもよい。例えば、一部の実施形態では、提供されるシステムおよびキットは、肺がんの検出のための検出プローブについての少なくとも1つのセット、および異なるがん（例えば、膵臓がん）の検出のための検出プローブの少なくとも1つのセットを含んでいてもよい。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの検出プローブは、例えば、限定されるものではないが、肺腺癌肺がん、小細胞肺がん、扁平上皮細胞および移行細胞肺がん、大細胞肺がん、非小細胞癌肺がん、他の既定された肺がん癌種、肺がん肉腫、ならびに他の既定された種類の当技術分野において公知の肺がん（例えば、SEER Cancer Statistics Review 1975-2017を参照されたい）を含む、肺がんの異なるカテゴリーを対象にしている。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのセットは、異なるカテゴリーの肺がんの検出を対象にしている。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのセットは、同じカテゴリーの肺がんの検出を対象にしている。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのセットは、異なるステージの肺がんの検出を対象にしている。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くのセットは、同じステージの肺がんの検出を対象にしている。

10

【0046】

一部の実施形態では、提供されるキットにおける検出プローブは、容器中の単一の混合物として提供されてもよい。一部の実施形態では、検出プローブの複数のセットは、別々の容器中の個々の混合物として提供されてもよい。一部の実施形態では、それぞれの検出プローブは、別々の容器中で個々に提供される。

20

【0047】

標的バイオマーカーが小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカーを含む一部の実施形態では、そのようなシステムおよび／またはキットは、核酸検出アッセイを行うための検出剤を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムおよび／またはキットは、定量的逆転写PCRを行うための検出剤を含んでいてもよく、例えば、これは、小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）標的を対象にするプライマーを含んでいてもよい。

30

【0048】

本開示を読む当業者は、細胞外小胞の検出のためのシステムまたはキットを用いて、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を検出することもできることを理解するであろう。したがって、一部の実施形態では、システムまたはキットは、（i）細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子の表面上に存在する肺がん関連バイオマーカーシグネチャーの第1の表面バイオマーカーのための捕捉剤（例えば、本明細書に記載される通り）；および（ii）肺がん特異的バイオマーカーシグネチャーの第2の表面バイオマーカーを対象にする少なくとも1つまたは複数の検出剤を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子は、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有する。

40

【0049】

一部の実施形態では、本開示は、肺がんの検出のためのキットであって、（a）第1の表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤；ならびに（b）検出プローブの少なくとも1つのセットであって、そのセットが、第2の表面バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、検出プローブが、（i）第2の表面バイオマーカーに向けられた標的結合部分；および（ii）標的結合部分にカップリン

50

グされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が少なくとも2つの検出プローブが約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有する同じナノ粒子に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブの少なくとも1つのセットを含み；少なくとも第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーが、肺がんに関連すると決定された標的バイオマーカーシグネチャーを形成し、第1および第2の表面バイオマーカーが、(i)以下のヒト遺伝子：

【化44】

10

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1,

20

【化45】

CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPT4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

30

40

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または(ii)以下の炭水化物依存性マーカー：シアリルTn(sTn)抗原、シアリル-6T抗原(6-シアリルコア1)、T抗原、ホスファチジルセリン、Tn抗原、シアリルLewis A抗原(CA19-9)、Globo H、Gb5(SSEA-3)、ラクトトリアオシルセラミド、(Lc3)、フォルスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B抗原、LY

50

6 E、L e w i s Y / C D 1 7 4、シアリル L e w i s X (s L e x) (シアリル S S E A - 1 (S L X) としても公知)、N e u G c G M 3、およびその組合せからそれぞれ独立して選択されるキットを記載する。

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態では、第 1 の表面バイオマーカーおよび第 2 の表面バイオマーカーは、(i) 以下のヒト遺伝子：

【 化 4 6 】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX,

10

20

【 化 4 7 】

GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYL1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

30

40

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または (i i) 以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル T n (s T n) 抗原、シアリル - 6 T 抗原 (6 - シアリルコア 1)、T 抗原、ホスファチジルセリン、T n 抗原、シアリル L e w i s A 抗原 (C A 1 9 - 9)、G l o b o H、G b 5 (S S E A - 3)、ラクトトリアオシルセラミド、(L c 3)、フォルスマン抗原、L e w i s X、L e w i s Y / B 抗原、L Y 6 E、L e w i s Y / C D 1 7 4、シアリル L e w i s X (s L e x) (シアリル S S E A - 1 (S L X) としても公知)、N e u G c G M 3、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

【 0 0 5 1 】

一部の実施形態では、第 1 の表面バイオマーカーおよび第 2 の表面バイオマーカーは、

50

【化 4 8】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

10

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、フォスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

【0052】

20

一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、少なくとも1つの化学試薬、例えば、試料を処理するための化学試薬、および／またはその中のナノ粒子（例えば、一部の実施形態では、細胞外小胞を含む）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、例えば、限定されるものではないが、固定剤、透過処理剤、および／またはブロック剤を含む、試料中のナノ粒子（例えば、一部の実施形態では、細胞外小胞を含む）を処理するための少なくとも1つの化学試薬を含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、核酸リガーゼおよび／または核酸ポリメラーゼを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、1つまたは複数のプライマーおよび／またはプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、例えば、PCR、例えば、定量的PCR (qPCR) 反応のための1つまたは複数のプライマーの対を含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、例えば、一部の実施形態では、qPCRの特異性を増加させるように設計され得る加水分解プローブ（例えば、TaqManプローブ）などの1つまたは複数のプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、例えば、同時または並行qPCR反応が用いられる場合（例えば、読み取りを容易にするか、または改善するため）に有用であり得るので、1つまたは複数のマルチプレックス化プローブを含んでいてもよい。

30

【0053】

一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がんの検出（例えば、早期検出）のための個体（例えば、無症候性または症候性対象）のスクリーニング（例えば、定期的なスクリーニング）および／または他の査定のために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がん罹患しやすい個体（例えば、公知の遺伝的リスク、環境リスク、または経験リスクなどを有する個体）のスクリーニングおよび／または他の査定のために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、以前に処置された対象における肺がんの再発のモニタリングのために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がんを患っている対象のための療法と組み合わせて、コンパニオン診断として使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がんを患っている対象に投与される療法の

40

50

有効性をモニタリングまたは評価するために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がんを患っている対象のための療法を選択するために使用することができる。一部の実施形態では、提供されるシステムおよび／またはキットは、肺がんに関連する1つまたは複数の症状（例えば、非特異的症状）を有する対象のために、療法の判断を行うおよび／または療法を選択するために使用することができる。

【0054】

本明細書に記載される方法を行うことならびに／または本明細書に記載されるシステムおよび／もしくはキットを使用することによって形成される複合体も、本開示の範囲内である。例えば、一部の実施形態では、複合体は、（a）標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子であって、その少なくとも2つが、少なくとも1つのナノ粒子関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、表面バイオマーカーが、

10

【化49】

ADGRF1, ALCAM, ABCC3, ARSL, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2, EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1, GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B, LARGE2, Lewis X 抗原、LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM, PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2, sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, TACSTD2, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1,

20

およびその組合せから選択され；小胞内バイオマーカーが、

30

【化50】

AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；小胞内RNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オフアンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）バイオマーカーが、

40

【化 5 1】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

およびその組合せから選択され、ナノ粒子は、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーを対象にする結合部分を含む固体基材上に固定化される、ナノ粒子を含む。一部の実施形態では、そのような複合体は、ナノ粒子に存在する標的バイオマーカーシグネチャーの少なくとも1つの標的バイオマーカーを対象にする少なくとも2つの検出プローブをさらに含み、それぞれの検出プローブは、個々の標的バイオマーカーに結合し、(i) 標的バイオマーカーを対象にする結合部分；ならびに(ii) 結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む。

20

【0055】

一部の実施形態では、複合体を形成するナノ粒子に存在するナノ粒子関連表面バイオマーカーは、本明細書に記載される表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数を含む。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーは、

【化 5 2】

ALCAM, B3GNT3, CDCP1, CDHA1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4, DSG2, EGFR, EPCAM, FOLR1, GJB1, GJB2, IG1FR, LAMB3, MET, MSLN, MUC1, PIGT, PODXL2, ROS1, SDC1, SLC34A2, SMPDL3B, ST14, sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMPRSS4, TSPAN8, TNFRSF10B,

30

およびその組合せから選択されるバイオマーカーのうちの1つもしくは複数であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるそのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、SLC34A2ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるそのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるそのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、CEACAM6ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるそのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、EPCAMポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるそのようなナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、ALCAMポリペプチドであってもよく、また

40

50

40

50

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、MUC1ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、ルイスY抗原であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、sLe^x抗原であってもよく、またはそれを含んでもよい。

。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、T抗原であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーに含まれるナノ粒子関連表面バイオマーカーおよび／または表面バイオマーカーは、Tn抗原であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0057】

ナノ粒子を含む目的のサイズ範囲を有し、肺がん特異的バイオマーカーシグネチャーを含む、ナノ粒子を含む複合体も本開示の範囲内であり、これは、少なくとも2つの本明細書に記載される表面バイオマーカーを含み、ナノ粒子は、肺がん特異的バイオマーカーシグネチャーの第1の表面バイオマーカーを対象にする結合部分を含む固体基材上に固定化される。一部の実施形態では、そのような複合体は、肺がん特異的バイオマーカーシグネチャーの表面バイオマーカー（同じまたは異なる表面バイオマーカーであり得る）をそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブにも結合し、それぞれの検出プローブは、個々の表面バイオマーカーに結合し、（i）表面バイオマーカーを対象にする結合部分；ならびに（ii）結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む。

【0058】

一部の実施形態では、本開示は、（a）約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有し、その表面上に少なくとも第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーを含むナノ粒子であって、その組合せが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーであると決定されており、第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーが、（i）以下のヒト遺伝子：

【化53】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3,

10

20

30

40

50

【化 5 4】

FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

10

20

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または（i i）以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル T_n（s T_n）抗原、シアリル-6 T 抗原（6-シアリルコア1）、T 抗原、ホスファチジルセリン、T_n 抗原、シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトトリアオシルセラミド、（Lc3）、フォルスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B 抗原、LY6E、Lewis Y/CD174、シアリル Lewis X（sLex）（シアリル SSEA-1（SLX）としても公知）、NeuGcGM3、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される、ナノ粒子；（b）第1の表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む固体基材であって、標的捕捉部分が、ナノ粒子が固体基材上に固定化されるように、ナノ粒子の第1の表面バイオマーカーに結合する、固体基材；ならびに（c）ナノ粒子にそれぞれ結合した少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、それぞれの検出プローブが、（i）第2の表面バイオマーカーを対象にする標的結合部分；および（i i）標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、第1および第2の検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインを含む、少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む複合体を記載する。

30

40

【0059】

一部の実施形態では、第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーは、（i）以下のヒト遺伝子：

【化 5 5】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB,

50

【化 5 6】

SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXSD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

10

20

30

40

50

およびその組合せによってコードされるポリペプチド；ならびに／または（i i）以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル Tn（sTn）抗原、シアリル-6T 抗原（6-シアリルコア1）、T 抗原、ホスファチジルセリン、Tn 抗原、シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトリアオシルセラミド、（Lc3）、フォスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B 抗原、LY6E、Lewis Y/CD174、シアリル Lewis X（sLex）（シアリル SSEA-1（SLX）としても公知）、NeuGcGM3、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

【0060】

一部の実施形態では、第1の表面バイオマーカーおよび第2の表面バイオマーカーは、

【化 5 7】

ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD55, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSC2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y 抗原、Lewis X 抗原、MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NT5E, ホスファチジルセリン、PTGFRN, PTK7, SDC1, シアリル Lewis X 抗原、SLC34A2, シアリル Tn 抗原 (sTn 抗原), Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TNFRSF10B, TFRC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2,

【化 5 8】

CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D,

シアリル-6 T 抗原 (6-シアリルコア 1)、シアリル-T 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globo H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド (Lc3)、フォスマン抗原、およびその組合せからそれぞれ独立して選択される。

10

【0061】

本開示に包含されるこれらのおよび他の態様を、より詳細に下記および特許請求の範囲に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0062】

【図 1】図 1 は、個々のナノ粒子、例えば、細胞外小胞をプロファイリングする例示的なワークフローを示す模式図である。図は、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を使用する血漿からの EV の精製、および特異的 EV 関連表面マーカーを提示する EV の免疫親和性捕捉 (パネル A) ; 本明細書に記載される一部の実施形態による標的実体検出アッセイを使用する、捕捉された EV 上の共局在化標的マーカー (例えば、小胞内バイオマーカーまたは表面バイオマーカー) の検出 (パネル B) を示す。

20

【0063】

【図 2】図 2 は、本明細書に記載される一部の実施形態による標的実体検出アッセイを示す模式図である。一部の実施形態では、標的実体検出アッセイは、検出プローブの組合せを使用し、この組合せは、がんの検出に特異的である。一部の実施形態では、二重システムは、生物学的実体 (例えば、細胞外小胞) を含む試料に添加された、標的バイオマーカー 1 のための第 1 の検出プローブおよび標的バイオマーカー 2 のための第 2 の検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブは、オリゴヌクレオチドドメインにカップリングされた標的結合部分 (例えば、親和性剤、例えば、標的バイオマーカーに対する抗体剤など) をそれぞれ含み、これは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む。第 1 および第 2 の検出プローブの別個の標的結合部分 (例えば、親和性剤、例えば、それぞれ、標的バイオマーカー 1 および標的バイオマーカー 2 に対する抗体剤など) は、対応する一本鎖オーバーハングが互いにハイブリダイズし、このようにして、それらのオリゴヌクレオチドドメインのライゲーションが起こるように、近接して同じ生物学的実体 (例えば、細胞外小胞) に局在する場合に、検出シグナルが発生する。例えば、対照実体 (例えば、健康な対象試料由来の生物学的実体) は、標的バイオマーカー 1 および標的バイオマーカー 2 の一方または両方を発現せず、その結果、検出のシグナルは発生できない。しかしながら、がん試料 (例えば、肺がん試料) 由来の生物学的実体が、標的バイオマーカー 1 および標的バイオマーカー 2 を発現し、標的バイオマーカーが、同じ生物学的実体 (例えば、細胞外小胞) において互いに十分に短い距離内に存在する場合、検出シグナルは発生する。

30

40

【0064】

【図 3】図 3 は、異なる肺および気管支がんの組織学的サブタイプの有病率のグラフ表示を示す。その全内容が参照により本明細書に組み込まれる、National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program Cancer Statistics Review 1975-2017 から得たデータ。カテゴリー「その他」は、大細胞癌、非小細胞癌、他の既定された癌種、癌種 NOS、肉腫、および他の既定された種類を含む。組織学的分類の決定およびグルーピングは、レビュー内で述べられている。

50

【0065】

【図4】図4は、パイロット患者コホートの集団人口統計のグラフ表示である。このコホートから得た合計39の患者血漿試料を解析し、患者の肺がん診断ステージに対する年齢、性別、およびコホートサイズの外観を示す。その後、コホート試料を、本明細書に記載される例示的なアッセイによって評価した。

【0066】

【図5】図5は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌（LUAD）診断アッセイのグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づくEV捕捉とCEACAM6+CEACAM6検出プローブを使用する、健康な対照およびLUAD患者コホートの正規化されたシグナル。水平のカットオフ線は、100%の特異度の閾値を表す。ステージI LUADについて16.7%、ステージII LUADについて60%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて100%の感度が達成された。

10

【0067】

【図6】図6は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイのグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づくEV捕捉とCEACAM6+EPCAM検出プローブを使用する、健康な対照およびLUAD患者コホートの正規化されたシグナル。水平のカットオフ線は、100%の特異度の閾値を表す。ステージII LUADについて20%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて75%の感度が達成された。

【0068】

【図7】図7は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイのグラフ表示である。CEACAM5抗体に基づくEV捕捉とCEACAM6+SLC34A2検出プローブを使用する、健康な対照およびLUAD患者コホートの正規化されたシグナル。水平のカットオフ線は、100%の特異度の閾値を表す。ステージI LUADについて16.7%、ステージII LUADについて20%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて75%の感度が達成された。

20

【0069】

【図8】図8は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+CEACAM6検出プローブからのシグナルを、x軸に沿って表す一方で、SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+EPCAM検出プローブからのシグナルを、y軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD試料について観察された。

30

【0070】

【図9】図9は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+CEACAM6検出プローブからのシグナルを、x軸に沿って表す一方で、CEACAM5抗体に基づく捕捉とCEACAM6+SLC34A2検出プローブからのシグナルを、y軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD試料について観察された。

40

【0071】

【図10】図10は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+EPCAM検出プローブからのシグナルを、x軸に沿って表す一方で、CEACAM5抗体に基づく捕捉とCEACAM6+SLC34A2検出プローブからのシグナルを、y軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD試料について観察された。

【0072】

【図11】図11は、拡大患者コホートの集団人口統計のグラフ表示である。このコホートから得た合計138の患者血漿試料を解析し、患者の肺がん診断ステージに対する年齢

50

、性別、およびコホートサイズの外観を示す。その後、コホート試料を、本明細書に記載される例示的なアッセイによって評価した。

【0073】

【図12】図12は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイのグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づくEV捕捉とCEACAM6+CEACAM6検出プローブを使用する、健康な対照およびLUA患者コホートの正規化されたシグナル。水平のカットオフ線は、99.9%の特異度の閾値を表す。ステージII L U A Dについて50%、ステージIII L U A Dについて55.5%、およびステージIV L U A Dについて71.4%の感度が達成された。

【0074】

【図13】図13は、本明細書に記載される一部の実施形態による標的実体検出アッセイを示す模式図である。図は、例示的な三重標的実体検出システムを示し、ここで、一部の実施形態では、標的バイオマーカーそれぞれのための3つまたはそれよりも多くの検出プローブは、生物学的実体（例えば、細胞外小胞）を含む試料に添加することができる。一部の実施形態では、検出プローブは、オリゴヌクレオチドドメインにカップリングされた標的結合部分（例えば、親和性剤、例えば、標的バイオマーカーに対する抗体剤など）をそれぞれ含み、これは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む。3つまたはそれよりも多くの検出プローブのすべての対応する一本鎖オーバーハングが、互いにハイブリダイズして、線状二本鎖複合体を形成し、二本鎖複合体の少なくとも1つの鎖のライゲーションが起こり、このようにして、ライゲーションされた得られた生成物が検出されるのを可能にする場合に、検出シグナルは発生する。

【0075】

【図14】図14は、それらの個々の一本鎖オーバーハングのハイブリダイゼーションにより線状配置で互いに接続された4つの検出プローブを含む二本鎖複合体の非限定的な例である。

【0076】

【図15】図15は、本明細書に記載される例示的な実施形態の標的実体検出アッセイを示す模式図である。一部の実施形態では、別個の標的それぞれのための多数の検出プローブは、生物学的実体（例えば、細胞外小胞）を含む試料に添加される。一部の実施形態では、検出プローブは、オリゴヌクレオチドドメインにカップリングされた標的結合部分（例えば、抗体剤）をそれぞれ含み、これは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む。すべての検出プローブが、同じ生物学的実体（例えば、細胞外小胞または分析物）に近接して局在し、その結果、対応する一本鎖オーバーハングが、ハイブリダイズして、線状二本鎖複合体を形成し、得られた線状二本鎖複合体の少なくとも1つの鎖のライゲーションが起こり、このようにして、ライゲーションされた生成物が検出されるのを可能にする場合に、検出シグナルは発生する。

【0077】

【図16A】図16Aは、「健康な患者」および「がん患者」をシミュレーションすることによる、LUA検出についてのバイオマーカーの組合せの識別力のグラフ表示である。バイオインフォマティクス分析を使用して、5000のシミュレーションされた「健康な患者」および5000のシミュレーションされた「がん患者」からの血漿試料を、それぞれ、正常およびがん組織データベースから無作為に選択した。シミュレーションされた「がん患者」を、1g~1000gの範囲で種々のサイズの腫瘍を持つようにモデル化した。「健康な患者」および「がん患者」の2つのプールに基づいて、99%の特異度でLUAを検出するためのバイオマーカーの組合せの感度を計算した。

【0078】

【図16B】図16Bは、本明細書に記載されたようにして、100gの腫瘍についてのシミュレーションされた感度に基づいて、LUAを検出するための表3のリストからの

10

20

30

40

50

それぞれ可能性があるバイオマーカーの組合せの能力を示す例示的なヒートマップである。それぞれの横列は、1つのバイオマーカーの組合せを表し、それぞれの縦列は、1人のLUADがん患者を表す。明灰色は、LUAD患者のがんが、所与のバイオマーカーの組合せを使用して検出されなかったことを示し、暗灰色は、LUAD患者のがんが、所与のバイオマーカーの組合せを使用して検出されたことを示す。ヒートマップは、100gの腫瘍に基づく感度閾値を示す。

【0079】

【図16C】図16Cは、他のがん型に対する表3のリストに基づくそれぞれ可能性があるLUADバイオマーカーの組合せについてのAUC値を示すヒストグラムである。他のがんに対して比較するために、バイオマーカーの組合せについてのEVスコア（ここで、EVスコアは、所与のバイオマーカーの組合せにおけるすべてのTPM発現値の乗算である）を、肺扁平上皮癌を除いて、がん分子データベース（例えば、Cancer Genome Atlas）における肺腺癌およびすべての他の腫瘍型について計算し、次いで、AUCを計算した。ヒストグラムは、すべての他のがんに対するAUC値の分布を示す。一般に、本明細書に記載されるバイオマーカーの組合せは、他のがん型よりもLUADに特異的であることを示す。

10

【0080】

【図17A】図17Aは、初期肺腺癌（LUAD）の検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから初期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および初期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

20

【0081】

【図17B】図17Bは、末期LUADの検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから末期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および末期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

30

【0082】

【図18A】図18Aは、初期肺扁平上皮細胞癌（LUSC）の検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから初期LUSC試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および初期LUSCのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

40

【0083】

【図18B】図18Bは、末期LUSCの検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから末期LUSC試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および末期LUSCのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

【0084】

【図19A】図19Aは、初期LUADの検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比

50

べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから初期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および初期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

【0085】

【図19B】図19Bは、末期LUADの検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから末期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および末期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

10

【0086】

【図20A】図20Aは、初期LUSCの検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから初期LUSC試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および初期LUSCのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

20

【0087】

【図20B】図20Bは、末期LUSCの検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから末期LUSC試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および末期LUSCのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

30

【0088】

【図21A】図21Aは、初期LUADの検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから初期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および初期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

【0089】

【図21B】図21Bは、末期LUADの検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから末期LUAD試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および末期LUADのプールされた試料から得られたCt値の差を表す。y軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

40

【0090】

【図22A】図22Aは、初期LUSCの検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから初期LUSC試料プールを識別するそれらの能力によって

50

ランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および初期 L U S C のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

【0091】

【図22B】図22Bは、末期 L U S C の検出のための、健康な喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な喫煙者試料プールから末期 L U S C 試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な喫煙者のプールされた試料および末期 L U S C のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

10

【0092】

【図23A】図23Aは、初期 L U A D の検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから初期 L U A D 試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および初期 L U A D のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

20

【0093】

【図23B】図23Bは、末期 L U A D の検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから末期 L U A D 試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および末期 L U A D のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

【0094】

【図24A】図24Aは、初期 L U S C の検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから初期 L U S C 試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および初期 L U S C のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

30

【0095】

【図24B】図24Bは、末期 L U S C の検出のための、健康な非喫煙者試料プールと比べた、ある特定のバイオマーカーの組合せのグラフ表示である。バイオマーカーの組合せを、健康な非喫煙者試料プールから末期 L U S C 試料プールを識別するそれらの能力によってランク付けした（チャートのトップに最も高いランク）。x 軸は、健康な非喫煙者のプールされた試料および末期 L U S C のプールされた試料から得られた C t 値の差を表す。y 軸は、ある特定のバイオマーカーの組合せ（捕捉プローブの標的、検出プローブの標的）を表す。

40

【0096】

【図25】図25は、肺がん（L C）の訓練および検証コホートが、肺腺癌（L U A D）、肺扁平上皮細胞癌（L U S q C）を有する個体、健康な未喫煙者、および健康な喫煙経験者（ever-smoker）を含んでいたことを示す。すべての試料は、R e p r o c e l l から供給されたもの（A C D 血漿）を除いて、K₂E D T A 血漿であった。がん試料を、診断の時および処置の前に収集し、病期分類を、病理学的に決定した。健康な対象は、採

50

血の時にがんの病歴を有しておらず、喫煙状態は、自己報告された。COPDの喫煙経験者は、慢性閉塞性肺疾患と臨床的に診断された。それぞれの試料の1mLアリコートをし、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製し、評価されるさまざまなバイオマーカーの組合せにわたって分け、すべての試料を、二反復で試験した。生体材料は、腫瘍バンクによって提供された。

【0097】

【図26】図26は、8つのバイオマーカーの組合せを含むLCパネルが、118の個々の患者試料のコホートにおいて訓練され、456試料の独立した盲検コホートにおいて検証されたロックされた分類指標をもたらしたことを示す。

【0098】

【図27】(A)例示的なLCパネル(例えば、本明細書に記載されるもの)およびロックされた分類指標に基づく肺がんの確率を要約する箱ひげ図。それぞれのデータポイントは、固有の試料についてのアッセイ反復の中央値を表し、赤色点線は、健康な未喫煙者、健康な喫煙経験者、およびCOPDコホートと比べた、80%の特異度を表す。例示的なLCパネルは、健康な未喫煙者、健康な喫煙経験者、およびCOPDを有する個体にわたって、類似のシグナル分布を示し、喫煙の痕跡が検出されていないことを示す。(B)ステージI/II肺がんを、健康な未喫煙者、健康な喫煙経験者、およびCOPDコホートと比較する例示的なLCパネル(例えば、本明細書に記載されるもの)のROC曲線。開示されるロックされたモデルは、健康な未喫煙者、健康な喫煙経験者、およびCOPDを有する個体からのLUADおよびLUSqCの有望な識別を実証する。

【0099】

【図28】図28は、ステージによって選別された肺がん試料の数およびアッセイ感度を示す。

【0100】

【図29】図29は、例示的なLCアッセイ(例えば、本明細書に記載されるもの)からのシグナルが、腫瘍サイズと相関するが、喫煙歴と相関しないことを示す。

【0101】

【図30】図30は、健康な未喫煙者および健康な喫煙経験者と比較した、スクリーニングで検出されたステージI、II、およびIII/IV肺がんの症例のサブセット分析を示す。それぞれのデータポイントは、固有の試料についてのアッセイ反復の中央値を表し、赤色点線は、健康な未喫煙者、健康な喫煙経験者、およびCOPDコホートと比べた、80%の特異度を表す。例示的なLCアッセイ(例えば、本明細書に記載されるもの)の性能は、スクリーニングで検出された肺がん症例において類似している。

【0102】

【図31】図31は、ルーチンスクリーニングによって検出された肺がん症例における例示的なLCアッセイ(例えば、本明細書に記載されるもの)の性能を示す。

【発明を実施するための形態】

【0103】

ある特定の定義

投与すること：本明細書で使用される場合、「投与すること」または「投与」という用語は、典型的には、薬剤それ自体または組成物に含まれる薬剤の標的部位または処置される部位への送達を達成するための組成物の対象への投与を指す。当業者は、適切な状況で、対象、例えば、ヒトへの投与に利用され得る各種の経路を承知しているであろう。例えば、一部の実施形態では、投与は、非経口であってもよい。一部の実施形態では、投与は、経口であってもよい。一部の実施形態では、投与は、単回用量のみを含んでいてもよい。一部の実施形態では、投与は、固定された数の用量の適用を含んでいてもよい。一部の実施形態では、投与は、断続的な(例えば、時間的に隔たりがある多数回の用量)および/または周期的(例えば、一般的な時間の隔たりがある個々の用量)な投薬である投薬を含み得る。一部の実施形態では、投与は、少なくとも選択された期間の継続的な投薬(例えば、灌流)を含み得る。

10

20

30

40

50

【0104】

親和性剤：「親和性剤」という用語は、本明細書で使用される場合、本明細書に記載される標的結合部分であるか、またはそれを含み、したがって、目的の標的（例えば、バイオマーカーまたはエピトープなどの目的の分子標的）に結合する、実体を指す。多くの実施形態では、本開示による親和性剤は、本明細書に記載されるバイオマーカーと特異的に結合する。多くの実施形態では、本開示による親和性剤は、本明細書に記載される表面バイオマーカーと特異的に結合する。一部の実施形態では、本開示による親和性剤は、本明細書に記載される炭水化物依存性マーカーと特異的に結合する。一部の実施形態では、親和性剤は、抗体剤（例えば、抗体、またはその抗原結合部分であるか、もしくはそれを含む他の実体）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。代替的に、または加えて、一部の実施形態では、親和性剤は、アフィマー、アプタマー、レクチン、シアル酸結合免疫グロブリン型レクチン（s i g l e c s）、およびその組合せ、ならびに／またはリガンドと考えられ得る別の結合剤からなる群から選択されてもよい。一部の実施形態では、親和性剤の標的（例えば、バイオマーカー標的）は、1つまたは複数のポリペプチド、核酸、炭水化物、および／もしくは脂質部分、および／もしくは実体であるか、またはそれを含む。

10

【0105】

薬剤：一般に、「薬剤」という用語は、本明細書で使用される場合、実体（例えば、脂質、金属、核酸、ポリペプチド、多糖、低分子など、またはその複合体、組合せ、混合物または系〔例えば、細胞、組織、器官〕）、または現象（例えば、熱、電流または電場、磁力または磁場など）を指すために使用される。適切な状況では、当業者には文脈から明らかであろうように、この用語は、細胞もしくは器官、またはその画分、抽出物、もしくは構成要素であるか、あるいはそれを含む実体を指すために利用され得る。代替的に、または加えて、文脈が明らかにするであろうように、この用語は、天然で見出されるおよび／または天然から得られる天然産物を指すために使用され得る。一部の事例では、再び文脈から明らかであろうように、この用語は、人間の手作業により設計され、操作され、および／もしくは生成された、ならびに／または天然で見出されないという点で、人工的に作られた1つまたは複数の実体を指すために使用され得る。一部の実施形態では、薬剤は、単離または精製された形態で利用されてもよく、一部の実施形態では、薬剤は、粗製形態で利用されてもよい。一部の実施形態では、可能性のある薬剤は、例えば、それら内の活性な薬剤を同定または特徴付けるためにスクリーニングされ得る、コレクションまたはライブラリーとして提供されてもよい。一部の事例では、「薬剤」という用語は、ポリマーであるか、またはそれを含み、化合物または実体を指し得、一部の事例では、この用語は、1つまたは複数のポリマー部分を含む化合物または実態を指し得る。一部の実施形態では、「薬剤」という用語は、ポリマーではないか、ならびに／あるいは任意のポリマーおよび／または1つもしくは複数の特定のポリマー部分を実質的に含まない、化合物または実体を指し得る。一部の実施形態では、この用語は、任意のポリマー部分を欠くか、またはそれを実質的に含まない、化合物または実体を指し得る。

20

30

【0106】

増幅：「増幅」および「増幅する」という用語は、その初期の量および／またはレベルと比べて、核酸分子の量および／またはレベルの増加をもたらす温度依存性プロセスを指す。温度依存性プロセスは、一般に、プライマー分子の温度依存性伸長を含むプロセスであり、核酸の新たに合成された鎖の配列は、相補的塩基対形成の周知のルール（例えば、Watson, J. D. et al., In: Molecular Biology of the Gene, 4th Ed., W. A. Benjamin, Inc., Menlo Park, Calif. (1987)を参照されたい；本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）によって表される。

40

【0107】

抗体剤：本明細書で使用される場合、「抗体剤」という用語は、特定の抗原に特異的に結合する薬剤を指す。一部の実施形態では、抗体剤は、特定の標的抗原への特異的結合を

50

付与するのに十分な標準的な免疫グロブリン配列エレメントを含むポリペプチドを指す。当技術分野において公知であるように、天然で生成するインタクト抗体は、「Y型」構造と一般に称される互いと会合する2つの同一の重鎖ポリペプチド（それぞれ約50 kD）および2つの同一の軽鎖ポリペプチド（それぞれ約25 kD）から構成されるおよそ150 kDの四量体剤である。それぞれの重鎖は、アミノ末端可変（VH）ドメイン（Y構造の先端に位置する）と、それに続く3つの定常ドメイン：CH1、CH2、およびカルボキシ末端CH3（Yの幹の根元に位置する）の少なくとも4つのドメイン（それぞれ約110 アミノ酸長）から構成される。「スイッチ」として公知の短い領域は、重鎖可変領域および定常領域を接続する。「ヒンジ」は、CH2およびCH3ドメインを抗体の残部に接続する。このヒンジ領域における2つのジスルフィド結合は、インタクト抗体において2つの重鎖ポリペプチドを互いに接続する。それぞれの軽鎖は、別の「スイッチ」によって互いから分離された、アミノ末端可変（VL）ドメインと、それに続くカルボキシ末端定常（CL）ドメインの2つのドメインから構成される。インタクト抗体四量体は、重鎖および軽鎖が単一のジスルフィド結合によって互いに連結された、2つの重鎖-軽鎖二量体から構成され、2つの他のジスルフィド結合は、二量体が互いに接続され、四量体が形成されるように、重鎖ヒンジ領域を互いに接続する。天然に生成される抗体はまた、典型的には、CH2ドメイン上でグリコシル化されている。天然抗体におけるそれぞれのドメインは、圧縮された逆平行ベータバレルにおいて互いに対してパッキングされた2つのベータシート（例えば、3、4または5本鎖シート）から形成される「免疫グロブリンフォールド」によって特徴付けられた構造を有する。それぞれの可変ドメインは、「相補性決定領域」として公知の3つの超可変ループ（CDR1、CDR2、およびCDR3）および4つのいくらか不変の「フレームワーク」領域（FR1、FR2、FR3、およびFR4）を含有する。天然抗体がフォールドすると、FR領域は、ドメインに構造フレームワークを提供するベータシートを形成し、重鎖および軽鎖の両方由来のCDRループ領域は、それらがY構造の先端に位置する単一の超可変抗原結合部位を生じるように、三次元空間で一緒に集まる。天然に存在する抗体のFc領域は、補体系のエレメントに、そしてまた、例えば、細胞傷害性を媒介するエフェクター細胞を含むエフェクター細胞上の受容体に結合する。当技術分野において公知であるように、Fc受容体に対するFc領域の親和性および／または他の結合特質は、グリコシル化または他の改変によりモジュレートすることができる。一部の実施形態では、本発明に従って生成および／または利用される抗体は、グリコシル化のような改変または操作されたFcドメインを含む、グリコシル化Fcドメインを含む。本発明の目的のために、ある特定の実施形態では、天然抗体において見出される十分な免疫グロブリンドメイン配列を含む任意のポリペプチドまたはポリペプチドの複合体は、そのようなポリペプチドが、天然に生成される（例えば、抗原に反応する生物によって作成される）か、あるいは組換え工学、化学合成、または他の人工の系もしくはは方法論によって生成されるかにかかわらず、「抗体」を指すことができ、および／または「抗体」として使用することができる。一部の実施形態では、抗体は、ポリクローナルであり、一部の実施形態では、抗体は、モノクローナルである。一部の実施形態では、抗体は、ウサギ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスターなど）、ラクダ類（例えば、ラマ、アルパカ）、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ウマ、ニワトリ、ロバ、サメ、霊長類、ヒト、または*in vitro*誘導化（例えば、酵母、ファージ）抗体に特徴的である定常領域配列を有する。一部の実施形態では、抗体配列エレメントは、当技術分野において公知であるように、ヒト化、霊長類化、キメラなどである。また、「抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、適切な実施形態では（他に述べられているか、または文脈から明らかでない限り）、代替的な提示において抗体の構造および機能的特色を利用するための当技術分野で公知のまたは開発された構築物またはフォーマットのいずれかを指すことができる。例えば、一部の実施形態では、本発明に従って利用される抗体は、限定されるものではないが、IgA、IgG、IgEまたはIgM抗体；二重または多重特異性抗体（例えば、Zybodyes（登録商標）など）；抗体断片、例えば、Fab断片、Fab'断片、F(ab')₂断片、Fd'断片、Fd断片、および単離されたCDRまた

10

20

30

40

50

はそのセット；一本鎖Fv；ポリペプチド-Fc融合物；シングルドメイン抗体、代替的なスキファールドまたは抗体ミメティック（例えば、アンチカリン、FN3モノボディ、Affibodies、Affilins、Affimers、Affitins、Alphabodies、Avimers、Fynomers、Im7、VLR、VNAR、Trimab、CrossMab、Trident）；ナノボディ、ビナノボディ、F(ab')₂、Fab'、di-sdFv、シングルドメイン抗体、三機能性抗体、ダイボディ、およびミニボディなどから選択されるフォーマットである。一部の実施形態では、関連するフォーマットは、Adnectins（登録商標）；Affibodies（登録商標）；Affilins（登録商標）；Anticalins（登録商標）；Avimers（登録商標）；BiTE（登録商標）；ラクダ化抗体；Centyrins（登録商標）；アンキリンリピートタンパク質またはDARPINs（登録商標）；二重親和性再標的化（DART）剤；Fynomers（登録商標）；サメシングルドメイン抗体、例えば、IgNAR；がんに対する免疫動員モノクローナルT細胞受容体（ImmTACs）；KALBITOR（登録商標）；MicroProteins；Nanobodies（登録商標）ミニボディ；マスク化抗体（例えば、Probodies（登録商標））；小モジュラー免疫医薬（Small Modular Immunopharmaceuticals）（「SMIPs（商標）」）；一本鎖もしくはタンデムダイアボディ（TandAb（登録商標））；TCR様抗体；Trans-bodies（登録商標）；TrimerX（登録商標）；VHHであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、抗体は、天然に生成された場合に有するであろう共有結合性改変（例えば、グリカンの付着）を欠いていてもよい。一部の実施形態では、抗体は、共有結合性改変（例えば、グリカン、ペイロード〔例えば、検出可能部分、治療薬部分、触媒部分など〕または他のペンダント基〔例えば、ポリエチレングリコールなど〕の付着）を含有していてもよい。

10

20

30

40

50

【0108】

抗原：本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、1つまたは複数のエピトープを含み、したがって、親和性剤（例えば、抗体、アフィマー、またはアプタマー）を認識し、結合する、実体（例えば、分子または分子構造、例えば、ペプチドもしくはタンパク質、炭水化物、脂質粒子、オリゴヌクレオチド、化学分子、またはその組合せなど）を指す。

【0109】

およそまたは約：本明細書で使用される場合、「およそ」または「約」という用語は、目的の1つまたは複数の値に適用される場合、述べられた参照値に類似する値を指す。一般に、文脈に精通している当業者は、その文脈における「約」または「およそ」によって包含される変動の関連する程度を認識するであろう。例えば、一部の実施形態では、「およそ」または「約」という用語は、参照値の25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、またはそれ未満以内である値の範囲を包含し得る。

【0110】

アプタマー：本明細書で使用される場合、「アプタマー」という用語は、典型的には、特異的な標的分子（例えば、エピトープ）に結合する、核酸分子またはペプチド分子を指す。一部の実施形態では、核酸アプタマーは、ヌクレオチド配列によって記載されてもよく、典型的には、約15～60ヌクレオチドの長さである。核酸アプタマーは、一本鎖および／もしくは二本鎖構造であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、核酸アプタマーは、DNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、核酸アプタマーは、RNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。任意の理論に縛られることを望まないが、アプタマー中のヌクレオチドの鎖が分子を複合体三次元形状にフォールドする分子内相互作用を形成し、この三次元形状が、アプタマーがその標的分子の表面に緊密に結合することを可能にすることが企図される。一部の実施形態では、ペプチドアプタマーは、タンパク質スキファールドによって提示

される可変配列の1つまたは複数のペプチドループを有すると記載されることがある。ペプチドアダプターは、コンビナトリアルライブラリーから単離することができ、多くの場合に、その後、定方向変異、または可変領域変異誘発および選択のラウンドによって改善することができる。すべての可能なヌクレオチドおよび／またはペプチド配列のユニバース内に存在する分子形状の桁外れの多様性を考慮すると、アダプターは、タンパク質および低分子を含む幅広い分子標的について得られ得る。高い特異性に加えて、アダプターは、典型的には、それらの標的について非常に高い親和性（例えば、タンパク質またはポリペプチドについて、ピコモルから低ナノモルの範囲の親和性）を有する。アダプターは、典型的には、合成分子であるので、アダプターは、各種の改変に適しており、これは、それらの機能を特定の適用のために最適化することができる。

10

【0111】

と関連する：この用語が本明細書で使用される場合、一方の存在、レベルおよび／または形態が、他方のそれらと関連する場合に、2つの事象または実体は、互いに「関連」している。例えば、特定の生物学的現象（例えば、特異的バイオマーカーの発現）は、その存在が肺がん（例えば、関連する集団全体）の発生および／または易罹患性と関連する場合、肺がん（例えば、肺がんの特異的な種類および／または肺がんのステージ）と関連していると考えられる。

【0112】

生物学的実体：適切な状況では、当業者には文脈から明らかであるように、「生物学的実体」という用語は、一部の実施形態では、細胞または生物、例えば、動物またはヒトであり得るか、もしくはそれを含み得る、または一部の実施形態では、生体組織または生体液であり得るか、もしくはそれを含み得る、例えば、一部の実施形態では、対象に由来するか、またはそこから得られる生体試料中に存在する実体もしくは構成要素を指すために利用され得る。一部の実施形態では、生物学的実体は、細胞もしくは微生物、またはその画分、抽出物、もしくは構成要素（例えば、細胞内構成要素、および／または細胞もしくは微生物によって分泌される分子を含む）であるか、あるいはそれを含む。一部の実施形態では、生物学的実体は、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有するナノ粒子であるか、またはそれを含み、これは、一部の実施形態では、対象の体液試料（例えば、限定されるものではないが、血液由来試料）から得られる。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子は、例えば、一部の実施形態では、グリカン、および／もしくは細胞外小胞を含む、タンパク質凝集体であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子は、約30nm～約1000nm、約50nm～約500nm、または約75nm～約500nmの範囲内のサイズを有していてもよい。例えば、一部の実施形態では、生物学的実体は、細胞であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生物学的実体は、細胞外小胞であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生物学的実体は、生物学的分析物（例えば、代謝産物、炭水化物、タンパク質またはポリペプチド、酵素、脂質、細胞小器官、サイトカイン、受容体、リガンド、およびその任意の組合せ）であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、試料中に存在する生物学的実体は、ネイティブ状態にある（例えば、タンパク質またはポリペプチドは、天然に存在するコンフォメーション構造で保持される）。一部の実施形態では、生物学的実体は、例えば、試料から単離すること、または天然に存在する生物学的実体から誘導体化することによって処理される。例えば、生物学的実体を、本明細書に提供される技術を利用して検出するためにより望ましいものであるように、1つまたは複数の化学剤で処理することができる。単に例として、生物学的実体は、固定剤（例えば、限定されるものではないが、メタノールおよび／またはホルムアルデヒド）と接触して、細胞または細胞外小胞に存在するタンパク質および／またはペプチドの架橋の形成を引き起こす、細胞または細胞外小胞であってもよい。一部の実施形態では、生物学的実体は、単離された形態または純粋な形態である（例えば、血液、血清、血漿試料などのような、例えば、体液試料から単離される）。一部の実施形態では、生物学的実体は、複合マトリックス（例えば、血液、血清、または血漿試料などのような、例えば、体液試料）中に存在していてもよい。

20

30

40

50

【0113】

バイオマーカー：「バイオマーカー」という用語は、典型的には、その存在、レベル、程度、種類、および／または形態が、特定の生物学的事象または目的の状態と相関し、その結果、その事象または状態の「マーカー」であると考えられている、実体、事象、または特徴を指す。いくつかの例を挙げれば、一部の実施形態では、バイオマーカーは、特定の疾患状態、または特定の疾患、障害もしくは状態が発生し、起こり、もしくは再発し得る可能性についてのマーカーであってもよく、あるいはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、特定の疾患もしくは治療成績、またはその可能性についてのマーカーであってもよく、あるいはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、特定の組織（例えば、限定されるものではないが、脳、乳房、結腸、卵巣および／または女性生殖系と関連する他の組織、膵臓、前立腺および／または男性生殖系と関連する他の組織、肝臓、肺、ならびに皮膚）についてのマーカーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。特定の組織についてのそのようなマーカーは、一部の実施形態では、健康な組織に特異的であってもよく、罹患組織に特異的であってもよく、または一部の実施形態では、正常な健康な組織および罹患組織（例えば、腫瘍）に存在していてもよく、本開示を読む当業者は、それぞれのそのような種類のバイオマーカーについての適切な状況を認識するであろう。一部の実施形態では、バイオマーカーは、がん特異的マーカー（例えば、特定のがんに特異的であるマーカー）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、非特異的がんマーカー（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多くのがんに存在するマーカー）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。非特異的がんマーカーは、一部の実施形態では、がんについての一般的なマーカー（例えば、組織の種類にかかわらず、がんに典型的に存在するマーカー）、または一部の実施形態では、特異的な組織（例えば、限定されるものではないが、脳、乳房、結腸、卵巣および／または女性生殖系と関連する他の組織、膵臓、前立腺および／または男性生殖系と関連する他の組織、肝臓、肺、および皮膚）のがんについてのマーカーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。そのため、一部の実施形態では、バイオマーカーは、予測的であり、一部の実施形態では、バイオマーカーは、予後的であり、一部の実施形態では、バイオマーカーは、目的の関連する生物学的事象または状況について診断的である。バイオマーカーは、任意の化学クラスの実体であってもよく、またはそれを含んでいてもよく、実体の組合せであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、バイオマーカーは、核酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物、低分子、無機剤（例えば、金属またはイオン）、もしくはその組合せであってもよく、またはそれらを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、特定の分子、複合体、もしくは構造の一部分であるか、またはそれを含み、例えば、一部の実施形態では、バイオマーカーは、エピトープであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、肺がんに関連する細胞外小胞の表面マーカー（例えば、表面マーカー）である。一部の実施形態では、バイオマーカーは、小胞内（例えば、細胞外小胞内に存在するタンパク質またはRNAマーカー）である。一部の実施形態では、バイオマーカーは、遺伝的もしくはエピジェネティックシグネチャーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーは、遺伝子発現シグネチャーであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、本開示に従う使用のために適切な「バイオマーカー」は、標的マーカーに存在する分子実体（例えば、エピトープ）の存在、レベル、および／または形態を指し得る。例えば、一部の実施形態では、分子実体としての2つまたはそれよりも多くの「バイオマーカー」（例えば、エピトープ）は、同じ標的マーカー（例えば、バイオマーカー、例えば、細胞外小胞に存在する表面バイオマーカー）上に存在していてもよい。

【0114】

血液由来試料：「血液由来試料」という用語は、本明細書で使用される場合、それを必要とする対象の血液試料（すなわち、全血試料）に由来する試料を指す。血液由来試料の例としては、限定されるものではないが、血漿（例えば、新鮮凍結血漿を含む）、血清、

10

20

30

40

50

血液画分、血漿画分、血清画分、赤血球（RBC）、血小板、白血球などを含む血液画分、およびその画分を含む細胞溶解物（例えば、細胞、例えば、赤血球、白血球などは、細胞溶解物を得るために回収および溶解され得る）が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載される方法、システム、および／またはキットで使用される血液由来試料は、血漿試料である。

【0115】

がん：「がん」という用語は、本明細書では、一般に、目的の組織の細胞が、相対的に異常な、無制御の、および／または自律的な成長を示し、その結果、それらが、細胞増殖の制御の著しい喪失によって特徴付けられる異常な成長表現型を示す、疾患または状態を指すために使用される。一部の実施形態では、がんは、前がん状態（例えば、良性）、悪性、転移前、転移性、および／または非転移性である細胞を含み得る。本開示は、肺がんの検出のための技術を提供する。

10

【0116】

捕捉アッセイ：本明細書で使用される場合、「捕捉アッセイ」という用語は、目的の生物学的実体を、試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料）から単離するまたは分離するプロセスを指す。一部の実施形態では、目的の生物学的実体は、本明細書に記載される捕捉プローブを使用して、試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料）から単離または分離される。一部の実施形態では、本明細書に記載される捕捉プローブに結合する目的の生物学的実体は、本明細書に記載される検出アッセイに供される。一部の実施形態では、本明細書に記載される捕捉アッセイに適した目的の生物学的実体は、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子は、約30nm～約1000nm、約50nm～約500nm、または約75nm～約500nmの範囲内のサイズを有していてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される捕捉アッセイに適した目的の生物学的実体は、目的の細胞外小胞（例えば、一部の実施形態では、エキソソーム）であるか、またはそれを含む。

20

【0117】

捕捉プローブ：本明細書で使用される場合、「捕捉プローブ」という用語は、目的の生物学的実体を、試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料）から捕捉するための捕捉剤を指す。本明細書に記載される多くの実施形態では、捕捉剤は、目的の生物学的実体の表面ポリペプチドに結合する少なくとも1つの標的捕捉部分を含む。一部の実施形態では、そのような目的の生物学的実体は、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、そのようなナノ粒子は、約30nm～約1000nm、約50nm～約500nm、または約75nm～約500nmの範囲内のサイズを有していてもよい。一部の実施形態では、そのような目的の生物学的実体は、細胞外小胞（例えば、一部の実施形態では、エキソソーム）を含む。一部の実施形態では、捕捉剤は、例えば、細胞外小胞（例えば、一部の実施形態では、エキソソーム）を含む、約30nm～約1000nmの範囲内のサイズを有するナノ粒子の表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）に結合する少なくとも1つの標的部分を含む。一部の実施形態では、捕捉剤の標的捕捉部分は、本明細書に記載される親和性剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、捕捉剤の標的捕捉部分は、抗体剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、捕捉剤の標的捕捉部分は、レクチンもしくはシアル酸結合免疫グロブリン型レクチンであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、捕捉剤は、その標的捕捉部分がそれらに固定化されるように、固体基材を含んでいてもよい。一部の実施形態では、例示的な固体基材は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）である。一部の実施形態では、捕捉プローブは、本明細書に記載される表面バイオマーカーに特異的に結合する標的捕捉部分を含む磁気ビーズの集団であるか、またはそれを含む。

30

40

【0118】

分類カットオフ：本明細書で使用される場合、「分類カットオフ」という用語は、例え

50

ば、集団の2つまたはそれよりも多くのサブセット（例えば、正常な健康な対象および炎症状態を有する対象対肺癌対象）の中で1つまたは複数の境界線を規定することによって、疾患または状態（例えば、肺癌）についての対象のリスクを予測するために使用される、レベル、値、もしくはスコア、または値のセット、または指標を指す。一部の実施形態では、分類カットオフは、必要に応じて、他の適切な変数、例えば、対象の年齢、生活歴関連リスク因子、遺伝的因子、身体的および／または医学的状态と組み合わせて、本明細書に記載される標的バイオマーカーシグネチャーについての少なくとも1つの参照閾値レベル（例えば、参照カットオフ）を参照して決定されてもよい。分類が単一の標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、本明細書に記載される通り）に基づく一部の実施形態では、分類カットオフは、単一の標的バイオマーカーシグネチャーについて事前に決定された参照閾値（例えば、カットオフ）と同じであってもよい。分類が2つまたはそれよりも多く（例えば、2、3、4、またはそれよりも多く）の標的バイオマーカーシグネチャーに基づく一部の実施形態では、分類カットオフは、対応する標的バイオマーカーシグネチャーについてそれぞれ個々に事前に決定された2つまたはそれよりも多くの参照閾値（例えば、カットオフ）を参照してもよく、必要に応じて、1つまたは複数の適切な変数、例えば、対象の年齢、生活歴関連リスク因子、遺伝的因子、身体的および／または医学的状态を組み込んでよい。一部の実施形態では、分類カットオフは、必要に応じて、他の適切な変数、例えば、対象の年齢、生活歴関連リスク因子、遺伝的因子、身体的および／または医学的状态と組み合わせて、本明細書に記載される標的バイオマーカーシグネチャーについての少なくとも1つの参照閾値レベル（例えば、参照カットオフ）を参照するコンピュータアルゴリズム媒介解析を介して決定されてもよい。

10

20

【0119】

近接：「近接」という用語は、本明細書で使用される場合、検出プローブ間の相互作用（例えば、個々のオリゴヌクレオチドドメインによる）がおそらく起こると予測されるように十分に近い2つの検出プローブ（例えば、一対における2つの検出プローブ）間の距離を指す。例えば、一部の実施形態では、ある期間にわたって2つの検出プローブが互いに相互作用する（例えば、個々のオリゴヌクレオチドドメインによる）確率は、既定の条件下（例えば、検出プローブが細胞外小胞において個々の標的に結合する場合）で互いに十分に近接している場合に、例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも50%またはそれよりも高い。一部の実施形態では、2つの検出プローブ間の距離は、それらが互いに十分に近接している場合に、およそ0.1~1000nmの間、または0.5~500nmの間、または1~250nmの間の範囲であってもよい。一部の実施形態では、2つの検出プローブ間の距離は、それらが互いに十分に近接している場合に、およそ0.1~10nmの間、またはおよそ0.5~5nmの間であってもよい。一部の実施形態では、2つの検出プローブ間の距離は、それらが互いに十分に近接している場合に、例えば、90nm未満、80nm未満、70nm未満、60nm未満、50nm未満、40nm未満、30nm未満、20nm未満、10nm未満、5nm未満、1nm未満、またはそれよりも短いものを含んで、100nm未満またはそれよりも短くてもよい。一部の実施形態では、2つの検出プローブ間の距離は、それらが互いに十分に近接している場合に、およそ40~1000nmの間、または40nm~500nmの間の範囲であってもよい。

30

40

【0120】

比較可能な：本明細書で使用される場合、「比較可能な」という用語は、互いに同一でなくてもよいが、それらの間の比較を可能にするのに十分に類似しており、その結果、当業者が、観察される相違または類似性に基づいて結論を合理的に導き出し得ると認識するであろう、2つまたはそれよりも多くの薬剤、実体、状況、条件のセットなどを指す。一部の実施形態では、条件、状況、個体、または集団の比較可能なセットは、多数の実質的に同一の特色および種々の特色のうちの1つまたは少ない数によって特徴付けられる。当業者は、文脈において、任意の所与の状況で2つまたはそれよりも多くのそのような薬剤、実体、状況、条件のセットなどが比較可能と考えられるのにどの程度の同一性が必要と

50

されるかを理解するであろう。例えば、当業者は、状況、個体、または集団の異なるセット下で得られた結果、またはそれを用いて観察された現象の相違が、変化した特色における変動によって引き起こされるか、またはそれを示すという合理的な結論を保証するために十分な数および種類の実質的に同一の特色によって特徴付けられた場合に、状況、個体、または集団のセットは互いに比較可能であると認識するであろう。

【0121】

相補的：本明細書で使用される場合、核酸塩基対形成の文脈における「相補的」という用語は、塩基対形成規則によって関連付けられるオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを指す。例えば、配列「C-A-G-T」は、配列「G-T-C-A」に相補的である。相補性は、部分的または全体的であり得る。そのため、任意の程度の部分的相補性は、部分的相補性がオリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションを許容するという条件で、「相補的」という用語の範囲内に含まれることが意図される。部分的相補性は、1つまたは複数の核酸塩基が、塩基対形成規則に従ってマッチしない場合である。核酸間の全体的または完全相補性は、ありとあらゆる核酸塩基が、塩基対形成規則の下で別の塩基とマッチする場合である。特定のがんの検出のためのバイオマーカーの組合せを同定する文脈では、「相補性」という用語は、本明細書において、異なる情報内容（例えば、別個の、実質的に重複しない対象のサブグループにおけるがんを検出する能力）を有するバイオマーカーのセットを参照して使用される。例えば、セット1およびセット2のバイオマーカーの2つのセットは、例えば、セット1が、集団中の対象の群（例えば、群A）においてがんを検出し、セット2が、群Aにおいてではなく、同じ集団中の対象の実質的に別々のおよび重複しない群（例えば、群B）においてがんを検出する場合に、互いに「相補的」とあると言われる。同様に、セット1は、群B中のかなりの数の対象においてがんを検出しない。

【0122】

検出すること：「検出すること」という用語は、本明細書において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを発現する細胞外小胞またはそのような細胞外小胞を示す測定の任意の形態の存在または非存在を決定する適切な手段を含むように広く使用される。そのため、「検出すること」は、任意の方法で標的バイオマーカーシグネチャーの部分に対応する目的の実体（例えば、表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、または小胞内RNAバイオマーカー）の存在もしくは非存在、レベル、量、および／または場所を決定すること、測定すること、査定すること、またはアッセイすることを含み得る。一部の実施形態では、「検出すること」は、目的の実体（例えば、タンパク質バイオマーカーおよび／もしくは小胞内バイオマーカーを示すライゲーションされた鑄型、または小胞内mRNAを示すPCR増幅産物）を示す測定の形態を決定すること、測定すること、査定すること、または定量化することを含み得る。半定量的を含んで、定量的および定性的な決定、測定または査定が含まれる。そのような決定、測定または査定は、例えば、目的の実体（例えば、表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、または小胞内RNAバイオマーカー）またはそれを示す測定の形態が、対照参照、または絶対的なものと比べて検出される場合に、相対的であり得る。そのため、「定量化すること」という用語は、目的の実体（例えば、表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、または小胞内RNAバイオマーカー）またはそれを示す測定の形態を定量化する文脈において使用される場合、絶対的または相対的定量化を指し得る。絶対的定量化は、目的の実体（例えば、表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、または小胞内RNAバイオマーカー）の検出されたレベルまたはそれを示す測定の形態を、公知の対照標準に相関させることによって（例えば、標準曲線の作成により）達成されてもよい。あるいは、相対的定量化は、2つまたはそれよりも多くの異なる目的の実体（例えば、異なる表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、または小胞内RNAバイオマーカー）間で検出されたレベルまたは量を比較して、目的の2つまたはそれよりも多くの異なる実体のそれぞれの、すなわち、互いと比べた、相対的定量化を提供することによって達成することができる。

【0123】

検出標識：「検出標識」という用語は、本明細書で使用される場合、検出可能である、任意の元素、分子、官能基、化合物、断片または部分を指す。一部の実施形態では、検出標識は、単独で提供または利用される。一部の実施形態では、検出標識は、別の薬剤との会合（例えば、接合させる）において、提供および／または利用される。検出標識の例としては、限定されるものではないが、さまざまなリガンド、放射性核種（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{135}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{64}Cu 、 ^{187}Re 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{177}Lu 、 ^{89}Zr など）、蛍光色素、化学発光剤（例えば、アクリジニウムエステル、安定化ジオキセタンなどのような）、生物発光剤、スペクトル分解可能な無機蛍光半導体ナノ結晶（すなわち、量子ドット）、金属ナノ粒子（例えば、金、銀、銅、白金など）ナノクラスター、常磁性金属イオン、酵素、比色標識（例えば、色素、コロイド金などのような）、ビオチン、ジゴキシゲニン、ハプテン、および抗血清またはモノクローナル抗体が利用可能であるタンパク質が挙げられる。

10

【0124】

検出プローブ：「検出プローブ」という用語は、典型的には、特異的標的の検出および／または定量化を対象にするプローブを指す。一部の実施形態では、検出プローブは、特異的標的のレベルを表す指標を提供する定量化プローブである。本開示によれば、検出プローブは、オリゴヌクレオチドドメインに直接的または間接的にカップリングした標的結合実体を含む組成物を指し、ここで、標的結合実体は、個々の標的（例えば、分子標的）に特異的に結合し、オリゴヌクレオチドドメインの少なくとも一部分は、別個の標的のための別の検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインの一部分とのハイブリダイゼーションを可能にするように設計される。多くの実施形態で、本開示による使用のために適切なオリゴヌクレオチドドメインは、二本鎖部分、および少なくとも1つの一本鎖オーバーハングを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、二本鎖部分、および二本鎖部分のそれぞれの末端の一本鎖オーバーハングを含んでいてもよい。一部の実施形態では、検出プローブの標的結合実体は、本明細書に記載される親和性剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、検出プローブの標的結合実体は、抗体剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、検出プローブの標的結合実体は、レクチンもしくはシアル酸結合免疫グロブリン型レクチン（s i g l e c）であるか、またはそれを含む。

20

【0125】

二本鎖：本明細書で使用される場合、オリゴヌクレオチドドメインの文脈における「二本鎖」という用語は、一対のオリゴヌクレオチドが、水素結合したらせん配置で、典型的には、例えば、DNAなどの核酸と会合して存在していることが当業者によって理解される。二本鎖オリゴヌクレオチドの100%相補的形態に加えて、「二本鎖」という用語は、本明細書で使用される場合、ミスマッチ（例えば、部分的相補性）および／またはバルジ、ループ、もしくはヘアピンとしての構造的特色を含むそれらの形態を指すことも意味する。

30

【0126】

二本鎖複合体：本明細書で使用される場合、「二本鎖複合体」という用語は、典型的には、検出プローブの相補的一本鎖オーバーハングのハイブリダイゼーションにより線状配置で互いに接続またはカップリングされた標的（同じ標的または別個の標的であり得る）をそれぞれ対象にする少なくとも2つまたはそれよりも多く（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれよりも多くを含む）の検出プローブ（例えば、本明細書で提供されるおよび／または利用される通り）を含む複合体を指す。一部の実施形態では、そのような二本鎖複合体は、細胞外小胞を含んでいてもよく、検出プローブの個々の標的結合部分は、細胞外小胞に同時に結合している。

40

【0127】

エピトープ：本明細書で使用される場合、「エピトープ」という用語は、親和性剤（例えば、限定されるものではないが、抗体、アフィマー、および／またはアプタマー）によ

50

って特異的に認識される任意の部分を含む。一部の実施形態では、エピトープは、抗原上の多数の化学原子または基から構成される。一部の実施形態では、そのような化学原子または基は、抗原に関連する三次元コンフォメーションを採用する場合に、表面に露出する。一部の実施形態では、そのような化学原子または基は、抗原がそのようなコンフォメーションを採用する場合に、空間において、物理的に互いに近い。一部の実施形態では、基である少なくとも一部のそのような化学原子は、抗原が代替コンフォメーションを採用する（例えば、線状化されている）場合に、物理的に互いから分離されている。

【0128】

細胞外小胞：本明細書で使用される場合、「細胞外小胞」という用語は、典型的には、例えば、細胞によって分泌される、細胞の外側の小胞を指す。分泌される小胞の例としては、限定されるものではないが、エキソソーム、微小小胞体、マイクロ粒子、エクソソーム、オンコソーム、およびアポトーシス小体挙げられる。理論に縛られることを望まないが、エキソソームは、多胞性エンドソーム（MVE）の境界膜の内側への出芽によって形成され得る細胞内起源のナノメートルサイズの小胞体（例えば、40 nm～120 nm）である一方で、微小小胞体は、典型的には、細胞表面から出芽し、それらのサイズは、50 nm～1000 nmで変わり得る。一部の実施形態では、細胞外小胞は、エキソソームおよび／もしくは微小小胞体であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、細胞外小胞を含む試料は、アポトーシス小体を実質的に含まない。一部の実施形態では、ナノ粒子を含む試料は、1つまたは複数の組織（例えば、がん性組織および／または非がん性もしくは健康な組織）から脱落するか、またはそれに由来する細胞外ナノ粒子を含んでいてもよい。一部の実施形態では、試料中の細胞外小胞は、肺がん腫瘍から脱落するか、またはそれに由来していてもよく、一部の実施形態では、細胞外小胞は、非肺がんの腫瘍から脱落するか、またはそれに由来する。一部の実施形態では、細胞外小胞は、健康な組織から脱落するか、またはそれに由来する。一部の実施形態では、細胞外小胞は、良性肺腫瘍から脱落するか、またはそれに由来する。一部の実施形態では、細胞外小胞は、肺がんに関連する症状（例えば、非特異的症状）を有する対象の組織から脱落するか、またはそれに由来する。

【0129】

細胞外小胞関連膜結合ポリペプチド：本明細書で使用される場合、そのような用語は、細胞外小胞の膜に存在するポリペプチドを指す。一部の実施形態では、そのようなバイオマーカーは、膜の細胞外側と関連していてもよい。一部の実施形態では、そのようなポリペプチドは、腫瘍特異的であってもよい。一部の実施形態では、そのようなポリペプチドは、組織特異的（例えば、肺組織特異的）であってもよい。一部の実施形態では、そのようなポリペプチドは、非特異的であってもよく、例えば、これは、1つもしくは複数の非標的腫瘍、および／または1つもしくは複数の非標的組織に存在する。

【0130】

ハイブリダイゼーション：本明細書で使用される場合、「ハイブリダイズすること」、「ハイブリダイズする」、「ハイブリダイゼーション」、「アニールすること」、または「アニールする」という用語は、ハイブリダイズ複合体を形成する塩基対形成により核酸のある鎖が相補鎖に接合される任意のプロセスを使用する相補的核酸の対形成に言及する際に、互換的に使用される。ハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションの強さ（例えば、核酸間の会合の強さ）は、例えば、核酸間の相補性の程度、関与する条件のストリンジェンシー、形成されるハイブリダイゼーション複合体の融解温度（T）、および核酸内のG：C比を含むさまざまな因子によって影響を受ける。

【0131】

小胞内タンパク質バイオマーカー：本明細書で使用される場合、「小胞内タンパク質バイオマーカー」という用語は、生物学的実体（例えば、細胞または細胞外小胞）内に存在するポリペプチドの状態（例えば、存在、レベル、および／または活性）を示すマーカーを指す。多くの実施形態では、小胞内バイオマーカーは、細胞外小胞と会合しているか、またはその中に存在する。一部の実施形態では、小胞内タンパク質バイオマーカーは、リ

ン酸化ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、小胞内タンパク質バイオマーカーは、変異ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0132】

小胞内RNAバイオマーカー：本明細書で使用される場合、「小胞内RNAバイオマーカー」という用語は、生物学的実体（例えば、細胞または細胞外小胞）内に存在するRNA（例えば、限定されるものではないが、mRNA、および例えば、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNA、マイクロRNA、環状RNAなどのようなノンコーディングRNA）の状態（例えば、存在および／またはレベル）を示すマーカーを指す。多くの実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、細胞外小胞と会合しているか、またはその中に存在する。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、がんに関連するか、またはがんの特異的である。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、mRNA転写物であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、ノンコーディングRNAであるか、またはそれを含む。例示的なノンコーディングRNAとしては、限定されるものではないが、核内低分子RNA、マイクロRNA (miRNA)、核小体低分子RNA (snRNA)、環状RNA (circRNA)、長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA)、小型ノンコーディングRNA、piwi相互作用RNAなどが挙げられ得る。がんのためのある特定のRNAバイオマーカーは、先行技術、例えば、Xi et al. "RNA Biomarkers: Frontier of Precision Medicine for Cancer" Noncoding RNA (2017) 3:9に記載されており、その内容は、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、オーファンノンコーディングRNA (oncRNA) であるか、またはそれを含む。がん特異的である、ある特定のoncRNAは、例えば、Teng et al. "Orphan noncoding RNAs: novel regulators and cancer biomarkers" Ann Transl Med (2019) 7:S21; Fish et al. "Cancer cells exploit an orphan RNA to drive metastatic progression" Nature Medicine (2018) 24: 1743-1751; 国際特許公開第WO2019/094780号に記載されているように、参考文献で同定および記載されており、そのそれぞれは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、長鎖ノンコーディングRNAであるか、またはそれを含む。がんのためのある特定のノンコーディングRNAバイオマーカーは、例えば、Qian et al. "Long Non-coding RNAs in Cancer: Implications for Diagnosis, Prognosis, and Therapy" Front. Med. (2020) Volume 7, Article 612393に記載されているように、当技術分野で記載されており、その内容は、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、piwiRNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、miRNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、snRNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、小胞内RNAバイオマーカーは、circRNAであるか、またはそれを含む。

【0133】

リガーゼ：本明細書で使用される場合、「リガーゼ」または「核酸リガーゼ」という用語は、核酸をライゲーションする使用のための酵素を指す。一部の実施形態では、リガーゼは、ポリヌクレオチドの3'末端をポリヌクレオチドの5'末端にライゲーションする使用のための酵素である。一部の実施形態では、リガーゼは、付着末端ライゲーションを行う使用のための酵素である。一部の実施形態では、リガーゼは、平滑末端ライゲーションを行う使用のための酵素である。一部の実施形態では、リガーゼは、DNAリガーゼであるか、またはそれを含む。

【0134】

10

20

30

40

50

生活歴関連リスク因子：本明細書で使用される場合、「生活歴リスク因子」という用語は、そのような活動、経験、病歴、および／または曝露をそれらの生活において有さない個体と比べて、ある状態、例えば、肺がんについての個体のリスクを直接的または間接的に増加させ得るそれらの生活における個体の活動、経験、病歴、および／または曝露を指す。一部の実施形態では、生活歴関連リスク因子の非限定的な例としては、喫煙、アルコール、薬物、発がん物質、食事、肥満、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、身体活動、日光曝露、放射線曝露、瀝青煙曝露、ウイルスおよび細菌などの感染病原体への曝露、ならびに／または職業上の危険が挙げられる（例えば、Jyoti Malhotra et al., "Risk Factors for Lung Cancer Worldwide" European Respiratory Journal (2016) 48: 889-902を参照されたい；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。当業者は、がん（例えば、肺がん）易罹患性に寄与する生活歴関連リスク因子の上記のリストが、網羅的ではなく、絶えず進化していることを認識する。

10

【0135】

ライゲーション：本明細書で使用される場合、「ライゲーションする」、「ライゲーションすること」または「ライゲーション」という用語は、2つのオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを接合するための当技術分野において公知の方法または組成物を指す。ライゲーションは、付着末端ライゲーションもしくは平滑末端ライゲーションであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供される技術に關与するライゲーションは、付着末端ライゲーションであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ライゲーションは、ポリヌクレオチドの3'末端をポリヌクレオチドの5'末端に接合することを指す。一部の実施形態では、ライゲーションは、核酸リガーゼの使用によって容易にされる。

20

【0136】

ナノ粒子：「ナノ粒子」という用語は、検出アッセイ（例えば、本明細書に記載される通り）のための試料の文脈で使用される場合、約30nm～約1000nmの範囲のサイズを有する粒子を指す。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約30nm～約750nmの範囲のサイズを有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約50nm～約750nmの範囲のサイズを有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約30nm～約500nmの範囲のサイズを有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、約50nm～約500nmの範囲のサイズを有する。一部の実施形態では、ナノ粒子は、例えば、一部の実施形態では、サイズ排除に基づく方法（例えば、一部の実施形態では、サイズ排除クロマトグラフィー）によって、対象の体液試料から得られる。一部の実施形態では、ナノ粒子は、分析物凝集体であるか、またはそれを含み、これは、一部の実施形態では、タンパク質もしくはムチン凝集体であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、ナノ粒子は、タンパク質多量体であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は、細胞外小胞であるか、またはそれを含む。

30

【0137】

非がん対象：本明細書で使用される場合、「非がん対象」という用語は、一般に、非良性肺がんを有さない対象を指す。例えば、一部の実施形態では、非がん対象は、健康な対象である。一部の実施形態では、非がん対象は、55歳より下の健康な対象である。一部の実施形態では、非がん対象は、55歳またはそれを超える健康な対象である。一部の実施形態では、非がん対象は、非肺関連の健康上の疾患、障害、または状態を有する対象である。一部の実施形態では、非がん対象は、良性肺腫瘍（例えば、胸腔または肺腔において観察される良性腫瘍）を有する対象である。

40

【0138】

核酸／オリゴヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、少なくとも10のヌクレオチドまたはそれよりも多くのヌクレオチドのポリマーを指す。一部の実施形態では、核酸は、DNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸は、RNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸は、ペプチド核酸

50

(PNA)であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸は、一本鎖核酸であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸は、二本鎖核酸であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、核酸は、一本鎖部分および二本鎖部分の両方を含む。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数のホスホジエステル連結を含む骨格を含む。一部の実施形態では、核酸は、ホスホジエステルおよび非ホスホジエステル連結の両方を含む骨格を含む。例えば、一部の実施形態では、核酸は、例えば、「ペプチド核酸」においてのように、1つもしくは複数のホスホリボースもしくは5'-N-ホスホラミダイト連結、および／または1つもしくは複数のペプチド結合を含む骨格を含んでもよい。一部の実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の、またはすべての天然残基（例えば、アデニン、シトシン、デオキシアデノシン、デオキシチジン、デオキシグアノシン、デオキシチミジン、グアニン、チミン、ウラシル）を含む。一部の実施形態では、核酸は、1つもしくは複数の、またはすべての非天然残基を含む。一部の実施形態では、非天然残基は、ヌクレオシドアナログ（例えば、2-アミノアデノシン、2-チオチミジン、イノシン、ピロロピリミジン、3-メチルアデノシン、5-メチルチジン、C-5プロピニルチジン、C-5プロピニルウリジン、2-アミノアデノシン、C5-プロモウリジン、C5-フルオロウリジン、C5-ヨードウリジン、C5-プロピニルウリジン、C5-プロピニルチジン、C5-メチルチジン、2-アミノアデノシン、7-デアザアデノシン、7-デアザグアノシン、8-オキソアデノシン、8-オキソグアノシン、6-0-メチルグアニン、2-チオチジン、メチル化塩基、インターカレート化塩基、およびその組合せ）を含む。一部の実施形態では、非天然残基は、天然残基におけるものと比較して、1つまたは複数の改変糖（例えば、2'-フルオロリボース、リボース、2'-デオキシリボース、アラビノース、およびヘキソース）を含む。一部の実施形態では、核酸は、RNAまたはポリペプチドなどの機能性遺伝子産物をコードするヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸は、1つまたは複数のイントロンを含むヌクレオチド配列を有する。一部の実施形態では、核酸は、天然起源からの単離、酵素的合成（例えば、*in vivo*もしくは*in vitro*での、例えば、相補的鋳型に基づく重合、組換え細胞もしくは系における再生産、または化学合成によって調製されてもよい。一部の実施形態では、核酸は、少なくとも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、もしくは20,000、またはそれよりも多くの残基またはヌクレオチド長である。

10

20

30

40

50

【0139】

ヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、その当技術分野において認識される意味を指す。ヌクレオチドの数が、例えば、オリゴヌクレオチドのサイズの指標として使用される場合に、ヌクレオチドのある特定の数は、例えば、オリゴヌクレオチドの一本鎖上のヌクレオチドの数を指す。

【0140】

患者：本明細書で使用される場合、「患者」という用語は、疾患もしくは障害もしくは状態を患っているか、そのリスクを有する任意の生物を指す。典型的な患者としては、動物（例えば、哺乳類、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、および／またはヒト）が挙げられる。一部の実施形態では、患者は、ヒトである。一部の実施形態では、患者は、1つもしくは複数の疾患または障害もしくは状態を患っているか、または

それに罹患しやすい。一部の実施形態では、患者は、疾患または障害または状態の1つまたは複数の症状を示す。一部の実施形態では、患者は、1つまたは複数の疾患または障害または状態を有すると診断されている。一部の実施形態では、提供される技術に適した疾患または障害または状態は、がん、または1つもしくは複数の腫瘍の存在であるか、あるいはそれを含む。一部の実施形態では、患者は、疾患、障害、もしくは状態を診断するためのおよび／または処置するためのある特定の療法を受けているか、あるいは受けていた。

【0141】

ポリペプチド：「ポリペプチド」という用語は、本明細書で使用される場合、典型的には、少なくとも3つのアミノ酸またはそれよりも多くのアミノ酸のポリマーの、その当技術分野において認識される意味を有する。当業者は、「ポリペプチド」という用語が、本明細書で列挙される完全な配列を有するポリペプチドを包含するだけでなく、そのような完全なポリペプチドの機能的な、生物学的に活性な、または特徴的な断片、部分もしくはドメイン（例えば、少なくとも1つの活性を保持している断片、部分、またはドメイン）を表すポリペプチドも包含するように十分に一般的であることが意図されることを認識するであろう。一部の実施形態では、ポリペプチドは、L-アミノ酸、D-アミノ酸、もしくはその両方を含んでいてもよく、および／または当技術分野において公知の各種のアミノ酸改変もしくはアナログのいずれかを含有していてもよい。有用な改変としては、例えば、末端アセチル化、アミド化、グリコシル化、脂質化、メチル化などが挙げられる。一部の実施形態では、ポリペプチドは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、合成アミノ酸、およびその組合せを含んでいてもよい（例えば、ペプチドミメティックであってもよく、またはそれを含んでいてもよい）。

【0142】

防止する、または防止：本明細書で使用される場合、「防止する」または「防止」は、疾患、障害、および／または状態の発生に関連して使用される場合、疾患、障害および／もしくは状態が発生するリスクを低減すること、ならびに／または疾患、障害もしくは状態の1つもしくは複数の特徴もしくは症状の開始を遅延させることを指す。防止は、疾患、障害または状態の開始が事前に規定された期間、遅延されている場合に、完全と考えられ得る。

【0143】

プライマー：本明細書で使用される場合、「プライマー」という用語は、核酸鎖に相補的であるプライマー伸長産物の合成が誘導される条件下（例えば、ヌクレオチドおよび誘導剤、例えば、DNAポリメラーゼの存在下、ならびに適切な温度およびpHに）置いた場合に、合成の開始点として作用することができるオリゴヌクレオチドを指す。プライマーは、好ましくは、増幅における最大効率のために一本鎖である。プライマーは、誘導剤の存在下、伸長産物の合成をプライムするために十分に長くなければならない。プライマーの正確な長さは、多くの因子、例えば、所望のアニーリング温度などに依存し得る。

【0144】

参照：本明細書で使用される場合、「参照」は、比較が行われるものに対する標準または対照を記載する。例えば、一部の実施形態では、目的の薬剤、動物、個体、集団、試料、配列または値は、参照または対照の薬剤、動物、個体、集団、試料、配列または値と比較される。一部の実施形態では、参照または対照は、目的の試験または決定と実質的に同時に、試験および／または決定される。一部の実施形態では、参照または対照は、必要に応じて、有形媒体中で具現化される歴史的参照または対照である。一部の実施形態では、標的の参照レベルの文脈における参照または対照は、正常で健康な対象または正常で健康な対象の集団における標的のレベルを指す。一部の実施形態では、標的の参照レベルの文脈における参照または対照は、処置前の対象における標的のレベルを指す。典型的には、当業者によって理解されるであろうように、参照または対照は、査定中のものに対して、比較可能な条件または状況下で、決定または特徴付けられる。一部の実施形態では、細胞株由来細胞外小胞が、参照または対照として使用される。当業者は、特定の可能な参照ま

たは対照に対する信頼性および／またはそれとの比較を正当化するために十分な類似性が存在する場合を認識するであろう。

【0145】

リスク：文脈から理解されるであろうように、疾患、障害、および／または状態の「リスク」は、特定の個体が、疾患、障害、および／または状態を発生する可能性を指す。一部の実施形態では、リスクは、パーセンテージとして表される。一部の実施形態では、リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90から最高で100%までである。一部の実施形態では、リスクは、参照試料または参照試料の群と関連するリスクと比べたリスクとして表される。一部の実施形態では、参照試料または参照試料の群は、疾患、障害、状態および／または事象の公知のリスクを有する。一部の実施形態では、参照試料または参照試料の群は、特定の個体と比較可能な個体由来である。一部の実施形態では、相対的リスクは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれよりも高い。

10

【0146】

試料：本明細書で使用される場合、「試料」という用語は、典型的には、目的の起源から得られたか、またはそれに由来する材料のアリコートを指す。一部の実施形態では、試料は、目的の生物源（例えば、組織または生物または細胞培養物）から得られるか、またはそれに由来する。一部の実施形態では、目的の起源は、細胞もしくは生物、例えば、動物もしくはヒトであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、目的の起源は、生体組織もしくは生体液であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生体組織または生体液は、羊水、房水、腹水、胆汁、骨髄、血液、母乳、脳脊髄液、耳垢、乳糜、チャイム（chime）、射精液、内リンパ、滲出液、便、胃酸、胃液、リンパ、粘液、心膜液、外リンパ、腹腔液、胸水、膿汁、粘膜分泌物、唾液、皮脂、精液、血清、恥垢、痰、滑液、汗、涙液、尿、膈分泌物、硝子体液、嘔吐物、および／またはその組合せもしくは構成要素であってもよく、あるいはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、生体液は、細胞内液、細胞外液、小胞内液（血漿）、間質液、リンパ液、および／もしくは細胞透過液であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、生体組織または生体試料は、例えば、吸引液、生検（例えば、微細針または組織生検）、スワブ（例えば、口腔、経鼻、皮膚、または膈スワブ）、擦過、外科手術、洗浄または灌注（例えば、気管支肺胞、管、鼻、眼、口腔、子宮、膈、または他の洗浄または灌注）によって得てもよい。一部の実施形態では、生体試料は、体液試料もしくは体液由来試料であるか、またはそれを含む。体液試料または体液由来試料の例としては、限定されるものではないが、羊水、胆汁、血液、母乳、気管支肺胞洗浄液（BAL）、脳脊髄液、透析液、便、唾液、精液、滑液、涙液、尿などが挙げられる。一部の実施形態では、本開示に従って有用であり得る体液試料または体液由来試料は、血液由来試料、唾液由来試料、痰由来試料、もしくは胸水由来試料であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生体試料は、リキッドバイオプシーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、生体試料は、個体から得られた細胞であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、試料は、任意の適切な手段によって目的の起源から直接的に得られた「一次試料」である。一部の実施形態では、文脈から明確であると予想されるように、「試料」という用語は、一次試料を処理することによって（例えば、1つもしくは複数の構成要素を除去することによって、および／または1つもしくは複数の薬剤を添加することによって）得られる調製物を指す。例えば、試料は、目的の生物学的実体を他の非標的実体から分離するために半透膜、または抗体に基づく方法のような親和性に基づく方法を使用することによって処理された調製物である。そのような「処理された試料」は、例えば、一部の実施形態では、ナノ粒子（例えば、細胞外小胞を含む、目的のサイズ範囲を有するナノ粒子）を含んでいてもよいが、一部の実施形態では、試料から抽出された核酸および／またはタンパク質などを含んでいてもよい。一部の実施形態では、処理された試料は、一次試料を1つまたは複数の技法、例えば、核酸の増幅または逆転写、ある特定の構成要素の単離および／または精製などに付すことによって得ることができる。

20

30

40

50

【0147】

選択的または特異的：「選択的」または「特異的」という用語は、活性を有する薬剤に関して本明細書で使用される場合、薬剤が潜在的な標的実体、状態、または細胞間を識別することを意味することが当業者に理解される。例えば、一部の実施形態では、薬剤が1つまたは複数の競合する代替標的の存在下で、その標的と優先的に結合する場合、薬剤は、その標的に「特異的に」結合すると言われる。多くの実施形態では、特異的相互作用は、標的実体（例えば、エピトープ、間隙、結合部位）の特定の構造的特色の存在に依存する。特異性が絶対的である必要がないことが理解されるべきである。一部の実施形態では、特異性は、1つまたは複数の他の潜在的な標的実体（例えば、競合因子）について、標的結合部分の特異性と比べて評価されてもよい。一部の実施形態では、特異性は、参照特異的結合部分の特異性と比べて評価される。一部の実施形態では、特異性は、参照非特異的結合部分の特異性と比べて評価される。一部の実施形態では、標的結合部分は、その標的実体に結合する条件下で、競合する代替標的に検出可能に結合しない。一部の実施形態では、標的結合部分は、競合する代替標的と比較して、より高いオンレート、より低いオフレート、増加した親和性、減少した解離、および／または増加した安定性で、その標的実体に結合する。

10

【0148】

低分子：本明細書で使用される場合、「低分子」という用語は、低分子量の有機および／または無機化合物を意味する。一般に、「低分子」は、約5キロダルトン(kD)未満のサイズである分子である。一部の実施形態では、低分子は、約4kD、3kD、約2kD、または約1kD未満である。一部の実施形態では、低分子は、約800ダルトン(D)、約600D、約500D、約400D、約300D、約200D、または約100D未満である。一部の実施形態では、低分子は、約2000g/mol未満、約1500g/mol未満、約1000g/mol未満、約800g/mol未満、または約500g/mol未満である。一部の実施形態では、低分子は、ポリマーではない。一部の実施形態では、低分子は、ポリマー部分を含まない。一部の実施形態では、低分子は、タンパク質またはポリペプチドではない（例えば、オリゴペプチドまたはペプチドではない）。一部の実施形態では、低分子は、ポリヌクレオチドではない（例えば、オリゴヌクレオチドではない）。一部の実施形態では、低分子は、多糖ではない。一部の実施形態では、低分子は、多糖を含まない（例えば、糖タンパク質、プロテオグリカン、糖脂質などではない）。一部の実施形態では、低分子は、脂質ではない。一部の実施形態では、低分子は、生物学的に活性である。一部の実施形態では、好適な低分子は、化合物の大きなライブラリーのスクリーニング(Beck-Sickinger & Weber (2001) *Combinational Strategies in Biology and Chemistry* (John Wiley & Sons, Chichester, Sussex)；核磁気共鳴による構造活性相関(Shuker et al. (1996) "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." *Science* 274: 1531-1534)；コードされた自己集合化学ライブラリー(Melkko et al. (2004) "Encoded self-assembling chemical libraries." *Nature Biotechnol.* 22: 568-574)；DNA鋳型化学(Gartner et al. (2004) "DNA-templated organic synthesis and selection of a library of macrocycles." *Science* 305: 1601-1605)；動的コンビナトリアル化学(Ramstrom & Lehn (2002) "Drug discovery by dynamic combinatorial libraries." *Nature Rev. Drug Discov.* 1: 26-36)；テザリング(Arkin & Wells (2004) "Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream." *Nature Rev. Drug Discov.* 3: 301-317)；およびスピードスクリーニング(Muckenschnabel et al. (2004) "SpeedScreen: label-free liquid chromatography-mass spectrometry-based high-throughput screening for the discovery of orphan protein ligands." *Anal. Biochem.* 324: 241-249)などの方法によって同定されてもよい。一部の実施形態では、低分子は、ナノモル範囲の標的に対する解離定数を有して

20

30

40

50

もよい。

【0149】

特異的結合：本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、結合が起きている環境において、可能な結合パートナー間を識別する能力を指す。他の潜在的な標的が存在する場合に、1つの特定の標的と相互作用する標的結合部分は、それが相互作用する標的に「特異的に結合する」と言われる。一部の実施形態では、特異的結合は、標的結合部分とそのパートナーとの間の会合を検出すること、またはその程度を決定することによって査定され、一部の実施形態では、特異的結合は、標的結合部分－パートナー複合体の解離を検出すること、またはその程度を決定することによって査定され、一部の実施形態では、特異的結合は、そのパートナーと別の実体との間の代替の相互作用と競合する標的結合部分の能力を検出することまたは決定することによって査定される。一部の実施形態では、特異的結合は、ある範囲の濃度にわたってそのような検出または決定を行うことによって査定される。

10

【0150】

がんのステージ：本明細書で使用される場合、「がんのステージ」という用語は、がん（例えば、肺がん）の進行のレベルの定性的または定量的査定を指す。一部の実施形態では、がんのステージを決定するために使用される基準としては、限定されるものではないが、がんが身体中に位置する場所、腫瘍サイズ、がんがリンパ節に広がっているかどうか、がんが1つまたは複数の異なる身体部分に広がっているかどうかなどのうちの1つまたは複数の挙げられ得る。一部の実施形態では、がんは、AJCC病期分類システムを使用してステージ分類されてもよい。AJCC病期分類システムは、がん患者における疾患進行の程度を記載するためにAmerican Joint Committee on Cancerによって開発された分類システムであり、これは一部では、TNMスコアリングシステム：腫瘍サイズ、罹患しているリンパ節、転移を利用する。一部の実施形態では、がんは、TNMスコアリングシステムの一部では含む分類システムを使用してステージ分類されてもよく、これによれば、Tは、通常、原発腫瘍と呼ばれる主要な腫瘍のサイズおよび程度を指し、Nは、がんを有する近接リンパ節の数を指し、Mは、がんが転移しているかどうかを指す。一部の実施形態では、がんは、ステージ0（異常な細胞が存在するが、近くの組織に広がっておらず、粘膜内癌またはCISとも呼ばれ；CISは、がんではないが、がんになり得る）、ステージI～III（がんが存在し；数字が大きくなると、腫瘍は大きく、近くの組織により広がっている）、またはステージIV（がんが身体の遠位部分に広がっている）と称され得る。一部の実施形態では、がんは、in situ（異常な細胞は存在するが、近くの組織に広がっていない）；局在性（がんが、出発した場所に限定されており、広がっている徴候がない）；領域性（がんが、近くのリンパ節、組織、または器官に広がっている）；遠隔転移（がんが、身体の遠位部分に広がっている）；および不明（ステージを把握するための情報が十分でない）からなる群から選択されるステージに指定され得る。

20

30

【0151】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、例えば、実験、診断、予防、および／または治療目的で、試料が得られる生物を指す。典型的な対象としては、動物（例えば、哺乳類、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類、飼育ペットなど）およびヒトが挙げられる。一部の実施形態では、対象は、ヒト対象、例えば、ヒト男性または女性対象である。一部の実施形態では、対象は、肺がんを患っている。一部の実施形態では、対象は、肺がん罹患しやすい。一部の実施形態では、対象は、肺がんの1つまたは複数の症状または特徴を示す。一部の実施形態では、対象は、肺がんの1つまたは複数の非特異的症

40

50

決定された対象（例えば、男性または女性対象）である。一部の実施形態では、対象は、無症候性対象である。そのような症候性対象は、生活歴関連リスクまたは遺伝的リスクを有する、平均集団リスクの対象（例えば、男性または女性対象）であってもよい。例えば、そのような無症候性対象は、がんの家族歴を有する対象、がんについて以前に処置された対象、がん処置後にがん再発のリスクがある対象、がん処置後に寛解にある対象、および／または少なくとも1つのがんバイオマーカーの存在について以前にもしくは周期的にスクリーニングされている対象であってもよい。あるいは、一部の実施形態では、無症候性対象は、がんについて以前にスクリーニングされていない対象、がんについて診断されていない対象、および／またはがん療法を以前に受けていない対象であってもよい。一部の実施形態では、提供される技術に適した対象は、年齢、人種、地理的位置、遺伝歴、病歴、個人歴（例えば、喫煙、アルコール、薬物、発がん物質、食事、肥満、身体活動、日光曝露、放射線曝露、ウイルスなどの感染病原体への曝露、および／または職業上の危険）などの1つまたは複数の特徴に基づいて選択された個体である。

10

【0152】

患っている：疾患、障害、および／または状態を「患っている」個体は、疾患、障害、および／または状態の1つまたは複数の症状を有すると診断され、および／またはそれを示している。

【0153】

表面分析物：本明細書で使用される場合、「表面分析物」は、生物学的実体（例えば、生体試料由来の細胞またはナノ粒子）の表面上に存在する分析物を指す。一部の実施形態では、表面分析物は、表面ポリペプチドもしくは表面タンパク質であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、表面分析物は、グリカンであるか、またはそれを含む。

20

【0154】

表面バイオマーカー：本明細書で使用される場合、「表面バイオマーカー」は、生物学的実体（例えば、一部の実施形態では、分析物凝集体（例えば、タンパク質またはムチン凝集体）および／または細胞外小胞を含む、例えば、細胞またはナノ粒子）の表面分析物（例えば、本明細書に記載される通り）の状態（例えば、存在、レベル、および／または活性）を示すマーカーを指す。一部の実施形態では、表面バイオマーカーは、表面タンパク質バイオマーカーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、表面バイオマーカーは、炭水化物依存性マーカーであるか、またはそれを含む。

30

【0155】

表面ポリペプチドまたは表面タンパク質：本明細書において互換的に使用されるように、「表面ポリペプチド」および「表面タンパク質」という用語は、直接的または間接的相互作用により、生物学的実体（例えば、一部の実施形態では、分析物凝集体（例えば、タンパク質またはムチン凝集体）および／または細胞外小胞などを含む、例えば、細胞またはナノ粒子）の表面中に、および／またはその上に存在するポリペプチドまたはタンパク質を指す。当業者に理解されるであろうように、表面タンパク質は、一部の実施形態では、例えば、限定されるものではないが、グリコシル化を含む、翻訳後改変を含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面ポリペプチドまたはタンパク質は、膜結合ポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、膜結合ポリペプチドは、生物学的実体（例えば、細胞、細胞外小胞など）の膜の表面中に、またはその上に存在する1つまたは複数のドメインまたは領域を有するポリペプチドまたはタンパク質を指す。一部の実施形態では、膜結合ポリペプチドは、生物学的実体（例えば、細胞、細胞外小胞など）の細胞膜に及ぶおよび／またはそれと会合した、1つまたは複数のドメインまたは領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、結合ポリペプチドは、生物学的実体（例えば、細胞、細胞外小胞など）の細胞膜に及ぶおよび／またはそれと会合し、また細胞内および／または小胞内空間に突出している、1つまたは複数のドメインまたは領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、膜結合ポリペプチドは、例えば、1つまたは複数の非ペプチド連結を介して（例えば、グリコシルホスファチジルイノシトール（GPI）アンカーもしくは脂質化により、または非共有結合性相互作用により）生物学的実

40

50

体（例えば、細胞、細胞外小胞など）の細胞膜と会合した1つまたは複数のドメインまたは領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、膜結合ポリペプチドは、生物学的実体（例えば、細胞、細胞外小胞など）の細胞膜のいずれかの側に固定された1つまたは複数のドメインまたは領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面タンパク質は、ナノ粒子（例えば、本明細書に記載される通り）の表面と会合するか、またはその上に存在する。一部の実施形態では、表面タンパク質は、細胞外小胞と会合するか、またはその内に存在する。一部の実施形態では、表面タンパク質は、肺がん関連細胞外小胞（例えば、肺がんを患っているか、もしくはそれに罹患しやすい対象の体液由来試料（例えば、限定されるものではないが、血液由来試料）から得られるまたはそれに由来する細胞外小胞）と会合していてもよく、またはその内に存在していてもよい。当業者に理解されるであろうように、細胞外小胞上／内の表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の少なくとも一部分の存在の検出は、対象からの生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）（例えば、血液または血液由来試料）からの肺がん関連細胞外小胞の分離および／または単離を容易にし得る。一部の実施形態では、表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の存在の検出は、そのような表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の小胞内部分（例えば、小胞内エピトープ）の検出であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の存在の検出は、そのような表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の膜に及ぶ部分の検出であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の存在の検出は、そのような表面ポリペプチドまたは表面タンパク質の小胞外部分の検出であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0156】

表面タンパク質バイオマーカー：本明細書で使用される場合、「表面タンパク質バイオマーカー」という用語は、生物学的実体（例えば、一部の実施形態では、分析物凝集体（例えば、タンパク質またはムチン凝集体）および／または細胞外小胞を含む、例えば、細胞またはナノ粒子）の表面タンパク質（例えば、本明細書に記載される通り）の状態（例えば、存在、レベル、および／または活性）を示すマーカーを指す。一部の実施形態では、表面タンパク質は、生物学的実体（例えば、細胞または細胞外小胞）の膜の表面中に、またはその上に位置する1つまたは複数のドメインまたは領域を有する、ポリペプチドまたはタンパク質を指す。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、膜の内側（小胞内）もしくは外側（小胞外）上に存在するエピトープであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、細胞外小胞と会合するか、またはその中に存在する。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、変異したポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、翻訳後改変（例えば、限定されるものではないが、グリコシル化、リン酸化など）されていてもよい。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、翻訳後処理されてもよく、例えば、タンパク質切断の結果として、トランケートされたポリペプチドの形態で存在していてもよい。一部の実施形態では、表面タンパク質バイオマーカーは、ナノ粒子の外部表面上に存在するエピトープであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0157】

に罹患しやすい：疾患、障害、および／または状態「に罹患しやすい」個体は、一般人のメンバーよりも、疾患、障害、および／または状態を発生するより高いリスクを有する個体である。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および／または状態と診断されていなくてもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および／または状態の症状を示していてもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および／または状態の症状を示していなくてもよい。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、

障害、および／または状態を将来発生する。一部の実施形態では、疾患、障害、および／または状態に罹患しやすい個体は、疾患、障害、および／または状態を将来発生しない。

【0158】

標的結合部分：一般に、「標的結合部分」および「結合部分」という用語は、目的の標的（例えば、目的の分子標的、例えば、バイオマーカーまたはエピトープ）に結合する任意の実体または部分を指すために本明細書で互換的に使用される。多くの実施形態では、目的の標的結合部分は、特定の相互作用の文脈において、その標的を他の潜在的な結合パートナーから識別する点で、その標的（例えば、標的バイオマーカー）と特異的に結合するものである。一般に、標的結合部分は、任意の化学クラス（例えば、ポリマー、非ポリマー、低分子、ポリペプチド、炭水化物、脂質、核酸など）の実体または部分であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、単一の化学的実体である。一部の実施形態では、標的結合部分は、非共有結合的な相互作用によって、関連する条件下で互いと会合した2つまたはそれよりも多くの別個の化学的実体の複合体である。例えば、当業者は、一部の実施形態では、標的結合部分が、一般的結合部分パートナーに連結される「一般的」結合部分（例えば、ビオチン／アビジン／ストレプトアビジンおよび／またはクラス特異的抗体のうちの1つ）および「特異的」結合部分（例えば、特定の分子標的との抗体またはアプタマー）を含み得ることを認識するであろう。一部の実施形態では、そのようなアプローチは、異なる特異的結合部分と一般的結合部分パートナーとの連結により、複数の標的結合部分のモジュールアセンブリーを可能にし得る。

10

20

【0159】

標的バイオマーカーシグネチャー：「標的バイオマーカーシグネチャー」という用語は、本明細書で使用される場合、（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、またはそれよりも多くを含んで、例えば、少なくとも2またはそれよりも多く）のバイオマーカーの組合せを指し、この組合せは、目的の特定の生物学的事象または状態と相関し、その結果、当業者は、これが、その事象または状態の「シグネチャー」であると適切に考え得ることを認識するであろう。いくつかの例を挙げれば、一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、特定の疾患もしくは疾患状態と、および／または特定の疾患、障害もしくは状態が発生し、起こり、もしくは再発し得る可能性と相関してもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、特定の疾患もしくは治療成績、またはその可能性と相関してもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、特異的がんおよび／またはそのステージと相関してもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がん、ならびに／またはそのステージおよび／もしくはサブタイプと相関してもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がん、またはそのサブタイプおよび／もしくは疾患状態と一緒に特異的である、（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、またはそれよりも多くを含んで、例えば、少なくとも2またはそれよりも多く）のバイオマーカーの組合せを含むが、そのような組合せにおける1つまたは複数のバイオマーカーは、肺がんの特異的ではない標的（例えば、表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および／または小胞内RNA）を対象にしている。例えば、一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がん、またはそのステージおよび／もしくはサブタイプに特異的な少なくとも1つのバイオマーカー（すなわち、肺がん特異的標的）を含んでいてもよく、肺がんにも必ずしもまたは完全に特異的ではない（例えば、細胞、ナノ粒子などのような、例えば、一部または全部の生物学実

30

40

50

体においても見出され得る、がん性ではない、関連するがんのものではない、ならびに／または目的の特定のステージおよび／もしくはサブタイプのものではない）バイオマーカーをさらに含んでいてもよい。すなわち、本明細書を読む当業者に認識されるであろうように、標的バイオマーカーシグネチャーにおいて利用されるバイオマーカーの組合せが、目的の関連する標的生物学的実体（例えば、目的の肺がん細胞、または肺がん細胞によって分泌されるナノ粒子、例えば、肺がん特異的細胞外小胞）と一緒に特異的である（すなわち、検出のための関連する標的生物学的実体（例えば、目的の肺がん細胞、または肺がん細胞によって分泌されるナノ粒子、例えば、肺がん特異的細胞外小胞）を、検出のための目的ではない他の生物学的実体から十分に識別する）多数のバイオマーカーであるか、またはそれを含む限り、そのようなバイオマーカーの組合せは、本開示のある特定の実施形態による有用な標的バイオマーカーシグネチャーである。

10

【0160】

治療剤：本明細書において互換的に使用される場合、「治療剤」または「療法」という語句は、対象または患者に投与された場合に、治療効果を有する、ならびに／または所望の生物学的および／もしくは薬理学的効果を誘発する薬剤または介入を指す。一部の実施形態では、治療剤または療法は、疾患、障害、および／または状態の1つまたは複数の症状または特色を軽減する、寛解する、和らげる、阻害する、防止する、その開始を遅延させる、その重症度を低減する、および／またはその発生率を低減するために使用することができる任意の物質である。一部の実施形態では、治療剤または療法は、疾患、障害、および／または状態の1つまたは複数の症状または特色を軽減する、和らげる、阻害する、防止する、その開始を遅延させる、その重症度を低減する、および／またはその発生率を低減するために行うことができる医学的介入（例えば、外科手術、放射線、光線療法）である。

20

【0161】

閾値レベル（例えば、カットオフ）：本明細書で使用される場合、「閾値レベル」という用語は、測定の結果、例えば、アッセイにおいて得られた測定の結果に対する情報を得る、および／またはそれを分類するための参照として使用されるレベルを指す。例えば、一部の実施形態では、閾値レベル（例えば、カットオフ）は、集団の2つのサブセット（例えば、正常および／または非肺がん対肺がん）間の境界線を規定するアッセイにおいて測定された値を意味する。そのため、閾値レベルに等しいまたはそれよりも高い値は、集団の一方のサブセットを規定し、閾値レベルよりも低い値は、集団の他方のサブセットを規定する。閾値レベルは、1つもしくは複数の対照試料、または対照試料の集団全体に基づいて決定することができる。閾値レベルは、目的の測定値を得る前に、それと同時的に、またはその後決定することができる。一部の実施形態では、閾値レベルは、値の範囲であり得る。

30

【0162】

処置する：本明細書で使用される場合、「処置する」、「処置」、または「処置すること」という用語は、疾患、障害、および／または状態の1つまたは複数の症状または特色を、部分的にまたは完全に、軽減する、寛解する、和らげる、阻害する、防止する、その開始を遅延させる、その重症度を低減する、および／またはその発生率を低減するために使用される任意の方法を指す。処置は、疾患、障害、および／または状態の徴候を示していない対象に投与されてもよい。一部の実施形態では、処置は、例えば、疾患、障害、および／または状態と関連する病態を発生するリスクを減少させる目的で、疾患、障害、および／または状態の早期徴候のみを示している対象に投与されてもよい。一部の実施形態では、処置は、疾患、障害、および／または状態の後期ステージの対象に投与されてもよい。

40

【0163】

標準的な技術を、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、ならびに組織培養および形質転換（例えば、電気穿孔、リポフェクション）のために使用してもよい。酵素反応および精製技法は、製造業者の仕様書に従って、または当技術分野で通常達成されるようにし

50

て、または本明細書に記載されるようにして、行ってもよい。上述の技法および手順は、一般に、当技術分野において周知の従来の方法に従って、および本明細書全体を通して引用および論じられるさまざまな一般的でより具体的な参考文献に記載されるようにして、行ってもよい。例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))を参照されたく、これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。

【0164】

ある特定の実施形態の詳細な説明

肺がんは、米国で、2016年に、推定148,869人の死亡の原因となった（U.S. Cancer statistics working group, 2019；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。これらの死亡の大部分は、診断の遅れに起因し、2001年～2007年に、米国では、肺がんについての5年総生存率は、15.6%であった。診断時に局在性疾患を有する患者は、52%の5年生存率を有していたが、しかしながら、患者の大部分は、遠隔転移が既に形成されていたときに最初の診断を受け、それらの患者は、およそ3.6%の悲惨な5年生存率を有する（Cruz et al., 2011；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。

【0165】

残念ながら、平均リスクの個体のための安価で、広く利用可能な推奨される肺がんスクリーニング検査は存在しない。遺伝的または生活歴関連リスクがある多くの個体は、現在、低線量CTスキャンによってスクリーニングされるが、これらの検査は、それらが比較的高価で限定的なアクセス性のものであるので、スクリーニングについて準最適である。例えば、Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Randomized Trialは、比較的成本効率がよく、広く利用可能な胸部X線イメージングおよび喀痰検査が、肺がん死亡率を変えるのに効果がないことを見出したが、低線量CTスキャンは、死亡率を成功裏に低下させ、これは、多くの場合に、不必要な外科手術の数を増加させ、費用がかかり、限定的な利用可能性であると考えられ得る。

【0166】

本開示は、数ある中でも、例えば、肺がんの検出および診断に対するある特定の従来のアプローチを含む、ある特定の以前の技術による課題の起源を同定する。例えば、本開示は、多くの従来の診断アッセイ、例えば、X線イメージング、喀痰検査、低線量CTスキャン、ならびに／または無細胞核酸、血清タンパク質（例えば、CEA、CYFRA21-1、NSE、ProGRP、および／またはSCCA）に基づく分子検査、ならびに／または細胞外小胞のバルク分析が、時間がかかり、高価で、ならびに／または信頼できる総合的な診断査定を提供するのに十分な感度および／または特異度を欠き得ることを認識する。一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、バイオインフォマティクス分析に基づいて肺がんに対して高い感度および特異度を示すと予測されるバイオマーカーの組合せの同定によって、そのような課題を解決する技術（システム、組成物、および方法を含む）を提供する。一部の実施形態では、本開示は、そのような課題を、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有する個々のナノ粒子における肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーの共局在（例えば、バイオインフォマティクス分析によって同定される）を検出することによって解決する技術（システム、組成物、および方法を含む）を提供し、これは、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに肺がんに関連するナノ粒子に存在する表面バイオマーカー、内部バイオマーカー、およびRNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、本開示は、そのような課題を、数ある中でも、個々のナノ粒子における標的バイオマーカーシグネチャーの相互作用および／または共局在に基づく、出願人によって開発され、米国特許出願第US2020/0299780号および国際出願WO202018

10

20

30

40

50

0741号に記載された標的実体検出アプローチを使用して、肺がんのそのような標的バイオマーカーシグネチャーを検出することによって解決する技術（システム、組成物、および方法を含む）を提供する。前述の開示のそれぞれの内容は、それらの全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0167】

一部の実施形態では、本明細書に記載される検出のための細胞外小胞は、サイズ排除に基づく方法によって、対象の体液から単離することができる。当業者によって理解されるであろうように、一部の実施形態では、サイズ排除に基づく方法は、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を含む試料を提供し得る。したがって、一部の実施形態では、本開示の提供される技術は、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲（例えば、一部の
10 実施形態では、約30nm～約1000nm）を有する個々のナノ粒子において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを形成する少なくとも2つまたはそれよりも多くの表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）の共局在化の検出を包含する。本開示を読む当業者は、「細胞外小胞」の文脈で本明細書に記載されるさまざまな実施形態（例えば、個々の細胞外小胞および／または提供される「細胞外小胞関連表面バイオマーカー」を検出するためのアッセイ）が、本明細書に記載される「ナノ粒子」の文脈においても適用可能であり得ることを理解するであろう。

【0168】

本開示は、数ある中でも、例えば、肺がんの早期検出のための有効な肺がんスクリーニングを達成するための洞察および技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、肺がん
20 に関連するもう1つの症状を経験していることがある対象における肺がんの早期検出のための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、肺がんについて遺伝的リスクがある対象における肺がんの早期検出のための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、肺がんの遺伝的リスクがあり得るか、および／またはそれと関連する1つもしくは複数の症状を経験していることがある対象における肺がんの早期検出のための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、生活歴リスク因子（例えば、限定されるものではないが、喫煙）を有し得る対象における肺がんの早期検出のための技術を提供する。一部の
30 実施形態では、本開示は、個体、例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、肺腺癌（L U A D）および肺扁平上皮細胞癌（L U S C）などについてのある特定のリスク（例えば、遺伝的リスク、生活歴関連リスク、または平均リスク）を有する個体をスクリーニングするための技術を提供する。非小細胞肺がんは、肺がんの最も一般的なサブタイプであり、ここで、症例の54%は、進行ステージで検出される（S E E R C a n c e r S t a t i s t i c s R e v i e w 1975-2017）。一部の実施形態では、提供される技術は、初期肺がんの検出に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、肺がん
40 に関連し得る1つまたは複数の症状を有する個体を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、無症候性または症候性個体を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合でさえ有効である（例えば、十分に高い感度および／または低い偽陽性率および／または偽陰性率の結果に起因する）。一部の実施形態では、提供される技術は、肺がんを発生する遺伝的リスクおよび／または生活歴関連リスクなしの個体（例えば、無症候性または症候性個体）を含むか、
50 またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、肺がんを発生する遺伝的リスクおよび／または生活歴関連リスクを有する個体（例えば、無症候性または症候性個体）を含むか、またはそれからなる集団に適用される場合に有効である。一部の実施形態では、提供される技術は、本明細書に提供される開示を読む当業者に明らかであるように、1つまたは複数の組成物（例えば、分子複合体、系、コレクション、組合せ、キットなど）および／もしくは方法（例えば、作製する、使用する、査定する方法など）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

10

20

30

40

50

【0169】

一部の実施形態では、提供される技術は、提供される技術の単回および／または定期的（例えば、周期的）査定への有用な適用を可能にするのに適切な感度および／または特異度（例えば、偽陽性率および／または偽陰性率の結果）を伴う、肺がんの1つまたは複数の特色（例えば、発生率、進行、療法に対する応答性、再発など）の検出（例えば、早期検出、例えば、無症候性個体および／または集団における早期検出）を達成する。一部の実施形態では、提供される技術は、個体の定期的な検診、例えば、限定されるものではないが、身体検査、一般開業医の訪問、コレステロール／脂質血液検査、糖尿病（2型）スクリーニング、大腸内視鏡検査、血圧スクリーニング、甲状腺機能検査、前立腺がんスクリーニング、マンモグラム、HPV／Papスミア、および／またはワクチン接種と併せて有用である。一部の実施形態では、提供される技術は、処置レジメンと併せて有用であり、一部の実施形態では、提供される技術は、そのような処置レジメンの1つまたは複数の特徴（例えば、許容されるパラメーターによる成功率）を改善し得る。

10

【0170】

一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、無症候性個体のスクリーニング、例えば、症状の発生前、またはそうでなければその非存在下での定期的なスクリーニングが、肺がんの有効な管理（例えば、処置の成功）のために有益であり、さらに重要であり得るという洞察を提供する。一部の実施形態では、本開示は、初期がん、一部の実施形態では、無症候性個体（例えば、肺がんにおける遺伝的および／または生活歴関連リスクなし）における初期がんを含む、肺がんを検出するために実行され得る、肺がんのスクリーニングシステムを提供する。一部の実施形態では、提供される技術は、無症候性個体（例えば、肺がんにおける遺伝的リスクおよび／または生活歴関連リスクありまたはなし）の定期的なスクリーニングを達成するために実行される。一部の実施形態では、提供される技術は、症候性個体（例えば、肺がんにおける遺伝的リスクおよび／または生活歴関連リスクありまたはなし）の定期的なスクリーニングを達成するために実行される。本開示は、例えば、1人または複数人の個体（例えば、無症候性個体）の定期的な検査を含む戦略を含む、組成物（例えば、試薬、キット、構成要素など）、ならびにそれらを提供するおよび／または使用する方法を提供する。本開示は、そのようなシステムの有用性を規定し、それらを実行するための組成物および方法を提供する。

20

【0171】

30

I. 肺がん検出

今日、平均リスクの無症候性個体をスクリーニングするためのCDCが推奨している任意の種類の肺がんスクリーニング検査は存在しないが、米国では、肺がんの年齢調整発生率は、1年あたり100,000人の男性および女性あたり62人である。毎年、肺がん死亡するアメリカ人の数は、前立腺がん、乳がん、結腸がんの死亡者の合計とほぼ同じである。2010年単独で、米国では、推定で肺がんの約240,000の新たな症例、および肺がんによる約161,000人の死亡があった（Cruz et al., 2011；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。米国における肺がんの総死亡数は、約1985年から減少しているが、肺がんの全世界での割合は、着実に増加中であり、1985年から2010年までに約51%増加した（Cruz et al., 2011；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。全世界的には、肺がんは、新たながん症例に対する最大の原因であり、2010年に、世界中で、およそ1,350,000の新たな肺がん症例（すべての新たながん症例のうち約12.4%）および約1,180,000人の死亡（総がん関連死の約17.6%）があった。これらの新たな肺がん症例のおよそ半分は、途上国において生じている。欧州、中国、および途上国における5年肺がん生存率は、わずか8.9%と推定されている（Cruz et al., 2011；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。

40

【0172】

2013年～2017年のSurveillance, Epidemiology a

50

nd End Results (SEER) データは、過去 45 年間、米国における肺がんの有病率および疫学について広く報告している。SEER は、肺および気管支のがんの診断時に、約 71 歳の年齢中央値を報告した。肺がんは、呼吸上皮の細胞から生じ、2 つの広いカテゴリーに分けられ得る。小細胞肺がん (SCLC) は、非常に悪性で、神経内分泌特徴を示す細胞に由来し、SCLC は、すべての肺がん症例の約 12 % を構成する (図 3)。非小細胞肺がん (NSCLC) は、症例の残りの 85 % を占め、3 つの病理学的サブタイプ：腺癌、扁平上皮細胞癌、および大細胞癌に分けられる。腺癌それ自身は、米国で、すべての新たな肺がん症例の約 50 % を占め (図 3)、扁平上皮細胞癌は、約 23 % を占め、大細胞癌ならびに他の肺および気管支のがんは、残りの約 15 % を占める (図 3)。

10

【0173】

肺および気管支の侵襲性非小細胞がんを有するすべての患者についての 5 年生存率は、約 25 % である。最初の診断時に局在性肺がんを有する患者は、約 63 % の 5 年生存率を有し、最初の診断時に領域性肺がん転移を有する患者は、約 35 % の 5 年生存率を有するが、遠隔肺がん転移を有する患者は、不十分な約 7 % の 5 年生存率を有する (SEER 1975-2017 review、表 15.12)。これらのデータは、初期肺がんについての診断が、肺がん患者の生存率を増加させ得るので、重要であることを示す。

【0174】

肺がんについてのある特定のリスク因子としては、年齢および喫煙歴が挙げられる。1964 年の米国公衆衛生局長官による独創的な報告書は、以下を述べた：(1) 喫煙は、男性の年齢別死亡率の 70 % 増加と関連しており、女性の死亡率の増加はより少ない；(2) 喫煙は、男性の肺がん因果関係があり、影響の大きさは、肺がんをもたらす他のすべての因子をはるかに上回り、喫煙期間および 1 日あたりの喫煙数によりリスクが直接増加した；(3) 喫煙は、一般的な集団の肺がんの原因において、職業上の曝露よりも重要と考えられた；(4) 喫煙は、米国で、慢性気管支炎の重要な原因であると報告された；ならびに (5) 男性喫煙者は、男性非喫煙者よりも冠動脈疾患のより高い死亡率を有していた。

20

【0175】

国際がん研究機関 (IARC) は、タバコの煙中で少なくとも 50 の公知の発がん物質を同定している。そのような発がん物質の例としては、限定されるものではないが、タバコの処理の間および喫煙の間のニコチンのニトロソ化によって形成されるタバコ特異的 N-ニトロソアミン (TSNA) が挙げられる。化学物質の 4-(メチルニトロソアミノ)-1-(3-ピリジル)-1-ブタノン (NNK) は、実験動物において肺の腺癌を誘導することが公知である。NNK は、DNA に結合し、DNA 付加体を出し、DNA 損傷をもたらすことが公知である。この損傷の修復の失敗は、永続的変異をもたらす得る。NNK は、ヒト肺腺癌の 24 % において検出される K-ras 癌遺伝子の活性化をもたらす DNA 変異と関連する。

30

【0176】

喫煙者 9 人に 1 人が、最終的に肺がんを発生すると推定される。長期喫煙者における肺がんの相対リスクは、生涯非喫煙者よりも 10 倍～30 倍高いと推定されている。USA では、肺がんの 80 % 超が、タバコ曝露を有する人において起こるが、全世界的には、男性の肺がんの 15 % および女性の肺がんの最大で 53 % は、喫煙に起因せず、未喫煙者が、世界中で、すべての肺がんの症例の約 25 % を占める。

40

【0177】

CDC によって規定される高リスク個体および／または集団は、55～77 歳である、>30 タバコパック年歴を有する、現在喫煙者である、または過去 15 年以内に禁煙していることである。これらの個体について、低線量 CT スキャンは、現在、推奨されている肺がんスクリーニングツールである。しかしながら、高リスク (例えば、CDC ガイドラインによって規定される患者) 集団の低線量 CT は、比較的高価で、アクセスが限定され、不当な高レベルの偽陽性を有すると考えられ得る (例えば、偽陽性であったすべて

50

の陽性検査の割合は、97.5%程度であり得る；Raghu et al., 2020およびKinsinger et al., 2017、これは両方とも、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。本開示は、数ある中でも、十分に高い特異度および／または感度を有する、コスト効率が高いスクリーニングアッセイを提供する。

【0178】

数ある中でも、ある特定の実施形態では、本開示は、肺がんについての遺伝的および／もしくは生活歴関連リスクを有する対象、ならびに／または肺がんに関連する1つもしくは複数の症状を経験していることがある対象をスクリーニングするための、肺がんリキッドバイオプシーアッセイの開発についての必要性が存在するという洞察を提供する。ある特定の実施形態では、本開示は、例えば、他のスクリーニング方法、例えば、MRI、CTスキャンなどのような、例えば、肺がん検出のためのイメージング方法の前に、症候性または無症候性対象をスクリーニングするための、肺がんリキッドバイオプシーアッセイの開発についての必要性が存在するという洞察を提供する。

【0179】

一部の実施形態では、本開示は、遺伝的リスクがある個体、または生活歴関連リスクを有する個体における肺がんの有効なスクリーニングのための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、平均リスクの個体における肺がんの有効なスクリーニングのための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、肺がんに関連する1つまたは複数の症状を有する個体における肺がんの有効なスクリーニングのための技術を提供する。一部の実施形態では、本開示は、無症候性個体における肺がんの有効なスクリーニングのための技術を提供する。すべてのがんの中で、男性および女性の最大の殺し屋であるにもかかわらず、非侵襲的であり、体液（例えば、限定されるものではないが、血液を含む）のみを使用し、無症候性および／または平均リスク個体（例えば、55歳より下の個体、または喫煙歴を有さないもしくは15年超の間禁煙している55歳より上の個体）のための、推奨される肺がんスクリーニングツールは、現在存在しない。これは、一部では、費用、限定的な利用可能性、潜在的な副作用、および／または既存の肺がんスクリーニング技術の不十分な性能（例えば、高い偽陽性率、または無効果）に起因する。平均リスク個体における肺がんの発生率を考慮すると、不適切な検査の特異度（<99.5%）は、真陽性の数を1桁超上回る偽陽性の結果をもたらすことができる。これは、医療制度、および擬陽性結果とスクリーニングされた個体に、かなりの負担をかけ、追加検査、不必要な外科手術、および感情的／身体的苦痛をもたらす（Wu et al., 2016）。

【0180】

一部の実施形態では、本開示は、特に有用な肺がんスクリーニング検査が、ステージIおよびII肺がん（すなわち、予後が最も有利である場合）について、（1）擬陽性の数を最小化する超高特異度（>99.5%）、および（2）高い感度（>40%）によって特徴付けられるであろうという洞察を提供する。

【0181】

例えば、一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、例えば、ステージIおよびII肺がんについて、>98%の特異度および>50%の感度によって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、例えば、ステージIおよびII肺がんについて、>98%の特異度および>60%の感度によって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、例えば、ステージIおよびII肺がんについて、>98%の特異度および>70%の感度によって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、例えば、ステージIおよびII肺がんについて、>99.5%の特異度および>65%の感度によって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、例えば、ステージIおよびII肺がんについて、>99.5%の特異度、および>60%の感度によって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、99%またはそれよりも高い特異度、および>10%またはそれよりも高い（例えば、>15%、>20%、>25%を含む）の感度に

よって特徴付けられてもよい。一部の実施形態では、特に有用な肺がんスクリーニング検査は、99%またはそれよりも高い特異度および50%またはそれよりも高い感度によって特徴付けられてもよい。

【0182】

一部の実施形態では、本開示は、バイオマーカーの組合せの2つ以上のセット（例えば、本明細書に記載される少なくとも2つのオルソゴナルなバイオマーカーの組合せ）を含む肺がんスクリーニング検査が、バイオマーカーの組合せの1つのセットによって達成されるものと比較して、そのようなアッセイの感度を増加させることができるという洞察を提供する。例えば、一部の実施形態では、少なくとも2つのオルソゴナルなバイオマーカーの組合せを含む肺がんスクリーニング検査は、少なくとも98%の特異度および少なくとも50%の感度を達成することができる。一部の実施形態では、少なくとも2つのオルソゴナルなバイオマーカーの組合せを含む肺がんスクリーニング検査は、少なくとも98%の特異度および少なくとも60%の感度を達成することができる。一部の実施形態では、少なくとも2つのオルソゴナルなバイオマーカーの組合せを含む肺がんスクリーニング検査は、99%の特異度および50%またはそれよりも高い感度を達成することができる。

10

【0183】

一部の実施形態では、本開示は、特に有用な肺がんスクリーニング検査が、経済的に正当な費用で許容される陽性予測値（PPV）によって特徴付けられ得るという洞察を提供する。PPVは、患者が、陽性の検査後に疾患を有する可能性であり、感度、特異度、および／または疾患有病率によって影響を受ける。肺がんについてスクリーニングするために必要な最小PPVについての1つの臨床コンセンサスは、10%である。10%のPPVで、すべての1件の真陽性について9件の偽陽性が存在するであろう（Lung Cancer Screening: Recommendation Statement, Am Fam Physician, 2005 Mar 15;71(6):1165-1168）。これらの偽陽性は、それらが、追加検査、不必要な外科手術、ならびに感情的および身体的苦痛をもたらすので、医療制度、およびスクリーニングされた対象の両方に、かなりの負担をかける。一部の実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも85%またはそれよりも高い特異度カットオフ（例えば、肺がんについて遺伝的リスクがある対象について、少なくとも98%の特異度カットオフ、または肺がんに関連する1つまたは複数の症状を経験している対象について、少なくとも99.5%の特異度カットオフ）で、例えば、15%超、20%超、もしくは25%超、またはそれよりも高いを含んで、10%超またはそれよりも高いPPVを達成する早期肺がん検出のために特に有用である。

20

30

【0184】

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、早期肺がん検出のための一次スクリーニング検査として特に有用である。一部の実施形態では、本明細書に記載されるアッセイから陽性の検査結果を受けた対象は、フォローアップ検査を受けることを推奨される。一部のそのような実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、例えば、3%超、4%超、5%超、6%超、7%超、8%超、9%超、10%超、15%超、20%超、もしくは25%超、またはそれよりも高いを含んで、2%超またはそれよりも高いPPVを達成する早期肺がん検出のために有用であり得る。一部のそのような実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも85%またはそれよりも高い特異度カットオフ（例えば、肺がんについて遺伝的リスクがある対象について、少なくとも98%の特異度カットオフ、または肺がんに関連する1つもしくは複数の症状を経験している対象について、少なくとも99.5%の特異度カットオフ）を達成することができる。

40

【0185】

循環腫瘍DNA（ctDNA）、循環腫瘍細胞（CTC）、バルクタンパク質、および細胞外小胞（EV）を含むいくつかの異なるバイオマーカークラスが、肺がんリキッドバ

50

イオブシーアッセイのために研究されている。EVは、ctDNAおよびCTCと比べて、血流におけるそれらの存在量および安定性に起因して特に有望であり、初期がんについての改善された感度を示唆する。また、EVは、同じ細胞が起源のカーゴ（すなわち、タンパク質、RNA、代謝産物）を含有し、バルクタンパク質の測定を上回る優れた特異度を提供する。診断有用性EVが研究されているが、この研究の多くは、バルクEV測定またはロースルーブット単一EV分析に関している。

【0186】

II. 肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー

本開示は、数ある中でも、肺がんのためのさまざまな標的バイオマーカーまたはその組合せ（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー）を提供する。肺がんについて高い感度および特異度を示すと予測されるそのような標的バイオマーカーシグネチャーは、多方面にわたるバイオインフォマティクス分析および生物学的アプローチによって発見され、これは、例えば、一部の実施形態では、機械学習および／またはコンピューター計算モデリングによる、例えば、一部の実施形態では、シーケンシングデータ、発現データ、質量分析法、組織診、翻訳後改変データ、ならびに／または*in vitro*および／もしくは*in vivo*実験データのうちの1つまたは複数を含むデータの多用なセットのコンピューター解析を含む。

【0187】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の表面バイオマーカー（例えば、一部の実施形態では、肺がんに関連する細胞外小胞に存在する表面ポリペプチド；「細胞外小胞関連表面バイオマーカー」）ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の標的バイオマーカーを含み、その結果、そのような表面バイオマーカーおよびそのような標的バイオマーカーの組合せは、（a）偽陽性の数を最小化する高い特異度（例えば、98%超またはそれよりも高い、例えば、99%超、または99.5%超）、および（b）予後が最も有利であるステージIおよびII肺がんについて高い感度（例えば、40%超、50%超、60%超、70%超、80%超）を提供する、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを提示する。

【0188】

一部の実施形態では、本開示は、ある特定の実施形態では、異なる肺がんリスクレベルを有する対象についての感度の比率および特異度の比率は、主治医および／または関心のある医療組合によって示されたガイドラインのリスク許容性に応じて変わり得ることを認識する。ある特定の実施形態では、肺がんのリスクがある対象は、85%またはそれよりも高い特異度の比率（例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高い特異度の比率を含む）で、50%またはそれよりも高い感度（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、またはそれよりも高い感度を含む）で供され得る。ある特定の実施形態では、生活歴関連リスク因子を有する対象は、85%またはそれよりも高い特異度の比率（例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高い特異度の比率を含む）で、50%またはそれよりも高い感度（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、またはそれよりも高い感度を含む）で供され得る。ある特定の実施形態では、症候性対象は、85%またはそれよりも高い特異度の比率（例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高い特異度の比率を含む）で、50%またはそれよりも高い感度（例えば、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、またはそれよりも高い感度を含む）で供され得る。ある特定の実施形態では、非症候性対象は、85%またはそれよりも高い特異度の比率（例えば、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高い特異度の比率を含む）で、50%またはそれよりも高い感度（例えば、少なくとも60%、少なくとも7

0%、少なくとも80%、またはそれよりも高い感度を含む)で供され得る。ある特定の
実施形態では、肺がんのリスクがある対象は、99.5%の特異度の比率と70%の感度
、または98%の特異度の比率と80%の感度で供され得る。ある特定の実施形態では、
生活歴関連リスク因子を有する対象は、99.5%の特異度の比率と70%の感度、また
は98%の特異度の比率と80%の感度で供され得る。一部の実施形態では、リスクがあ
る対象(例えば、生活歴関連リスク因子を有する)における肺がんの検出のための本明細
書に記載されるアッセイは、例えば、70%未満、60%未満、50%未満、またはそれ
よりも低い感度の比率を含んで、80%未満の感度であるセット感度の比率を有してい
てもよい。ある特定の実施形態では、非症候性対象は、99.5%の特異度の比率と70%
の感度、または98%の特異度の比率と80%の感度で供され得る。一部の実施形態では
、非症候性対象における肺がんの検出のための本明細書に記載されるアッセイは、例え
ば、70%未満、60%未満、50%未満、またはそれよりも低い感度の比率を含んで、8
0%未満の感度であるセット感度の比率を有していてもよい。一部の実施形態では、症候
性対象における肺がんの検出のための本明細書に記載される技術および/またはアッセイ
は、無症候性対象における肺がんの検出のためのものよりも低い感度および/または特異
度の要件を有していてもよい。一部の実施形態では、症候性対象における肺がんの検出
のための本明細書に記載されるアッセイは、例えば、99%未満の感度、95%未満、90
%未満、または85%未満の特異度の比率を含んで、99.5%未満の特異度であるセッ
ト特異度の比率を有していてもよい。一部の実施形態では、症候性対象における肺がん
の検出のための本明細書に記載されるアッセイは、例えば、70%未満、または60%未満
の感度の比率を含んで、80%未満の感度であるセット感度の比率を有していてもよい。
【0189】

本開示は、数ある中でも、高リスク喫煙者をスクリーニングするためのゴールドスタン
ダードが、胸部CTであり、これが、National Lung Screening
Trial研究におけるそのような高リスク集団における3.8%の報告された陽性予測
値を有していたことを観察する(National Lung Screening Trial Research
Team (2013) "Results of initial low-dose computed tomographic s
creening for lung cancer. New England Journal of Medicine," 36
8(21): 1980-1991)。一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、3.8%ま
たはそれよりも高い陽性予測値(PPV)を提供する肺がんのバイオマーカーシグネチャ
ーが、肺がんについてのリスクがある個体をスクリーニングするために特に有用であるこ
とを認識する。一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、少な
くとも1つの表面バイオマーカー(例えば、肺がんに関連する細胞外小胞の表面上に存在
する表面バイオマーカー)、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、およ
び小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマ
ーカーを含み、その結果、そのような表面バイオマーカーおよびそのような標的バイオマ
ーカーの組合せは、高リスク集団において、例えば、少なくとも3%、少なくとも4%、
少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、
少なくとも10%またはそれよりも高い、少なくとも15%またはそれよりも高い、少な
くとも20%またはそれよりも高い、少なくとも25%またはそれよりも高い、および/
または少なくとも30%またはそれよりも高いを含んで、少なくとも3.8%またはそれ
よりも高い陽性予測値(PPV)を提供する肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを
提示する。

【0190】

一般に、本明細書で使用される遺伝子識別子は、UniProt Consortium
(UniProt.org)によって分類されたGene Identificationを指し、当業者は、ある特定の遺伝子が、複数の名称によって公知であり得、そのよ
うな複数の名称も容易に認識することを理解するであろう。

【0191】

一般に、本明細書で使用される炭水化物識別子は、Kegg Cancer-asso

ciated Carbohydrates データベース (genome.jp/kegg/disease/br08441.html) を指し、当業者は、ある特定の炭水化物が、複数の名称によって公知であり得、そのような複数の名称も容易に認識することを理解するであろう。

【0192】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、そのような細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよびそのような標的バイオマーカーの組合せが、肺がんの特異的であるように、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、肺がんに関連するナノ粒子に存在する表面ポリペプチドおよび／または炭水化物依存性マーカー）、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、CD166 抗原 (ALCAM) ポリペプチド、UDP-GlcNAc: beta Gal ベータ-1, 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ3 (B3GNT3) 遺伝子によってコードされるN-アセチルラクトサミニドベータ-1, 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ3 ポリペプチド、CUBドメイン含有タンパク質1 (CDCP1) 遺伝子によってコードされるCUBドメイン含有タンパク質1 ポリペプチド、カドヘリン-1 (CDH1) ポリペプチド、カドヘリン3 (CDH3) 遺伝子によってコードされるカドヘリン3 ポリペプチド、補体崩壊促進因子 (CD55) ポリペプチド、プログラム細胞死1リガンド1 (CD274; PD-L1としても公知) ポリペプチド、癌胎児抗原細胞接着分子5 (CEACAM5) 遺伝子によってコードされる癌胎児抗原細胞接着分子5 ポリペプチド、癌胎児抗原細胞接着分子6 (CEACAM6) 遺伝子によってコードされる癌胎児抗原細胞接着分子6 ポリペプチド、クローディン3 (CLDN3) 遺伝子によってコードされるクローディン3 ポリペプチド、(CLDN4) 遺伝子によってコードされるクローディン4 ポリペプチド、デスモグレイン2 (DSG2) 遺伝子によってコードされるデスモグレイン2 ポリペプチド、上皮増殖因子受容体 (EGFR) ポリペプチド、上皮細胞接着分子 (EPCAM) 遺伝子によってコードされる上皮細胞接着分子ポリペプチド、葉酸受容体アルファ (FOLR1) 遺伝子によってコードされる葉酸受容体アルファポリペプチド、ギャップ接合タンパク質ベータ1 (GJB1) 遺伝子によってコードされるギャップ接合ベータ-1 タンパク質ポリペプチド、ギャップ接合タンパク質ベータ2 (GJB2) 遺伝子によってコードされるギャップ接合ベータ-2 タンパク質ポリペプチド、肝細胞増殖因子受容体 (MET) ポリペプチド、インスリン様増殖因子1受容体 (IG1FR) ポリペプチド、ラミニンサブユニットベータ3 (LAMB3) 遺伝子によってコードされるラミニンサブユニットベータ-3 ポリペプチド、メソテリン (MSLN) ポリペプチド、ムチン1 (MUC1) ポリペプチド、ホスファチジルイノシトールグリカンアンカー生合成クラスT (PIGT) 遺伝子によってコードされるGPITランスアミダーゼコンポーネントPIG-Tポリペプチド、ポドカリキシン様2 (PODXL2) 遺伝子によってコードされるポドカリキシン様タンパク質2 ポリペプチド、ROS 癌原遺伝子1, 受容体チロシンキナーゼ (ROS1) 遺伝子によってコードされる癌原遺伝子チロシン-プロテインキナーゼROS ポリペプチド、シンデカン1 (SDC1) 遺伝子によってコードされるシンデカン1 ポリペプチド、溶質キャリアファミリー34 (リン酸ナトリウム) メンバー2 (SLC34A2) 遺伝子によってコードされるナトリウム依存性リン酸輸送タンパク質2B ポリペプチド、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ酸様3B (SMPDL3B) 遺伝子によってコードされる酸性スフィンゴミエリン様ホスホジエステラーゼ3b ポリペプチド、ST14 膜貫通セリンプロテアーゼマトリプターゼ (ST14) 遺伝子によってコードされる腫瘍原性14 タンパク質ポリペプチドのサブレッサー、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデューサー2 (TACSTD2) ポリペプチド、膜貫通セリンプロテアーゼ2 (TMPRSS2) 遺伝子によってコードされる膜貫通プロテアーゼセリン2 ポリペプチド、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10B (TNFRSF10B) ポリペプチド、テトラスパニン8 (TSPAN8) 遺伝子によってコードされるテトラ

10

20

30

40

50

スパニン-8ポリペプチド、sTnポリペプチドグリコシル化、Tnポリペプチドグリコシル化、Tポリペプチドグリコシル化、もしくはその組合せであるか、またはそれを含む。

【0193】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーは、タンパク質チロシンキナーゼ7 (PTK7)、テトラスパニン8 (TSPAN8)、カドヘリンEGF LAG 7回膜貫通型G型受容体2 (CELSR2)、グリピカン1 (GPC1)、腫瘍原性14タンパク質のサブレッサー (ST14)、タンパク質チロシンホスファターゼ受容体Z1型 (PTPRZ1)、Gタンパク質共役受容体87 (GPR87)、ギャップ接合ベータ5 (GJB5)、ギャップ接合ベータ2 (GJB2)、RasホモログファミリーメンバーV (RHOV)、Ly6/PLAURドメイン含有タンパク質3 (LYPD3)、クローディン7 (CLDN7)、デスモブラキン (DSP)、セリン組み込み因子2 (SERINC2)、アブヒドロラーゼドメイン含有17C (ABHD17C)、p53アポトーシスエフェクター (PERP)、ミエリタンパク質ゼロ様2 (MPZL2)、インテグリンベータ4サブユニット (ITGB4)、中胚葉特異的転写物 (MEST)、糖タンパク質Nmb (GPNMB)、溶質キャリアファミリー35メンバーA2 (SLC35A2)、アルファ1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ (Gb3; CD77)、インテグリンサブユニットアルファ6 (ITGA6)、多剤耐性関連タンパク質5 (ABCC5)、ATPase Na+/K+輸送サブユニットベータ3 (ATP1B3)、ジャギド1 (JAG1)、膜貫通セリンプロテアーゼ11D (TMPRSS11D)、接着Gタンパク質共役受容体F1 (ADGRF1)ポリペプチド、リン脂質輸送ATPase ABCA3 (ABCA3)ポリペプチド、多剤耐性関連タンパク質1 (ABCC1)ポリペプチド、ATP結合カセットサブファミリーCメンバー3 (ABCC3)ポリペプチド、ゴルジ常在タンパク質GCP60 (ACBD3)ポリペプチド、長鎖脂肪酸-CoAリガーゼ5 (ACSL5)ポリペプチド、終末糖化産物特異的受容体 (AGER)ポリペプチド、CD166抗原 (ALCAM)ポリペプチド、AP-1複合体サブユニットミュー2 (AP1M2)ポリペプチド、ガンマーセクレターゼサブユニットAPH-1A (APH1A)ポリペプチド、MICOS複合体サブユニットMIC26 (APOO)ポリペプチド、リン脂質輸送ATPase IH (ATP11A)ポリペプチド、リン脂質輸送ATPase IF (ATP11B)ポリペプチド、ナトリウム/カリウム輸送ATPase サブユニットベーター1 (ATP1B1)ポリペプチド、レニン受容体 (ATP6AP2)ポリペプチド、ラクトシルセラミド1, 3-N-アセチル-ベーターD-グルコサミニルトランスフェラーゼ (ベーター1, 3-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ5としても公知) (B3GNT5)ポリペプチド、ベーター1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ4 (B4GALT4)ポリペプチド、B細胞受容体関連タンパク質31 (BCAP31)ポリペプチド、BボックスおよびSPRYドメイン含有タンパク質 (BSPRY)ポリペプチド、CD109抗原 (CD109)ポリペプチド、補体崩壊促進因子 (CD55)ポリペプチド、CD9抗原 (CD9)ポリペプチド、細胞分裂制御タンパク質42ホモログ (CDC42)ポリペプチド、カドヘリン-1 (CDH1)ポリペプチド、カドヘリン-3 (CDH3)ポリペプチド、トレオニルカルバモイルアデノシン転写因子NAメチルチオトランスフェラーゼ (CDKAL1)ポリペプチド、癌胎児抗原関連細胞接着分子5 (CEACAM5)ポリペプチド、癌胎児抗原関連細胞接着分子6 (CEACAM6)ポリペプチド、カドヘリンEGF LAG 7回膜貫通型G型受容体1 (CELSR1)ポリペプチド、タンパク質CIP2A (CIP2A)ポリペプチド、CDGSH鉄-硫黄ドメイン含有タンパク質2 (CISD2)ポリペプチド、細胞骨格関連タンパク質4 (CKAP4)ポリペプチド、カルシウム活性化塩素イオンチャネル調節因子2 (CLCA2)ポリペプチド、クローディン1 (CLDN1)ポリペプチド、塩素イオン細胞内チャネルタンパク質6 (CLIC6)ポリペプチド、口唇裂および口蓋膜貫通タンパク質1様タンパク質 (CLPTM1L)ポリペプチド、カルシニン1 (CLSTN1)ポリペプチド、コンタクチン1 (CNTN1)ポリペプチド、カルボキシペプチダーゼD (

10

20

30

40

50

CPD) ポリペプチド、チトクロムP450 2S1 (CYP2S1) ポリペプチド、チ
 トクロムP450 4F11 (CYP4F11) ポリペプチド、チトクロムP450 4
 F3 (CYP4F3) ポリペプチド、推定C-マンノシルトランスフェラーゼDPY19
 L1 (DPY19L1) ポリペプチド、デスモコリン2 (DSC2) ポリペプチド、デス
 モコリン3 (DSC3) ポリペプチド、デスモグレイン2 (DSG2) ポリペプチド、デ
 スモグレイン3 (DSG3) ポリペプチド、上皮増殖因子受容体 (EGFR) ポリペプチ
 ド、上皮細胞接着分子 (EPCAM) ポリペプチド、エフリンB型受容体3 (EPHB3
) ポリペプチド、FAM241B ポリペプチド、プロトカドヘリンFat 2 (FAT2
) ポリペプチド、Fボックス/SPRYドメイン含有タンパク質1 (FBXO45) ポリ
 ペプチド、フェルミチンファミリーホモログ1 (FERMT1) ポリペプチド、葉酸受容
 体アルファ (FOLR1) ポリペプチド、FXYDドメイン含有イオン輸送調節因子3 (FXYD3) ポリペプチド、フリズルド6 (FZD6) ポリペプチド、ポリペプチドN-
 アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ1 (GALNT1) ポリペプチド、ポリペ
 プチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ3 (GALNT3) ポリペプチ
 ド、ポリペプチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ5 (GALNT5)
 ポリペプチド、ポリペプチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ6 (GA
 LNT6) ポリペプチド、ポリペプチドN-アセチルガラクトサミニルトランスフェラー
 ゼ14 (GALNT14) ポリペプチド、ビタミンK依存性ガンマーカルボキシラーゼ (G
 GCX) ポリペプチド、ゴルジ膜タンパク質1 (GOLM1) ポリペプチド、ゴルジリ
 ンタンパク質3様 (GOLPH3L) ポリペプチド、グレイニーヘッド様タンパク質2ホ
 モログ (GRHL2) ポリペプチド、超長鎖 (3R) -3-ヒドロキシアシル-CoAデ
 ヒドラターゼ3 (HACD3) ポリペプチド、ヒアルロナンシンターゼ3 (HAS3) ポリ
 ペプチド、最初期応答3-相互作用タンパク質1 (IER3IP1) ポリペプチド、イ
 ムノグロブリンスーパーファミリーメンバー3 (IGSF3) ポリペプチド、インターロ
 イキン1受容体アクセサリタンパク質 (IL1RAP) ポリペプチド、インテグリンアル
 ファ2 (ITGA2) ポリペプチド、インテグリンベータ6 (ITGB6) ポリペプチ
 ド、キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーGメンバー2 (KLRG2) ポリペプチ
 ド、インポーチンサブユニットアルファ1 (KPNA2) ポリペプチド、ケラチノサイト
 関連タンパク質3 (KRTCAP3) ポリペプチド、ラジニン1 (LAD1) ポリペプチ
 ド、ラミニンサブユニットベータ3 (LAMB3) ポリペプチド、ラミニンサブユニット
 ガンマ2 (LAMC2) ポリペプチド、リソソーム関連膜糖タンパク質3 (LAMP3)
 ポリペプチド、調節因子複合体タンパク質LAMTOR2 (LAMTOR2) ポリペプチ
 ド、リゾカルジオリピンアシルトランスフェラーゼ1 (LCLAT1) ポリペプチド、リ
 ソソーム関連膜貫通タンパク質4B (LAPTM4B) ポリペプチド、LARGEキシロ
 シルおよびグルクロニルトランスフェラーゼ2 (LARGE2) ポリペプチド、リゾホス
 ファチジルコリンアシルトランスフェラーゼ1 (LPCAT1) ポリペプチド、脂肪分解
 刺激リポタンパク質受容体 (LSR) ポリペプチド、MAL2 ポリペプチド、マグネシウ
 ム輸送体タンパク質1 (MAGT1) ポリペプチド、MARCKS関連タンパク質 (MA
 RCKSL1) ポリペプチド、肝細胞増殖因子受容体 (MET) ポリペプチド、アルファ
 -1, 3-マンノシル-糖タンパク質2-ベーターN-アセチルグルコサミニルトランス
 フェラーゼ (MGAT1) ポリペプチド、メソテリン (MSLN) ポリペプチド、ムチン
 1 (MUC1) ポリペプチド、ムチン4 (MUC4) ポリペプチド、ニカストリン (NC
 STN) ポリペプチド、ネクチン1 (NECTIN1) ポリペプチド、ネクチン4 (NE
 CTIN4) ポリペプチド、GTPase NRas (NRAS) ポリペプチド、神経細
 胞接着分子 (Nr-CAM) ポリペプチド、5'-ヌクレオチダーゼ (NT5E) ポリペ
 プチド、核膜孔膜糖タンパク質210 (NUP210) ポリペプチド、プレセニリン関連
 ロンボイド様タンパク質、ミトコンドリア (PARL) ポリペプチド、ペルオキシソーム
 膜タンパク質PEX13 (PEX13) ポリペプチド、GPIエタノールアミンリン酸ト
 ランスフェラーゼ1 (PIGN) ポリペプチド、GPIトランスアミダーゼコンポーネン
 トPIG-T (PIGT) ポリペプチド、細胞質ホスホリパーゼA2 (PLA2G4A)

10

20

30

40

50

ポリペプチド、*l*-ホスファチジルイノシトール 4, 5-ニリン酸ホスホジエステラーゼ
et a-1 (PLCH1) ポリペプチド、プレクチン (PLEC) ポリペプチド、26S
 プロテアソーム非ATPase調節サブユニット2 (PSMD2) ポリペプチド、ホスフ
 アチジルセリンシンターゼ1 (PTDSS1) ポリペプチド、プロスタグランジンF2受
 容体負の調節因子 (PTGFRN) ポリペプチド、受容体型チロシン-タンパク質ホスフ
 ザターゼF (PTPRF) ポリペプチド、スルフヒドリルオキシダーゼ1 (QSOX1)
 ポリペプチド、Ras関連タンパク質Rab-25 (RAB25) ポリペプチド、Ras
 関連タンパク質Rab-38 (RAB38) ポリペプチド、Ras関連タンパク質Rab
 -6B (RAB6B) ポリペプチド、Ras関連タンパク質Rap-2b (RAP2B)
 ポリペプチド、タンパク質RCC2 (RCC2) ポリペプチド、GTP結合タンパク質R
 it1 (RIT1) ポリペプチド、分泌キャリア関連膜タンパク質3 (SCAMP3) ポ
 リペプチド、シンデカン1 (SDC1) ポリペプチド、タンパク質sel-1ホモログ3
 (SEL1L3) ポリペプチド、タンパク質Shroom2 (SHROOM2) ポリペプ
 チド、溶質キャリアファミリー2, 促進性グルコース輸送体メンバー1 (SLC2A1)
 ポリペプチド、システイン/グルタミン酸輸送体 (溶質キャリアファミリー7メンバー1
 1としても公知) (SLC7A11) ポリペプチド、ナトリウム依存性リン酸輸送タンパ
 ク質2B (SLC34A2) ポリペプチド、アデノシン3'-ホスホ5'-ホスホ硫酸輸送
 体1 (SLC35B2) ポリペプチド、亜鉛輸送体ZIP11 (SLC39A11) ポリ
 ペプチド、小型膜内在性タンパク質22 (SMIM22) ポリペプチド、テストシン (好
 酸球セリンプロテアーゼ1 (ESP-1) またはセリンプロテアーゼ21としても公知)
 ポリペプチド、酸性スフィンゴミエリナーゼ様ホスホジエステラーゼ3b (SMPDL3
 B) ポリペプチド、ステロールO-アシルトランスフェラーゼ1 (SOAT1) ポリペプ
 チド、スパスチン (SPAST) ポリペプチド、トランスロコン関連タンパク質サブユニ
 ャットアルファ (SSR1) ポリペプチド、トランスロコン関連タンパク質サブユニットデ
 ルタ (SSR4) ポリペプチド、過剰遺伝子座タンパク質4 (SURF4) ポリペプチド
 、シナプトグリン2 (SYNGR2) ポリペプチド、腫瘍関連カルシウムシグナルTRAN
 スデューサー2 (TACSTD2) ポリペプチド、カルシニューリンB相同タンパク質3
 (TESC) ポリペプチド、トランスフェリン受容体タンパク質1 (TFRC) ポリペプ
 チド、膜貫通チャネル様タンパク質5 (TMC5) ポリペプチド、カルシウムロード活性
 化カルシウムチャネル (TMCO1) ポリペプチド、膜貫通emp24ドメイン含有タン
 パク質2 (TMED2) ポリペプチド、膜貫通emp24ドメイン含有タンパク質3 (T
 MED3) ポリペプチド、膜貫通タンパク質132A (TMEM132A) ポリペプチド
 、膜貫通タンパク質33 (TMEM33) ポリペプチド、膜貫通プロテアーゼセリン4 (T
 MPRSS4) ポリペプチド、タンパク質O-マンノシルトランスフェラーゼTMT
 C3 (TMTC3) ポリペプチド、ミトコンドリア移入受容体サブユニットTOM22ホ
 モログ (TOMM22) ポリペプチド、トーシン1A相互作用タンパク質2、アイソフォ
 ームIFRG15 (TOR1AIP2) ポリペプチド、転座鎖関連膜タンパク質1 (TR
 AM1) ポリペプチド、一過性受容体電位カチオンチャネルサブファミリーVメンバー4
 (TRPV4) ポリペプチド、テトラトリコペプチド反復タンパク質33 (TTC33)
 ポリペプチド、UDPグルクロノシルトランスフェラーゼ1-6 (UGT1A6) ポリペ
 プチド、ウロプラキン1b (UPK1B) ポリペプチド、小胞関連膜タンパク質8 (VA
 MP8) ポリペプチド、液胞型ATPaseアセンブリー膜内在性タンパク質VMA21
 (VMA21) ポリペプチド、セリン/トレオニン-プロテインキナーゼVRK2 (VR
 K2) ポリペプチド、フォンウィルブランド因子Aドメイン含有タンパク質1 (VWA1)
) ポリペプチド、異種指向性および多所性レトロウイルス受容体1 (XPR1) ポリペプ
 チド、キシロシドキシロシルトランスフェラーゼ1 (XXYL1) ポリペプチド、ディ
 スインテグリンおよびメタロプロテアーゼドメイン含有タンパク質28 (ADAM28)
 ポリペプチド、チロシン-プロテインキナーゼ受容体UFO (AXL) ポリペプチド、ベ
 イシジン (BSG) ポリペプチド、プログラム細胞死1リガンド1 (CD274; PD-
 L1としても公知) ポリペプチド、白血球表面抗原CD47 (CD47) ポリペプチド、

10

20

30

40

50

クラスタリン (CLU) ポリペプチド、Dickkopf 関連タンパク質 1 (DKK1) ポリペプチド、受容体チロシンプロテインキナーゼ erbB-3 (ERBB3) ポリペプチド、血管内皮増殖因子受容体 3 (FLT4) ポリペプチド、(N-グリコシルノイラミン酸 (NeuGc、NGNA) -ガングリオシド GM3) (GM3) ポリペプチド、肝細胞増殖因子 (HGF) ポリペプチド、インスリン様増殖因子 1 受容体 (IGF1R) ポリペプチド、インターロイキン-6 (IL6) ポリペプチド、血管内皮増殖因子受容体 2 (KDR) ポリペプチド、リンパ球活性化遺伝子 3 タンパク質 (LAG3) ポリペプチド、ユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイム L1 (UCH-L1) ポリペプチド、Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、リンパ球抗原 6E (LY6E) ポリペプチド、神経原性遺伝子座ノッチホモログタンパク質 2 (NOTCH2) ポリペプチド、神経原性遺伝子座ノッチホモログタンパク質 3 (NOTCH3) ポリペプチド、ホスファチジルセリン提示ポリペプチド、Ig および ITIM ドメインを有する T 細胞免疫受容体 (TIGIT) ポリペプチド、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 10A (TNFRSF10A) ポリペプチド、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 10B (TNFRSF10B) ポリペプチド、腫瘍壊死因子リガンドスーパーファミリーメンバー 18 (TNFSF18) ポリペプチド、トロホブラスト糖タンパク質 (TPBG) ポリペプチド、血管内皮増殖因子 A (VEGFA) ポリペプチド、シアリル Tn (sTn) 抗原、シアリル-6T 抗原 (6-シアリルコア1)、T 抗原、ホスファチジルセリン、αGalNAc-Ser/Thr (Tn) 抗原、シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9)、Globoside H、Gb5 (SSEA-3)、ラクトリアオシルセラミド、(Lc3)、フォルスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B 抗原、LY6E、Lewis Y/CD174 抗原、シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知) 抗原、N-グリコシル GM3 ガングリオシド (NeuGc GM3)、ならびにその組合せからなる群から選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。

10

20

30

40

【0194】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、SLC34A2 ポリペプチド、CEACAM5 ポリペプチド、CEACAM6 ポリペプチド、EpCAM ポリペプチド、および／もしくはその組合せであるか、またはそれを含む。SLC34A2 ポリペプチドは、非小細胞肺がんのための治療標的として研究されている複数回膜貫通型膜輸送体である (Lin et al., 2015; これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。細胞接着分子 (CAM) の癌胎児抗原 (CEA) ファミリーのメンバーである CEACAM5 ポリペプチドは、胃腸がんに関係しており、細胞の分化、アポトーシス、および極性に関与していると思われる、細胞表面糖タンパク質である。CEACAM6 ポリペプチドは、CEACAM5 と同じタンパク質ファミリーのメンバーであり、クローン病および膵臓腺癌に関係しており、自然免疫系および細胞表面相互作用に関与していると思われる。EpCAM ポリペプチドは、胃腸癌に関係しており、同型カルシウム非依存性細胞接着分子として機能すると思われる。一部の実施形態では、SLC34A2 ポリペプチド、CEACAM5 ポリペプチド、CEACAM6 ポリペプチド、および／または EpCAM ポリペプチドは、インタクト EV 関連膜貫通タンパク質として検出される。本開示の一部の実施形態では、SLC34A2 ポリペプチド、CEACAM5 ポリペプチド、CEACAM6 ポリペプチド、および／または EpCAM ポリペプチドは、EV 関連膜貫通ポリペプチドとして検出される。

【0195】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる表面バイオマーカーは、ADGRF1 遺伝子によってコードされる接着 G タンパク質共役受容体 F1 ポリペプチド、CD166 抗原 (ALCAM) ポリペプチド、ATP 結合カセットサブファミリー C メンバー 3 (ABCC3) 遺伝子によってコードされる毛細胆管多特異性有機アニオン輸送体 2 ポリペプチド、アリルスルファターゼ L (ARSL) 遺伝子によってコ

50

ードされるアリルスルファターゼLポリペプチド、UDP-GlcNAc:betaGal
 1-3-N-Acetylglucosaminyltransferase 3 (B3GNT3)
 遺伝子によってコードされるN-Acetylglucosaminyltransferase 3ポリペプチド、UDP-GlcNAc:betaGal
 1-3-N-Acetylglucosaminyltransferase 5 (B3GNT5)
) 遺伝子によってコードされるラクトシルセラミド1, 3-N-Acetylglucosaminyltransferase 1 (CDGP1)
 遺伝子によってコードされるCUBドメイン含有タンパク質1ポリペプチド、
 カドヘリン1 (CDH1) 遺伝子によってコードされるカドヘリン1ポリペプチド、カド
 ヘリン3 (CDH3) 遺伝子によってコードされるカドヘリン3ポリペプチド、補体崩壊
 促進因子 (CD55) ポリペプチド、プログラム細胞死1リガンド1 (CD274; PD
 -L1としても公知) ポリペプチド、癌胎児抗原細胞接着分子5 (CEACAM5) 遺伝
 子によってコードされる癌胎児抗原細胞接着分子5ポリペプチド、癌胎児抗原細胞接着分
 子6 (CEACAM6) 遺伝子によってコードされる癌胎児抗原細胞接着分子6ポリペプ
 チド、カドヘリンEGF LAG 7回膜貫通型G型受容体1 (CELSR1) 遺伝子に
 よってコードされるカドヘリンEGF LAG 7回膜貫通型G型受容体1ポリペプチド
 、クローディン18 (CLDN18) 遺伝子によってコードされるクローディン18ポリ
 ペプチド、クローディン3 (CLDN3) 遺伝子によってコードされるクローディン3ポリ
 ペプチド、(CLDN4) 遺伝子によってコードされるクローディン4ポリペプチド、
 クローディン7 (CLDN7) 遺伝子によってコードされるクローディン7ポリペプチド
 、塩素イオン細胞内チャネル6 (CLIC6) 遺伝子によってコードされる塩素イオン細胞
 内チャネルタンパク質6ポリペプチド、悪性脳腫瘍1 (DMBT1) 遺伝子の欠失によ
 ってコードされる欠失型悪性脳腫瘍1タンパク質ポリペプチド、デスモグレイン2 (DS
 G2) 遺伝子によってコードされるデスモグレイン2ポリペプチド、上皮増殖因子受容体
 (EGFR) ポリペプチド、上皮細胞接着分子 (EPCAM) 遺伝子によってコードされ
 る上皮細胞接着分子ポリペプチド、エポキシドヒドロラーゼ3 (EPHX3) 遺伝子によ
 ってコードされるエポキシドヒドロラーゼ3ポリペプチド、eva-1ホモログAによ
 ってコードされるタンパク質eva-1ホモログAポリペプチド、プログラム細胞死 (EVA
 1A) 遺伝子の調節因子、FAM241B遺伝子によってコードされるタンパク質FAM
 241B、葉酸受容体アルファ (FOLR1) 遺伝子によってコードされる葉酸受容体
 アルファポリペプチド、FXND3遺伝子によってコードされるFXNDドメイン含有イ
 オン輸送調節因子3ポリペプチド、GALNT14遺伝子によってコードされるポリペプ
 チドN-Acetylglucosaminyltransferase 14、ギャップ接合タンパク質ベ
 ータ1 (GJB1) 遺伝子によってコードされるギャップ接合ベータ1タンパク質ポリペ
 プチド、ギャップ接合タンパク質ベータ2 (GJB2) 遺伝子によってコードされるギャ
 ップ接合ベータ2タンパク質ポリペプチド、肝細胞増殖因子受容体 (MET) ポリペプ
 チド、インスリン様増殖因子1受容体 (IGF1R) ポリペプチド、グリピカン4 (GPC
 4) 遺伝子によってコードされるグリピカン4ポリペプチド、HAS3遺伝子によってコ
 ードされるヒアルロナンシンターゼ3ポリペプチド、ヘパリン硫酸6-O-スルホトラン
 スフェラーゼ2 (HS6ST2) 遺伝子によってコードされるヘパリン硫酸6-O-スル
 ホトランスフェラーゼ2ポリペプチド、ER管腔タンパク質保持受容体3 (KDEL3)
) 遺伝子によってコードされるER管腔タンパク質保持受容体3ポリペプチド、ケラチノ
 サイト関連タンパク質3 (KRTCAP3) 遺伝子によってコードされるケラチノサイト
 関連タンパク質3ポリペプチド、ラミニンサブユニットベータ3 (LAMB3) 遺伝子に
 よってコードされるラミニンサブユニットベータ3ポリペプチド、LAPTM4B遺伝子
 によってコードされるリソソーム関連膜貫通タンパク質4Bポリペプチド、LARGE2
 遺伝子によってコードされるLARGEキシロシルおよびグルクロニルトランスフェラー
 ゼ2ポリペプチド、LFNG O-フコシルペプチド3-ベータ-N-Acetylglucosaminyltransferase
 (LFNG) 遺伝子によってコードされるベータ-1, 3-N-Acetylglucosaminyltransferase
 ゼルナティックフリンジポリペプチド、脂肪

10

20

30

40

50

分解刺激リボタンパク質受容体 (LSR) 遺伝子によってコードされる脂肪分解刺激リボタンパク質受容体ポリペプチド、MAL2 遺伝子によってコードされるタンパク質MAL2、マンノシダーゼエンドアルファ様 (MANEAL) 遺伝子によってコードされる糖タンパク質エンドーアルファ-1, 2-マンノシダーゼ様タンパク質ポリペプチド、メソテリン (MSLN) 遺伝子によってコードされるメソテリンポリペプチド、ムチン1細胞表面関連 (MUC1) 遺伝子によってコードされるムチン1ポリペプチド、ムチン21細胞表面関連 (MUC21) 遺伝子によってコードされるムチン21ポリペプチド、NRCAM 遺伝子によってコードされる神経細胞接着分子 (Nr-CAM) ポリペプチド、ホスファチジルイノシトールグリカンアンカー生合成クラスT (PIGT) 遺伝子によってコードされるGPITランスアミダーゼコンポーネントPIGTポリペプチド、ポドカリキシン様2 (PODXL2) 遺伝子によってコードされるポドカリキシン様タンパク質2ポリペプチド、PRSS21 遺伝子によってコードされるテスチシンポリペプチド、プロリンリッチおよびGlaドメイン4 (PRRG4) 遺伝子によってコードされる膜貫通ガンマーカルボキシグルタミン酸タンパク質4ポリペプチド、ROS癌原遺伝子1, 受容体チロシンキナーゼ (ROS1) 遺伝子によってコードされる癌原遺伝子チロシン-プロテインキナーゼROSポリペプチド、シンデカン1 (SDC1) 遺伝子によってコードされるシンデカン1ポリペプチド、セリン組み込み因子2 (SERINC2) 遺伝子によってコードされるセリン組み込み因子2ポリペプチド、てんかん発作関連6ホモログ様2 (SEZ6L2) 遺伝子によってコードされるてんかん発作6様タンパク質2ポリペプチド、溶質キャリアファミリー34 (リン酸ナトリウム) メンバー2 (SLC34A2) 遺伝子によってコードされるナトリウム依存性ホスフェート輸送タンパク質2Bポリペプチド、溶質キャリアファミリー44メンバー4 (SLC44A4) 遺伝子によってコードされるコリン輸送体様タンパク質4ポリペプチド、溶質キャリアファミリー6メンバー14 (SLC6A14) 遺伝子によってコードされるナトリウムおよび塩素イオン依存性中性および塩基性アミノ酸輸送体B (0+) ポリペプチド、溶質キャリアファミリー7メンバー7 (SLC7A7) 遺伝子によってコードされるY+Lアミノ酸輸送体1ポリペプチド、溶質キャリアファミリー7メンバー11 (SLC7A11) 遺伝子によってコードされるシステイン/グルタミン酸輸送体ポリペプチド、小型膜内在性タンパク質22 (SMIM22) 遺伝子によってコードされる小型膜内在性タンパク質22ポリペプチド、スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ酸様3B (SMPDL3B) 遺伝子によってコードされる酸性スフィンゴミエリナーゼ様ホスホジエステラーゼ3bポリペプチド、ST14膜貫通セリンプロテアーゼマトリブターゼ (ST14) 遺伝子によってコードされる腫瘍原性14タンパク質ポリペプチドのサブレッサー、腫瘍関連カルシウムシグナルトランスデュサー2 (TACSTD2) ポリペプチド、膜貫通チャネル様4 (TMC4) 遺伝子によってコードされる膜貫通チャネル様タンパク質4ポリペプチド、膜貫通チャネル様5 (TMC5) 遺伝子によってコードされる膜貫通チャネル様タンパク質5ポリペプチド、膜貫通タンパク質45B (TMEM45B) 遺伝子によってコードされる膜貫通タンパク質45Bポリペプチド、膜貫通セリンプロテアーゼ2 (TMPRSS2) 遺伝子によってコードされる膜貫通プロテアーゼセリン2ポリペプチド、膜貫通セリンプロテアーゼ4 (TMPRSS4) 遺伝子によってコードされる膜貫通プロテアーゼセリン4ポリペプチド、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー10B (TNFRSF10B) ポリペプチド、テトラスパニン1 (TSPAN1) 遺伝子によってコードされるテトラスパニン1ポリペプチド、テトラスパニン8 (TSPAN8) 遺伝子によってコードされるテトラスパニン8ポリペプチド、UCHL1 遺伝子によってコードされるユビキチンカルボキシル末端ヒドロラーゼアイソザイムL1 (UCH-L1) ポリペプチド、Lewis X抗原、シアリルLewis X抗原、sTn抗原、Tn抗原、T抗原、ならびにその組合せからなる群から選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。

【0196】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる標的バイオマーカーは、SLC34A2ポリペプチド、CEACAM5ポリペプチド、CEACAM

10

20

30

40

50

6 ポリペプチド、E p C A M ポリペプチド、およびその組合せからなる群から選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。

【0197】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる標的バイオマーカーは、A L C A M ポリペプチド、C D 5 5 ポリペプチド、C D H 1 ポリペプチド、C D H 3 ポリペプチド、C D 2 7 4 (P D - L 1) ポリペプチド、C E A C A M 5 ポリペプチド、C E A C A M 6 ポリペプチド、D S G 2 ポリペプチド、E G F R ポリペプチド、E P C A M ポリペプチド、F O L R 1 ポリペプチド、I G 1 F R ポリペプチド、M E T ポリペプチド、M S L N ポリペプチド、M U C 1 ポリペプチド、S L C 3 4 A 2 ポリペプチド、s T n 抗原、T n 抗原、T 抗原、T A C S T D 2 ポリペプチド、T N F R S F 1 0 B 10
ポリペプチド、およびその組合せからなる群から選択される表面バイオマーカーであるか、またはそれを含む。

【0198】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A D G R F 1 ポリペプチド、A B C A 3 ポリペプチド、A B C C 1 ポリペプチド、A B C C 3 ポリペプチド、A C B D 3 ポリペプチド、A C S L 5 ポリペプチド、A G E R ポリペプチド、A L C A M ポリペプチド、A P 1 M 2 ポリペプチド、A P H 1 A ポリペプチド、A P O O ポリペプチド、A T P 1 1 A ポリペプチド、A T P 1 1 B ポリペプチド、A T P 1 B 1 ポリペプチド、A T P 6 A P 2 ポリペプチド、B 3 G N T 5 ポリペプチド、B 4 G A L T 4 ポリペプチド、B C A P 3 1 ポリペプチド、B S P R Y ポリペプチド、C D 1 0 9 ポリペプチド、C D 5 5 20
ポリペプチド、C D 9 ポリペプチド、C D C 4 2 ポリペプチド、C D H 1 ポリペプチド、C D H 3 ポリペプチド、C D K A L 1 ポリペプチド、C E A C A M 5 ポリペプチド、C E A C A M 6 ポリペプチド、C E L S R 1 ポリペプチド、C I P 2 A ポリペプチド、C I S D 2 ポリペプチド、C K A P 4 ポリペプチド、C L C A 2 ポリペプチド、C L D N 1 ポリペプチド、C L I C 6 ポリペプチド、C L P T M 1 L ポリペプチド、C L S T N 1 ポリペプチド、C N T N 1 ポリペプチド、C P D ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、C Y P 4 F 1 1 ポリペプチド、C Y P 4 F 3 ポリペプチド、D P Y 1 9 L 1 ポリペプチド、D S C 2 ポリペプチド、D S C 3 ポリペプチド、D S G 2 ポリペプチド、D S G 3 ポリペプチド、E G F R ポリペプチド、E P C A M ポリペプチド、E P H B 3 ポリペプチド、F A M 2 4 1 B ポリペプチド、F A T 2 ポリペプチド、F B X O 4 5 ポリペプチド、F E R M T 1 30
ポリペプチド、F O L R 1 ポリペプチド、F X Y D 3 ポリペプチド、F Z D 6 ポリペプチド、G A L N T 1 ポリペプチド、G A L N T 3 ポリペプチド、G A L N T 5 ポリペプチド、G A L N T 6 ポリペプチド、G A L N T 1 4 ポリペプチド、G G C X ポリペプチド、G O L M 1 ポリペプチド、G O L P H 3 L ポリペプチド、G R H L 2 ポリペプチド、H A C D 3 ポリペプチド、H A S 3 ポリペプチド、I E R 3 I P 1 ポリペプチド、I G S F 3 ポリペプチド、I L 1 R A P ポリペプチド、I T G A 2 ポリペプチド、I T G B 6 ポリペプチド、K L R G 2 ポリペプチド、K P N A 2 ポリペプチド、K R T C A P 3 ポリペプチド、L A D 1 ポリペプチド、L A M B 3 ポリペプチド、L A M C 2 ポリペプチド、L A M P 3 ポリペプチド、L A P T M 4 B ポリペプチド、L A M T O R 2 ポリペプチド、L A R G E 2 ポリペプチド、L C L A T 1 ポリペプチド、L P C A T 1 ポリペプチド、L S R 40
ポリペプチド、M A G T 1 ポリペプチド、M A L 2 ポリペプチド、M A R C K S L 1 ポリペプチド、M E T ポリペプチド、M G A T 1 ポリペプチド、M S L N ポリペプチド、M U C 1 ポリペプチド、M U C 4 ポリペプチド、N C S T N ポリペプチド、N E C T I N 1 ポリペプチド、N E C T I N 4 ポリペプチド、N R A S ポリペプチド、N R C A M ポリペプチド、N T 5 E ポリペプチド、N U P 2 1 0 ポリペプチド、P A R L ポリペプチド、P E X 1 3 ポリペプチド、P I G N ポリペプチド、P I G T ポリペプチド、P L A 2 G 4 A ポリペプチド、P L C H 1 ポリペプチド、P L E C ポリペプチド、P R S S 2 1 ポリペプチド、P S M D 2 ポリペプチド、P T D S S 1 ポリペプチド、P T G F R N ポリペプチド、P T P R F ポリペプチド、Q S O X 1 ポリペプチド、R A B 2 5 ポリペプチド、R A B 3 8 50
ポリペプチド、R A B 6 B ポリペプチド、R A P 2 B ポリペプチド、R C C 2 ポリペ

プチド、RIT1ポリペプチド、SCAMP3ポリペプチド、SDC1ポリペプチド、SEL1L3ポリペプチド、SHROOM2ポリペプチド、SLC2A1ポリペプチド、SLC34A2ポリペプチド、SLC35B2ポリペプチド、SLC39A11ポリペプチド、SLC7A11ポリペプチド、SMIM22ポリペプチド、SMPDL3Bポリペプチド、SOAT1ポリペプチド、SPASTポリペプチド、SSR1ポリペプチド、SSR4ポリペプチド、SURF4ポリペプチド、SYNGR2ポリペプチド、TACSTD2ポリペプチド、TESCポリペプチド、TFRCポリペプチド、TMC5ポリペプチド、TMCO1ポリペプチド、TMED2ポリペプチド、TMED3ポリペプチド、TMEM132Aポリペプチド、TMM33ポリペプチド、TMPRSS4ポリペプチド、TMTc3ポリペプチド、TOMM22ポリペプチド、TOR1AIP2ポリペプチド、TRAM1ポリペプチド、TRPV4ポリペプチド、TTC33ポリペプチド、UGT1A6ポリペプチド、UPK1Bポリペプチド、VAMP8ポリペプチド、VMA21ポリペプチド、VRK2ポリペプチド、VWA1ポリペプチド、XPR1ポリペプチド、XXYL1T1ポリペプチド、ADAM28ポリペプチド、AXLポリペプチド、BSGポリペプチド、CD274ポリペプチド、CD47ポリペプチド、CLUポリペプチド、DKK1ポリペプチド、ERBB3ポリペプチド、FLT4ポリペプチド、GM3ポリペプチド、HGFポリペプチド、IGF1Rポリペプチド、IL6ポリペプチド、KDRポリペプチド、LAG3ポリペプチド、UCHL1ポリペプチド、Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、LY6Eポリペプチド、NOTCH2ポリペプチド、NOTCH3ポリペプチド、ホスファチジルセリン提示ポリペプチド、TIGITポリペプチド、TNFRSF10Aポリペプチド、TNFRSF10Bポリペプチド、TNFSF18ポリペプチド、TPBGポリペプチド、VEGFAポリペプチド、Tn 抗原、Lewis Y/CD174 抗原、シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知) 抗原、NeuGcGM3 ガングリオシド、およびその組合せからなるリストから選択される1つまたは複数の細胞外小胞関連表面バイオマーカーを含む。

10

20

30

40

50

【0199】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、HS6ST2ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、HAS3ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、ABCA13ポリペプチド、TMPRSS4ポリペプチド、UGT1A6ポリペプチド、ILDR1ポリペプチド、CYP4F11ポリペプチド、PIGTポリペプチド、LAMB3ポリペプチド、PRSS21ポリペプチド、DSG3ポリペプチド、SDK2ポリペプチド、およびその組合せからなるリストから選択される1つまたは複数の細胞外小胞関連表面バイオマーカーを含む。

【0200】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、HS6ST2ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、HAS3ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、ABCA13ポリペプチド、TMPRSS4ポリペプチド、UGT1A6ポリペプチド、ILDR1ポリペプチド、CYP4F11ポリペプチド、PIGTポリペプチド、LAMB3ポリペプチド、PRSS21ポリペプチド、DSG3ポリペプチド、SDK2ポリペプチド、FERMT1ポリペプチド、EPCAMポリペプチド、SDC1ポリペプチド、PANX2ポリペプチド、ULBP2ポリペプチド、ECE2ポリペプチド、KRTCAP3ポリペプチド、CLCA2ポリペプチド、KPNA2ポリペプチド、TMM132Aポリペプチド、ABCC1ポリペプチド、UPK1Bポリペプチド、DSG2ポリペプチド、NECTIN1ポリペプチド、SHISA2ポリペプチド、およびその組合せからなるリストから選択される1つまたは複数の細胞外小胞関連表面バイオマーカーを含む。

【0201】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる標的バイオマーカーは、アミノキシダーゼ銅含有1 (AOC1) 遺伝子によってコードされるアミロリド感受性アミノキシダーゼ [銅含有] ポリペプチド、第12染色体オープンリーデ

イングフレーム 45 (C12orf45) 遺伝子によってコードされる未同定タンパク質
 C12orf45 ポリペプチド、細胞レチノイン酸結合タンパク質 2 (CRABP2) 遺
 伝子によってコードされる細胞レチノイン酸結合タンパク質 2 ポリペプチド、システイン
 SN (CST1) 遺伝子によってコードされるシステイン SN ポリペプチド、ETS バリ
 アント転写因子 4 (ETV4) 遺伝子によってコードされる ETS 転座バリエーション 4 ポリ
 ペプチド、配列類似性 83 メンバー A を有するファミリー (FAM83A) 遺伝子によっ
 てコードされるタンパク質 FAM83A ポリペプチド、フォークヘッドボックス A2 (F
 OXA2) 遺伝子によってコードされる肝細胞核因子 3-ベータポリペプチド、高移動度
 ボックス 3 (HMGB3) 遺伝子によってコードされる高移動度タンパク質 B3 ポリペプ
 チド、ガレクチン 3 結合タンパク質 (LGALS3BP) 遺伝子によってコードされるガ
 レクチン-3-結合タンパク質ポリペプチド、マクロファージ遊走阻害因子 (MIF) 遺
 伝子によってコードされるマクロファージ遊走阻害因子ポリペプチド、ナプシン A アスパ
 ラギン酸ペプチダーゼ (NAPSA) 遺伝子によってコードされるナプシン A ポリペプチ
 ド、タンパク質ホスファターゼ 1 調節阻害物質サブユニット 14D (PPP1R14D)
 遺伝子によってコードされるタンパク質ホスファターゼ 1 調節サブユニット 14D ポリペ
 プチド、S100 カルシウム結合タンパク質 A14 (S100A14) 遺伝子によってコ
 ードされるタンパク質 S100-A14 ポリペプチド、SH3 ドメイン結合キナーゼ 1 (
 SBK1) 遺伝子によってコードされるセリン/トレオニン-プロテインキナーゼ SBK
 1 ポリペプチド、セクレトグロビンファミリー 3A メンバー 2 (SCGB3A2) 遺伝子
 によってコードされるセクレトグロビンファミリー 3A メンバー 2 ポリペプチド、サー
 ファクタント関連 2 (SFTA2) 遺伝子によってコードされるサーファクタント関連タン
 パク質 2 ポリペプチド、サーファクタントタンパク質 A1 (SFTPA1) 遺伝子によっ
 てコードされる肺サーファクタント関連タンパク質 A1 ポリペプチド、サーファクタント
 タンパク質 A2 (SFTPA2) 遺伝子によってコードされる肺サーファクタント関連タン
 パク質 A2 ポリペプチド、サーファクタントタンパク質 B (SFTPB) 遺伝子によっ
 てコードされる肺サーファクタント関連タンパク質 B ポリペプチド、セリンペプチダーゼ
 阻害物質 Kazal 1 型 (SPINK1) 遺伝子によってコードされるセリンプロテア
 ーゼ阻害物質 Kazal 1 型ポリペプチド、トランスフォーミング増殖因子アルファ (
 TGFα) 遺伝子によってコードされるプロトランスフォーミング増殖因子アルファポリ
 ペプチド、ジンクフィンガー CCH 型含有 11A (ZC3H11A) 遺伝子によってコ
 ードされるジンクフィンガー CCH ドメイン含有タンパク質 11A ポリペプチド、およ
 びその組合せからなる群から選択される小胞内バイオマーカーであるか、またはそれを含
 む。

10

20

30

40

50

【0202】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーにおける標的バイオマ
 ーカーは、ABRACL ポリペプチド、ACP5 ポリペプチド、ADH7 ポリペプチド、
 AGR2 ポリペプチド、AIF1 ポリペプチド、AKR1C1 ポリペプチド、AKR1C
 2 ポリペプチド、AKR1C3 ポリペプチド、ALDH1A1 ポリペプチド、ALDH3
 A1 ポリペプチド、ALDH3B2 ポリペプチド、ALG1L ポリペプチド、AP1M2
 ポリペプチド、APOBEC3B ポリペプチド、APOBEC3C ポリペプチド、ARN
 TL2 ポリペプチド、ASF1B ポリペプチド、AURKB ポリペプチド、BAIAP2
 L1 ポリペプチド、BIRC5 ポリペプチド、C15orf48 ポリペプチド、C19o
 rf33 ポリペプチド、C1S ポリペプチド、C8orf4 ポリペプチド、CA9 ポリペ
 プチド、CALML3 ポリペプチド、CAPNS2 ポリペプチド、CBLC ポリペプチド
 、CCL19 ポリペプチド、CCNB2 ポリペプチド、CDC20 ポリペプチド、CDC
 45 ポリペプチド、CDCA4 ポリペプチド、CDCA5 ポリペプチド、CDK1 ポリペ
 プチド、CDKN2A ポリペプチド、CDKN2B ポリペプチド、CENPW ポリペプチ
 ド、CEP55 ポリペプチド、CES1 ポリペプチド、CHMP4C ポリペプチド、CN
 N2 ポリペプチド、CPA3 ポリペプチド、CRABP2 ポリペプチド、CSTA ポリペ
 プチド、CTSC ポリペプチド、CTSE ポリペプチド、CYP2S1 ポリペプチド、D

P Y S L 3 ポリペプチド、E F S ポリペプチド、E G L N 3 ポリペプチド、E H F ポリペ
プチド、E L F 3 ポリペプチド、E L F 4 ポリペプチド、E N A H ポリペプチド、E S R
P 1 ポリペプチド、E V P L ポリペプチド、F A M 1 2 9 B ポリペプチド、F A M 6 0 A
ポリペプチド、F A M 8 3 D ポリペプチド、F A M 8 3 H ポリペプチド、F B P 1 ポリペ
プチド、F E R M T 1 ポリペプチド、F O X E 1 ポリペプチド、F O X M 1 ポリペプチド
、G B P 6 ポリペプチド、G N A 1 5 ポリペプチド、G P X 2 ポリペプチド、G R H L 2
ポリペプチド、G S T A 1 ポリペプチド、H C K ポリペプチド、H O X B 7 ポリペプチド
、I D 1 ポリペプチド、I G F 2 B P 2 ポリペプチド、I M P A 2 ポリペプチド、I R F
6 ポリペプチド、I V L ポリペプチド、J U P ポリペプチド、K I A A 1 5 2 2 ポリペプ
チド、K I F 2 C ポリペプチド、K I F C 1 ポリペプチド、K L F 4 ポリペプチド、K L
F 5 ポリペプチド、K R T 1 3 ポリペプチド、K R T 1 4 ポリペプチド、K R T 1 5 ポリ
ペプチド、K R T 1 6 ポリペプチド、K R T 1 7 ポリペプチド、K R T 1 8 ポリペプチド
、K R T 1 9 ポリペプチド、K R T 5 ポリペプチド、K R T 6 A ポリペプチド、K R T 6
B ポリペプチド、K R T 6 C ポリペプチド、K R T 7 ポリペプチド、K R T 8 ポリペプチ
ド、L G A L S 7 B ポリペプチド、L S P 1 ポリペプチド、M A G E A 4 ポリペプチド、
M A G E A 6 ポリペプチド、M C M 2 ポリペプチド、M D F I ポリペプチド、M Y B L 2
ポリペプチド、M Y H 1 4 ポリペプチド、M Z B 1 ポリペプチド、N C F 2 ポリペプチド
、N N M T ポリペプチド、N R A R P ポリペプチド、N U P 2 1 0 ポリペプチド、N U S
A P 1 ポリペプチド、O S G I N 1 ポリペプチド、P A L L D ポリペプチド、P I T X 1
ポリペプチド、P K P 1 ポリペプチド、P K P 3 ポリペプチド、P L E K ポリペプチド、
P L E K 2 ポリペプチド、P O S T N ポリペプチド、P P P 1 R 1 4 C ポリペプチド、P
R A M E ポリペプチド、P T P N 6 ポリペプチド、R B P 1 ポリペプチド、R I N 2 ポリ
ペプチド、R I P K 4 ポリペプチド、R P S 4 Y 1 ポリペプチド、R R M 2 ポリペプチド
、S 1 0 0 A 1 1 ポリペプチド、S 1 0 0 A 1 4 ポリペプチド、S 1 0 0 A 1 6 ポリペプ
チド、S 1 0 0 A 2 ポリペプチド、S 1 0 0 P ポリペプチド、S E R P I N B 1 3 ポリペ
プチド、S E R P I N B 3 ポリペプチド、S E R P I N B 5 ポリペプチド、S H 3 B P 4
ポリペプチド、S N A I 2 ポリペプチド、S O X 2 ポリペプチド、S P I 1 ポリペプチド
、S P I N T 1 ポリペプチド、S P R R 1 A ポリペプチド、S P R R 1 B ポリペプチド、
S P R R 2 A ポリペプチド、S P R R 2 D ポリペプチド、S P R R 2 E ポリペプチド、S
P R R 3 ポリペプチド、S U L F 1 ポリペプチド、S Y K ポリペプチド、S Y T L 1 ポリ
ペプチド、T B C 1 D 2 ポリペプチド、T E A D 2 ポリペプチド、T E A D 3 ポリペプチ
ド、T F A P 2 C ポリペプチド、T H B S 2 ポリペプチド、T K 1 ポリペプチド、T O P
2 A ポリペプチド、T P 6 3 ポリペプチド、T P D 5 2 ポリペプチド、T P X 2 ポリペプ
チド、T R I M 2 9 ポリペプチド、T R I P 1 3 ポリペプチド、U B E 2 C ポリペプチド
、Y A P 1 ポリペプチド、Z C 3 H 1 1 A ポリペプチド、Z N F 2 1 7 ポリペプチド、Z
N F 7 5 0 ポリペプチド、およびその組合せからなる群から選択される小胞内バイオマ
ーカーであるか、またはそれを含む。

【0203】

一部の実施形態では、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーに含まれる標的バイオ
マーカーは、

10

20

30

40

50

【化 5 9】

ABCC3 RNA, AOC1 RNA, ARSL RNA, B3GNT3 RNA,
 C12orf45 RNA, CDCP1 RNA, CDH1 RNA, CDH3 RNA, CEACAM5 RNA, CEACAM6 RNA,
 CELSR1 RNA, CLDN18 RNA, CLDN3 RNA, CLDN4 RNA, CLDN7 RNA, CLIC6 RNA,
 CRABP2 RNA, CST1 RNA, DMBT1 RNA, DSG2 RNA, EPCAM RNA, EPHX3 RNA, ETV4
 RNA, EVA1A RNA, FAM83A RNA, FOLR1 RNA, FOXA2 RNA, GJB1 RNA, GJB2 RNA,
 GPC4 RNA, HMGB3 RNA, HS6ST2 RNA, KDEL3 RNA, KRTCAP3 RNA, LAMB3 RNA,
 LFNG RNA, LGALS3BP RNA, LSR RNA, MANEAL RNA, MIF RNA, MSLN RNA, MUC1
 RNA, MUC21 RNA, NAPS RNA, PIGT RNA, PODXL2 RNA, PPP1R14D RNA, PRRG4
 RNA, ROS1 RNA, S100A14 RNA, SBK1 RNA, SCGB3A2 RNA, SDC1 RNA, SERINC2
 RNA, SEZ6L2 RNA, SFTA2 RNA, SFTPA1 RNA, SFTPA2 RNA, SFTPB RNA, SLC34A2
 RNA, SLC44A4 RNA, SLC6A14 RNA, SLC7A7 RNA, SMIM22 RNA, SMPDL3B RNA,
 SPINK1 RNA, ST14 RNA, TGFA RNA, TMC4 RNA, TMC5 RNA, TMEM45B RNA,
 TMPRSS2 RNA, TMPRSS4 RNA, TSPAN1 RNA, TSPAN8 RNA, ZC3H11A RNA,

10

20

およびその組合せからなる群から選択される小胞内RNA（例えば、mRNA）バイオマーカーであるか、またはそれを含む。

【0204】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、

【化 6 0】

ABCA3 RNA, ABCC1
 RNA, ABRACL RNA, ACP5 RNA, ADAM23 RNA, ADH7 RNA, AGR2 RNA,
 AIF1 RNA, AKR1C1 RNA, AKR1C2 RNA, AKR1C3 RNA, ALDH1A1 RNA,
 ALDH3A1 RNA, ALDH3B2 RNA, ALG1L RNA, ANTXR1 RNA, AP1M2 RNA,
 APOBEC3B RNA, APOBEC3C RNA, AQP3 RNA, AREG RNA, ARNTL2 RNA,
 ASF1B RNA, ATP8B1 RNA, AURKB RNA, B3GNT5 RNA, BAIAP2L1 RNA,
 BCAM RNA, BIK RNA, BIRC5 RNA, C15orf48 RNA, C19orf33 RNA, C1S RNA,
 C8orf4 RNA, CA12 RNA, CA9 RNA, CALML3 RNA, CAPNS2 RNA, CBLC RNA,
 CCL19 RNA, CCL5 RNA, CCNB2 RNA, CD109 RNA, CD24 RNA, CD53 RNA,
 CD74 RNA, CD9 RNA, CDC20 RNA, CDC42EP1 RNA, CDC45 RNA, CDCA4 RNA,
 CDCA5 RNA, CDCP1 RNA, CDH1 RNA, CDH3 RNA, CDK1 RNA, CDKN2A
 RNA, CDKN2B RNA, CEACAM5 RNA, CEACAM6 RNA, CELSR1 RNA, CENPW
 RNA, CEP55 RNA, CES1 RNA, CHMP4C RNA, CLCA2 RNA, CLDN1 RNA,
 CLDN4 RNA, CLDN7 RNA, CNN2 RNA, COL17A1 RNA, CPA3 RNA, CRABP2
 RNA, CSTA RNA, CTSC RNA, CTSE RNA, CX3CL1 RNA, CXADR RNA, CXCR4
 RNA, CYBB RNA, CYP2S1 RNA, CYP4F11 RNA, DAPL1 RNA, DPYSL3 RNA,

30

40

50

【化 6 1】

DSC2 RNA, DSC3 RNA, DSG2 RNA, DSG3 RNA, DSP RNA, EFNA1 RNA, EFS
 RNA, EGFR RNA, EGLN3 RNA, EHD2 RNA, EHF RNA, ELF3 RNA, ELF4 RNA,
 EMP1 RNA, EMP2 RNA, ENAH RNA, EPCAM RNA, EPHA2 RNA, EPHB3 RNA,
 EPHX1 RNA, ESRP1 RNA, EVPL RNA, F11R RNA, F2R RNA, F2RL1 RNA, F3
 RNA, FAM129B RNA, FAM60A RNA, FAM83D RNA, FAM83H RNA, FAT1 RNA,
 FAT2 RNA, FBLIM1 RNA, FBP1 RNA, FCER1G RNA, FERMT1 RNA, FGFR2
 RNA, FGFR3 RNA, FOXE1 RNA, FOXM1 RNA, FXYD3 RNA, GALNT3 RNA, 10
 GBP6 RNA, GJA1 RNA, GJB2 RNA, GJB3 RNA, GJB5 RNA, GJB6 RNA, GNA15
 RNA, GPC1 RNA, GPC3 RNA, GPNMB RNA, GPR87 RNA, GPRC5A RNA, GPX2
 RNA, GRHL2 RNA, GSTA1 RNA, HAS3 RNA, HCK RNA, HOXB7 RNA, ID1
 RNA, IGF2BP2 RNA, IGSF9 RNA, IL2RG RNA, IMPA2 RNA, IRF6 RNA, ITGA2
 RNA, ITGA6 RNA, ITGB4 RNA, ITGB6 RNA, IVL RNA, JAG2 RNA, JUP RNA,
 KCNS3 RNA, KIAA1522 RNA, KIF2C RNA, KIFC1 RNA, KITLG RNA, KLF4 RNA,
 KLF5 RNA, KRT13 RNA, KRT14 RNA, KRT15 RNA, KRT16 RNA, KRT17 RNA,
 KRT18 RNA, KRT19 RNA, KRT5 RNA, KRT6A RNA, KRT6B RNA, KRT6C 20
 RNA, KRT7 RNA, KRT8 RNA, KRTCAP3 RNA, LAMP3 RNA, LAPTM5 RNA,
 LGALS7B RNA, LRP11 RNA, LRRC4 RNA, LSP1 RNA, LSR RNA, LYPD3 RNA,
 MAGEA4 RNA, MAGEA6 RNA, MAL2 RNA, MAOA RNA, MARCO RNA, MCM2
 RNA, MDFI RNA, MET RNA, MMP14 RNA, MPZL2 RNA, MUC1 RNA, MYBL2
 RNA, MYH14 RNA, MYOF RNA, MZB1 RNA, NCF2 RNA, NKG7 RNA, NNMT
 RNA, NOTCH3 RNA, NRARP RNA, NTRK2 RNA, NUP210 RNA, NUSAP1 RNA,
 OSGIN1 RNA, OSMR RNA, PALLD RNA, PDPN RNA, PDZK1IP1 RNA, PECAM1
 RNA, PERP RNA, PIGR RNA, PIGT RNA, PITX1 RNA, PKP1 RNA, PKP3 RNA, 30
 PLEK RNA, PLEK2 RNA, PLVAP RNA, PMP22 RNA, POSTN RNA, PPL RNA,
 PPP1R14C RNA, PRAME RNA, PROM2 RNA, PRRG4 RNA, PRSS8 RNA, PTGES
 RNA, PTGFRN RNA, PTPN6 RNA, PTPRF RNA, PTPRZ1 RNA, RAB25 RNA,
 RAB38 RNA, RAET1L RNA, RARRES1 RNA, RBP1 RNA, RGS1 RNA, RHCG
 RNA, RHOV RNA, RIN2 RNA, RIPK4 RNA, RPS4Y1 RNA, RRM2 RNA, S100A10
 RNA, S100A11 RNA, S100A14 RNA, S100A16 RNA, S100A2 RNA, S100P RNA,
 SCNN1A RNA, SDC1 RNA, SERINC2 RNA, SERPINB13 RNA, SERPINB3 RNA,
 SERPINB5 RNA, SEZ6L2 RNA, SH3BP4 RNA, SHISA2 RNA, SLC1A5 RNA, 40

【化 6 2】

SLC2A1 RNA, SLC34A2 RNA, SLC40A1 RNA, SLC6A8 RNA, SLC7A8 RNA, SNAI2 RNA, SOX2 RNA, SPI1 RNA, SPINT1 RNA, SPINT2 RNA, SPRR1A RNA, SPRR1B RNA, SPRR2A RNA, SPRR2D RNA, SPRR2E RNA, SPRR3 RNA, ST14 RNA, STEAP1 RNA, SULF1 RNA, SYK RNA, SYTL1 RNA, TACSTD2 RNA, TBC1D2 RNA, TEAD2 RNA, TEAD3 RNA, TFAP2C RNA, THBD RNA, THBS2 RNA, TK1 RNA, TM4SF1 RNA, TMC4 RNA, TMEM30B RNA, TMEM54 RNA, TMPRSS11D RNA, TMPRSS11E RNA, TMPRSS4 RNA, TNFRSF18 RNA, TNS4 RNA, TOP2A RNA, TP53I11 RNA, TP63 RNA, TPD52 RNA, TPX2 RNA, TREM2 RNA, TRIM29 RNA, TRIP13 RNA, TSPAN1 RNA, TSPAN13 RNA, TSPAN6 RNA, TSPAN7 RNA, TUSC3 RNA, TYROBP RNA, UBE2C RNA, UPK1B RNA, VAMP8 RNA, VANGL2 RNA, WLS RNA, YAP1 RNA, ZC3H11A RNA, ZNF217 RNA, ZNF750 RNA,

10

およびその組合せからなるリストの 1 つまたは複数の小胞内 RNA（例えば、mRNA）バイオマーカーを含む。

20

【0205】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）、および少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を含む。一部の実施形態では、少なくとも 1 つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび少なくとも 1 つの表面バイオマーカーは、同じである。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの少なくとも 1 つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび少なくとも 1 つの表面バイオマーカーは、別個である。例えば、一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、SLC34A2 ポリペプチドであるか、それを含む、少なくとも 1 つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに CEACAM6 ポリペプチド、および／もしくは EPCAM ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも 1 つの表面バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、CEACAM5 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも 1 つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに CEACAM6 ポリペプチド、および／もしくは SLC34A2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも 1 つの表面バイオマーカーを含む。

30

【0206】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）および少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の小胞内バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を含む。一部のそのような実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび小胞内バイオマーカーは、同じ遺伝子によってコードされ得るが、前者は、細胞外小胞の膜において発現され、後者は、細胞外小胞内で発現される。一部のそのような実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび小胞内バイオマーカーは、異なる遺伝子によってコードされ得る。

40

【0207】

50

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）および少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、またはそれよりも多く）の小胞内RNA（例えば、mRNA）バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を含む。一部のそのような実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび小胞内RNA（例えば、mRNA）バイオマーカーは、同じ遺伝子によってコードされ得る。一部のそのような実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび小胞内RNA（例えば、mRNA）バイオマーカーは、異なる遺伝子によってコードされ得る。

【0208】

10

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、表4Aおよび／または表4Bに表されるバイオマーカーの組合せを含む。一部の実施形態では、そのような組合せにおけるバイオマーカーは、例えば、表4Aおよび／または表4Bに表されるように、捕捉プローブポリペプチド標的として（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）利用される。一部の実施形態では、そのような組合せにおけるバイオマーカーは、例えば、表4Aおよび／または表4Bに表されるように、検出プローブポリペプチド標的として（標的表面バイオマーカーとして）利用される。

【0209】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともSLC34A2ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）およびCEACAM6ポリペプチド（標的表面バイオマーカーとして）を含む。

20

【0210】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともSLC34A2ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）およびEpCAMポリペプチド（標的表面バイオマーカーとして）を含む。

【0211】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともCEACAM5ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）およびCEACAM6ポリペプチド（標的表面バイオマーカーとして）を含む。

【0212】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともCEACAM5ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）およびSLC34A2ポリペプチド（標的表面バイオマーカーとして）を含む。

30

【0213】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともSLC34A2ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）、ならびにCEACAM6ポリペプチドおよびEpCAMポリペプチドであり得るか、またはそれを含み得る、少なくとも2つの標的表面バイオマーカーを含む。

【0214】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくともCEACAM5ポリペプチド（細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして）、ならびにCEACAM6ポリペプチドおよびSLC34A2ポリペプチドであり得るか、またはそれを含み得る、少なくとも2つの標的表面バイオマーカーを含む。

40

【0215】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、以下：（i）CEACAM5、CEACAM6、および／またはMUC1と組み合わせられたsTn抗原；ならびに（ii）CEACAM5、シアリルLewis X、および／またはLewis Yと組み合わせられたMUC1のうちの少なくとも1つを含む。

【0216】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、以下の組合

50

せ：(i) (sTn 抗原、CEACAM5)；(ii) (sTn 抗原、CEACAM5、MUC1)；(iii) (sTn 抗原、MUC1)；(iv) (sTn 抗原、CEACAM6)；(v) (sTn 抗原、CEACAM5、CEACAM6)；(vi) (sTn 抗原、MUC1、CEACAM6)；(vii) (MUC1、CEACAM5)；(viii) (MUC1、CEACAM5、シアリル Lewis X 抗原)；および (ix) (MUC1、CEACAM5、Lewis Y 抗原) のうちの少なくとも1つを含む。

【0217】

一部の実施形態では、提供されるバイオマーカーのいずれか1つは、野生型形態のタンパク質および／またはRNA（例えば、mRNA）発現レベルによって検出および／または測定され得る。

【0218】

一部の実施形態では、提供されるバイオマーカーのいずれか1つは、変異形態のタンパク質および／またはRNA（例えば、mRNA）発現レベルによって検出および／または測定され得る。そのため、一部の実施形態では、提供されるバイオマーカー（例えば、タンパク質および／または例えば、mRNAなどのRNA）の変異体特異的検出が含まれ得る。

【0219】

本明細書で述べられるように、一部の実施形態では、バイオマーカーは、1つもしくは複数のポリペプチドもしくはタンパク質（例えば、プロ型、トランケート形態、改変形態、例えば、グリコシル化、リン酸化、ホスファチジル化、脂質化形態など）の特定の形態であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、そのような形態の検出は、その形態で存在する多数（および、一部の実施形態では、実質的にすべて）のポリペプチド（例えば、特定の改変、例えば、特定のグリコシル化、例えば、シアリル-Tn (sTn) グリコシル化、例えば、GalNAc α -O-Ser / Thr に連結されたシアル酸 α -2, 6 を含有するトランケートされたO-グリカンなどを含有する）を検出する。一部の実施形態では、本明細書に記載される表面バイオマーカーは、表面バイオマーカーのグリコシル化形態を含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、表面バイオマーカーADGRF1、B3GNT3、B3GNT5、HAS3、LARGE2、MAL2、NRCAM、PODXL2、PRSS21、およびSCL7A11は、グリコシル化を含んでいてもよい。一部の実施形態では、本明細書に記載される表面バイオマーカーは、表面バイオマーカーの脂質化形態を含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、表面バイオマーカーPRSS21およびUCHL1は、脂質化を含んでいてもよい。

【0220】

したがって、一部の実施形態では、表面バイオマーカーは、グリコシル化部分（例えば、sTn 抗原部分、Tn 抗原部分、またはT 抗原部分）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。トムセン-ヌーベル (Tn) 抗原は、広範囲の腫瘍と関連すると考えられているO連結グリカンである。Tnは、主要なO連結グリコシル化経路の最初のステップとして、Ser または Thr に付加された単一のアルファ連結 GalNAc である。当業者は、ある特定の実施形態では、T 抗原が、典型的には、構造 Gal β 1-3 GalNAc- を有するO連結グリカンを指すことを理解するであろう。

【0221】

一部の実施形態では、表面バイオマーカーは、腫瘍関連翻訳後改変であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのような翻訳後改変は、最初の GalNAc（例えば、Tn）で異常にトランケートされたグリカンを有するムチンなどの腫瘍特異的グリコシル化パターン、もしくはその組合せであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0222】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、表4Aおよび／または表4Bに表される組合せの標的を含み、ここで、標的は、捕捉プローブおよび／または検出プローブにおいて使用されてもよい。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャー

ーは、表 4 A および／または表 4 B に表される捕捉プローブの標的、ならびに検出プローブ（例えば、検出プローブ 1 および／または検出プローブ 2）の少なくとも 1 つまたは複数（例えば、少なくとも 2 つまたはそれよりも多くを含む）の標的を含む。

【0223】

一部の実施形態では、肺がん検出のために特に有用であり得る（例えば、より高い感度、特異度および／または P P V を有する）表 4 A および／または表 4 B に表されるある特定のバイオマーカーの組合せは、進行ステージ（例えば、末期、例えば、ステージ III および／または IV）肺がん試料プール、および参照として健康な対照試料プールを使用するスクリーニングの最初のラウンドを受けることができる。一部の実施形態では、選択組合せは、初期肺がん試料プール（例えば、ステージ I および／または II、必要に応じて、適切に分化）、良性肺腫瘍血漿試料プール（例えば、本明細書に記載される通り）、非肺がん試料プール（例えば、本明細書に記載される通り）、および／またはその任意の組合せを使用して、さらに検査することができる。一部の実施形態では、バイオマーカーの組合せの性能は、健康な試料プールと肺がん試料プールとの間のアッセイシグナルの差（例えば、C t 基準）を計算することによって決定することができる。

10

【0224】

一部の実施形態では、肺がん検出のためのある特定のバイオマーカーの組合せは、アッセイ間の変動よりも大きいデルタ C t で選択することができる。例えば、一部の実施形態では、2.0（4 倍の差に相当する）または 1.0（2 倍の差に相当する）よりも大きいデルタ C t を有するバイオマーカーの組合せは、特に有効な診断有用性を提供する（例えば、アッセイ間の変動よりも大きいシグナルを提供する）と考えられる。例えば、本明細書に記載されるある特定の組合せの例示的な分析を提供する実施例 10 を参照されたい。

20

【0225】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、表 4 A および／もしくは表 4 B に記載される組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。ある特定の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、対照試料（例えば、健康な喫煙者試料と比較して、および／または健康な非喫煙者試料と比較して；例えば、表 4 A および／または表 4 B を参照されたい）から末期肺がん試料を区別する、マーカーのセットを含む。ある特定の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、対照試料（例えば、健康な喫煙者試料と比較して、および／または健康な非喫煙者試料と比較して；例えば、表 4 A および／または表 4 B を参照されたい）から初期肺がん試料を区別するマーカーのセットを含む。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの検出を対象にするアッセイは、表 4 A および／または表 4 B に記載される捕捉および検出プローブの組合せを含むことができる。

30

【0226】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がんを有していない対象（例えば、健康な対象、または肺がんではないもしくは肺の状態と関連しない状態を有する対象）から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、L U A D および／または L U S C）を患っている対象を区別する、実施例 10、表 4 A および／もしくは表 4 B に記載される組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がんを有していない対象（例えば、健康な対象、または肺がんではないもしくは肺の状態と関連しない状態を有する対象）から末期肺がん（例えば、末期非小細胞肺がん、例えば、L U A D および／または L U S C）を患っている対象を区別する、実施例 10、表 4 A および／もしくは表 4 B に記載される組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、末期肺がん（例えば、末期非小細胞肺がん、例えば、L U A D および／または L U S C）を患っている対象から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、L U A D および／または L U S C）を患っている対象を区別する、実施例 10、表 4 A および／もしくは表 4 B に記載される組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。

40

50

【0227】

一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも8つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも7つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも6つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも5つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも4つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも3つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも2つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーは、実施例10、表4Aおよび／もしくは表4Bに記載されるようにして試験された8つの条件の中から少なくとも1つにおいて、健康な試料から肺がんを区別する、組合せの標的であり得るか、またはそれを含み得る。

【0228】

ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびPD-L1バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびCEACAM6バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびEGFRバイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびIGF1Rバイオマーカー；もしくはALCAMバイオマーカーおよびEPCAMバイオマーカー；もしくはCEACAM6バイオマーカーおよびMUC1バイオマーカー；もしくはEGFRバイオマーカーおよびT抗原バイオマーカー；もしくはEPCAMバイオマーカーおよびTバイオマーカー；もしくはFOLR1バイオマーカーおよびT抗原バイオマーカー；もしくはTn抗原バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびFOLR1バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびsTn抗原バイオマーカー；もしくはALCAMバイオマーカーおよびPD-L1バイオマーカー；もしくはEPCAMバイオマーカーおよびMUC1バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびCD55バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびMUC1バイオマーカー；もしくはFOLR1バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカー；もしくはMETバイオマーカーおよびMUC1バイオマーカー；もしくはMETバイオマーカーおよびsTn抗原バイオマーカー；もしくはMUC1バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカー；もしくはPD-L1バイオマーカーおよびMUC1バイオマーカー；もしくはPD-L1バイオマーカーおよびTn抗原バイオマーカー；もしくはSLC34A2バイオマーカーおよびMETバイオマーカー；もしくはSLC34A2バイオマーカーおよびT抗原バイオマーカー；もしくはTNFRSF10Bバイオマ

カーおよびCEACAM5バイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびMSLNバイオマーカー；もしくはTNFRSF10BバイオマーカーおよびTnバイオマーカー；またはその組合せを含む。

【0229】

ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびPD-L1バイオマーカーを含む。ある特定の
実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびCEACAM6バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、
肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびEGFRバイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための
標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびIGF1Rバイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオ
マーカーシグネチャーは、ALCAMバイオマーカーおよびEPCAMバイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、
CEACAM6バイオマーカーおよびMUC1バイオマーカーを含む。ある特定の実施
形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、EGFRバイオマーカーおよびT抗原バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための
標的バイオマーカーシグネチャーは、EPCAMバイオマーカーおよびT抗原バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネ
チャーは、FOLR1バイオマーカーおよびT抗原バイオマーカーを含む。ある特定の実施
形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、Tn抗原バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出
のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびFOLR1バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バ
イオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびsTn抗原バ
イオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシ
グネチャーは、ALCAMバイオマーカーおよびPD-L1バイオマーカーを含む。ある
特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、EPCA
MバイオマーカーおよびMUC1バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺が
ん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10Bバイオマーカー
およびCD55バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標
的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10BバイオマーカーおよびMUC1バ
イオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカー
シグネチャーは、FOLR1バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカーを含む
。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、M
ETバイオマーカーおよびMUC1バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺
がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、METバイオマーカーおよびsT
n抗原バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオ
マーカーシグネチャーは、MUC1バイオマーカーおよびTACSTD2バイオマーカー
を含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャー
は、PD-L1バイオマーカーおよびMUC1バイオマーカーを含む。ある特定の実施形
態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、PD-L1バイオマ
ーカーおよびTn抗原バイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のため
の標的バイオマーカーシグネチャーは、SLC34A2バイオマーカーおよびMETバイ
オマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシ
グネチャーは、SLC34A2バイオマーカーおよびT抗原バイオマーカーを含む。ある
特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFR
SF10BバイオマーカーおよびCEACAM5バイオマーカーを含む。ある特定の実施
形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10B
バイオマーカーおよびMSLNバイオマーカーを含む。ある特定の実施形態では、肺がん

10

20

30

40

50

検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、TNFRSF10B バイオマーカーおよびTn 抗原バイオマーカーを含む。

【0230】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも2つの標的バイオマーカーの組合せを含み、この組合せは、以下：CYP2S1ポリペプチドおよびHS6ST2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびCYP2S1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびCYP4F11ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびUGT1A6ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびTMPRSS4ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびILDR1ポリペプチド；もしくはDSG3ポリペプチドおよびUPK1Bポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびCYP2S1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびADAM23ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびLAMC2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびHAS3ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチドおよびLAMC2ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびHS6ST2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびULBP2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびHS6ST2ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびLAMC2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびUPK1Bポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびCYP4F11ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびLAMC2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびCYP4F11ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチドおよびPIGTポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびSHISA2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびDSG2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびLAMB3ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびVTN1ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびHAS3ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびSLC7A11ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびDSG3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびFERMT1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびHS6ST2ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチドおよびULBP2ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびRAP2Bポリペプチド；もしくはRACGAP1ポリペプチドおよびTFRCポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびULBP2ポリペプチド；もしくはKLRG2ポリペプチドおよびUPK1Bポリペプチド；もしくはCLCA2ポリペプチドおよびCYP2S1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびPANX2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびHAS3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびSLC7A11ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびDSG3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびCYP4F3ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびKLRG2ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチドおよびSLC7A11ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびRAP2Bポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびPIGTポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびSDC1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびECE2ポリペプチド；もしくはDSG2ポリペプチドおよびMARVELD2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびSHISA2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチドおよびUGT1A6ポリペプチド；もしくはABCC1ポリペプチドおよびCYP4F11ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびPIGTポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびPIGTポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびILDR1ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチドおよびNECTIN1ポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびRAB6Bポリペプチド；もしくはCYP4F11ポリペプチドおよびKLRG2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチドおよびFXYD3ポリペ

10

20

30

40

50

チド；もしくはC L C A 2 ポリペプチドおよびC Y P 4 F 1 1 ポリペプチド；もしくはA
 B C A 1 3 ポリペプチドおよびD S G 3 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペ
 チドおよびX X Y L T 1 ポリペプチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチドおよびP R S
 S 2 1 ポリペプチド；もしくはF G F B P 1 ポリペプチドおよびM A R V E L D 3 ポリペ
 プチド；もしくはC Y P 2 S 1 ポリペプチドおよびH A S 3 ポリペプチド；もしくはA D
 A M 2 3 ポリペプチドおよびC L C A 2 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペ
 チドおよびN E C T I N 1 ポリペプチド；もしくはC L C A 2 ポリペプチドおよびH S 6
 S T 2 ポリペプチド；もしくはH S 6 S T 2 ポリペプチドおよびP R S S 2 1 ポリペプチ
 ド；もしくはC Y P 2 S 1 ポリペプチドおよびD S G 2 ポリペプチド；もしくはC D 9 ポ
 リペプチドおよびC Y P 4 F 1 1 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドお
 よびF E R M T 1 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびT F R C ポ
 リペプチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチドおよびE P C A M ポリペプチド；もし
 くはD S G 2 ポリペプチドおよびF B X O 4 5 ポリペプチド；もしくはC Y P 2 S 1 ポリペ
 プチドおよびP A N X 2 ポリペプチド；もしくはC Y P 2 S 1 ポリペプチドおよびP R S
 S 2 1 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびS D K 1 ポリペプチド
 ；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびU L B P 2 ポリペプチド；もしくはA B C
 A 1 3 ポリペプチドおよびP I G T ポリペプチド；もしくはH S 6 S T 2 ポリペプチドお
 よびR A P 2 B ポリペプチド；もしくはC Y P 2 S 1 ポリペプチドおよびE C E 2 ポリペ
 プチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチドおよびN E C T I N 1 ポリペプチド；もし
 くはC Y P 2 S 1 ポリペプチドおよびS L C 7 A 1 1 ポリペプチド；もしくはE C E 2 ポリ
 ペプチドおよびH S 6 S T 2 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドお
 よびS D K 2 ポリペプチド；もしくはP A C C 1 ポリペプチドおよびT F R C ポリペプチド；
 もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびK P N A 2 ポリペプチド；もしくはA D A M
 2 3 ポリペプチドおよびS L C 1 2 A 8 ポリペプチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチ
 ドおよびA P O O ポリペプチド；もしくはA P O O ポリペプチドおよびM A R V E L D 2
 ポリペプチド；もしくはC D 9 ポリペプチドおよびP A C C 1 ポリペプチド；もしくはE
 C E 2 ポリペプチドおよびU P K 1 B ポリペプチド；もしくはI L D R 1 ポリペプチドお
 よびM A R V E L D 2 ポリペプチド；もしくはI T G A 2 ポリペプチドおよびT M E M 1
 5 8 ポリペプチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチドおよびU C H L 1 ポリペプチド；
 もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびP A N X 2 ポリペプチド；もしくはC Y P 4
 F 1 1 ポリペプチドおよびI L D R 1 ポリペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチ
 ドおよびN R C A M ポリペプチド；もしくはA D A M 2 3 ポリペプチドおよびC D H 1 ポ
 リペプチド；もしくはC Y P 4 F 1 1 ポリペプチドおよびE C E 2 ポリペプチド；または
 その組合せから選択され得る。一部の実施形態では、前述の組合せにおける標的バイオマ
 ーカーは、本明細書に記載されるアッセイの捕捉プローブの標的および／または検出プロ
 ーブの標的として使用されてもよい。

【0231】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、C Y P 2 S 1 ポリペプチド
 およびH S 6 S T 2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バ
 イオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A D A
 M 2 3 ポリペプチドおよびC Y P 2 S 1 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少な
 くとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグ
 ネチャーは、A D A M 2 3 ポリペプチドおよびT M P R S S 4 ポリペプチドであるか、ま
 たはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標
 的バイオマーカーシグネチャーは、A D A M 2 3 ポリペプチドおよびI L D R 1 ポリペプ
 チドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の
 実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A B C A 1 3 ポリペプチドおよびC
 Y P 2 S 1 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマ
 ーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A B C A 1 3 ポ
 リペプチドおよびA D A M 2 3 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2

50

あるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、K P N A 2ポリペプチドおよびU L B P 2ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T F R CポリペプチドおよびU L B P 2ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、D S G 3ポリペプチドおよびV T C N 1ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、U L B P 2ポリペプチドおよびU P K 1 Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、D S G 3ポリペプチドおよびN E C T I N 1ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、D S G 3ポリペプチドおよびP T P R Z 1ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、K P N A 2ポリペプチドおよびU P K 1 Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、R A C G A P 1ポリペプチドおよびU L B P 2ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける標的バイオマーカーは、本明細書に記載されるアッセイの捕捉プローブの標的および／または検出プローブの標的として使用されてもよい。

10

20

【0232】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 BおよびP D - L 1バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 BおよびC E A C A M 6バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 BおよびE G F Rバイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 BおよびI G F 1 Rバイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A L C A MおよびE P C A Mバイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、C E A C A M 6およびM U C 1バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、E G F RおよびT抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、E P C A MおよびTバイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、F O L R 1およびTバイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T n抗原およびT A C S T D 2バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 BおよびF O L R 1バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 Bおよびs T n抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A L C A MおよびP D - L 1バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、E P C A MおよびM U

30

40

50

50

[illegible]

50

実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、F O L R 1 および s T n 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、F O L R 1 および T n 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、M E T および T 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、M S L N および s T n 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、M U C 1 および T 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、M U C 1 および T n 抗原バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、S L C 3 4 A 2 および E G F R バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 B および C D H 1 バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、T N F R S F 1 0 B および S L C 3 4 A 2 バイオマーカーであるか、またはそれを含む、少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける標的バイオマーカーは、本明細書に記載されるアッセイの捕捉プローブの標的および／または検出プローブの標的として使用されてもよい。

10

20

【0233】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも3つの標的バイオマーカーの組合せを含み、この組合せは、以下：A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および P I G T ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、I L D R 1 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および D S G 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および K P N A 2 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、A D A M 2 3 ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および N E C T I N 1 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、U G T 1 A 6 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および V T C N 1 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、A D A M 2 3 ポリペプチド、および C Y P 2 S 1 ポリペプチド；もしくは C L C A 2 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および H S 6 S T 2 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および N E C T I N 1 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および F E R M T 1 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、D S G 2 ポリペプチド、および H A S 3 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、A D A M 2 3 ポリペプチド、および D S G 3 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、R A P 2 B ポリペプチド、および T M P R S S 4 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、P I G T ポリペプチド、および T M P R S S 4 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、T M P R S S 4 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H A S 3 ポリペプチド、および P I G T ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および X X Y L T 1 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、I L D R 1 ポリペ

30

40

50

ブチド、およびULBP2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、およびUGT1A6ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CLCA2ポリペプチド、およびCYP2S1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、およびFERMT1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびSDC1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、およびHAS3ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびHAS3ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、DSG2ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、HS6ST2ポリペプチド、およびSDK2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、HS6ST2ポリペプチド、およびKLRG2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびFERMT1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、およびCDH3ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびECE2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CDH3ポリペプチド、およびEPCAMポリペプチド；もしくはCELSR1ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CDH3ポリペプチド、およびILDR1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびILDR1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびNECTIN1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、およびTMPRSS4ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびDSG3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、LAMP3ポリペプチド、およびUGT1A6ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、HS6ST2ポリペプチド、およびRAP2Bポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、ECE2ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびHAS3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、ILDR1ポリペプチド、およびLAMB3ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、ILDR1ポリペプチド、およびRAP2Bポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、FBXO45ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、およびPIGTポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、ECE2ポリペプチド、およびILDR1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、KLRG2ポリペプチド、およびTMPRSS4ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、FERMT1ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、DSG2ポリペプチド、およびPIGTポリペプチド；もしくはCDH3ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびILDR1ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、ILDR1ポリペプチド、およびPIGTポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびECE2ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、HS6ST2ポリペプチド、およびPRSS21ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、およびLSRポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2S1ポリペプチド、およびHS6ST2ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、ECE2ポリペプチド、およびTMPRSS4ポリペプチド；もしくはHS6ST2ポリペプチド、LAMC2ポリペプチド、およびRAP2Bポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、HAS3ポリペプチド、およびILDR1ポリペプチド；もしくはABCA13ポリペプチド、ADAM23ポリペプチド、およびNECTIN1ポリペプチド；もしくはCYP2S1ポリペプチド、DSG3ポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、SHISA2ポリペプチド、およびTMPRSS4ポリペプチド；もしくはADAM23ポリペプチド、CYP2

10

20

30

40

50

S 1 ポリペプチド、および I T G A 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、K L R G 2 ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、I L D R 1 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、S H I S A 2 ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは C L C A 2 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および D S G 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および L A M B 3 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、N R C A M ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、F E R M T 1 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、P I G T ポリペプチド、および V T C N 1 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、P I G T ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、E C E 2 ポリペプチド、および U G T 1 A 6 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、A D A M 2 3 ポリペプチド、および S D C 1 ポリペプチド；もしくは A B C A 1 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および S D C 1 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、T M P R S S 4 ポリペプチド、および X X Y L T 1 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L A M B 3 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、L A M B 3 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、U G T 1 A 6 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、K R T C A P 3 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチド；もしくは C L C A 2 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および P I G T ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L S R ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および R A C G A P 1 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L A P T M 4 B ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、L A M C 2 ポリペプチド、および P R S S 2 1 ポリペプチド；もしくは C L C A 2 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、L A M B 3 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、I L D R 1 ポリペプチド、および X X Y L T 1 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L A R G E 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、L A M C 2 ポリペプチド、および U L B P 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、T M E M 1 3 2 A ポリペプチド、および T M P R S S 4 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、L A M C 2 ポリペプチド、および S H I S A 2 ポリペプチド；もしくは A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および F A T 2 ポリペプチド；もしくは C Y P 2 S 1 ポリペプチド、C Y P 4 F 1 1 ポリペプチド、および K L R G 2 ポリペプチド；またはその組合せから選択され得る。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

【0234】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A D A M 2 3 ポリペプチド、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、C Y P 2 S 1 ポリペプチド、H S 6 S T 2 ポリペプチド、および P I G T ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、A D A M 2 3 ポリペプチド、I L D R 1 ポリペプチド、および L A M C 2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマ

10

20

30

40

50

50

、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、DSG3ポリペプチド、RAP2Bポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、DSG3ポリペプチド、LMNB2ポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、ABCC1ポリペプチド、DSG3ポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、DSG3ポリペプチド、TFRCポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーは、CD9ポリペプチド、DSG3ポリペプチド、およびUPK1Bポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

10

20

【0235】

ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも3つの標的バイオマーカーの組合せを含み、この組合せは、以下：CEACAM6ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびsTn抗原ポリペプチド；もしくはTNFRSF10Bポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチド；もしくはSLC34A2ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチド；もしくはCEACAM6ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびMSLNポリペプチド；もしくはFOLR1ポリペプチド、T抗原ポリペプチド、およびEGFRポリペプチド；もしくはDSG2ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチド；またはその組合せから選択され得る。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

30

40

【0236】

ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、CEACAM6ポリペプチド、MUC1およびsTn抗原ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的ポリペプチドシグネチャーは、TNFRSF10Bポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的ポリペプチドシグネチャーは、SLC34A2ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的ポリペプチドシグネチャーは、CEACAM6ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびMSLNポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的ポリペプチドシグネチャーは、FOLR1ポリペプチド、T抗原ポリペプチド、およびEGFRポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、肺がん検出のための標的ポリペプチドシグネチャーは、DSG2ポリペプチド、MUC1ポリペプチド、およびCEACAM6ポリペプチドを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

【0237】

一部の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、以下の

50

バイオマーカーの組合せ：(i) CEACAM5、CEACAM6、および／またはMUC1と組み合わせたsTn抗原；ならびに(ii) CEACAM5、シアリルLewis X、および／またはLewis Yと組み合わせたMUC1のうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

【0238】

一部の実施形態では、肺がん検出のための標的バイオマーカーシグネチャーは、以下のバイオマーカーの組合せ：(i) (sTn抗原、CEACAM5)；(ii) (sTn抗原、CEACAM5、MUC1)；(iii) (sTn抗原、MUC1)；(iv) (sTn抗原、CEACAM6)；(v) (sTn抗原、CEACAM5、CEACAM6)；(vi) (sTn抗原、MUC1、CEACAM6)；(vii) (MUC1、CEACAM5)；(viii) (MUC1、CEACAM5、シアリルLewis X抗原)；および(ix) (MUC1、CEACAM5、Lewis Y抗原)のうちの少なくとも1つを含む。一部の実施形態では、前述の組合せにおける少なくとも1つの標的バイオマーカーは、捕捉プローブの標的として使用されてもよく、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、検出プローブの標的として使用されてもよい。

【0239】

III. 肺がんのための提供されるマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャーを検出する例示的な方法

一般に、本開示は、それを必要とする対象からのナノ粒子（例えば、細胞外小胞を含む）を含む生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）において標的バイオマーカーシグネチャーが分析および／または査定されることによる技術を提供し、一部の実施形態では、診断または治療の判断は、そのような分析および／または査定に基づいて行われる。

【0240】

一部の実施形態では、標的バイオマーカーシグネチャーを検出する方法は、タンパク質、グリカン、またはプロテオグリカン（例えば、限定されるものではないが、炭水化物またはグリカン部分を有するタンパク質を含む）として標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるマーカーを検出するための方法を含む。1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する例示的なタンパク質に基づく方法としては、限定されるものではないが、近接ライゲーションアッセイ、質量分析法（MS）および免疫沈降などのイムノアッセイ、ウエスタンブロット、ELISA、免疫組織化学、免疫細胞化学、フローサイトメトリー、ならびにイムノPCRが挙げられる。一部の実施形態では、イムノアッセイは、化学発光イムノアッセイであり得る。一部の実施形態では、イムノアッセイは、ハイスループットおよび／または自動イムノアッセイプラットフォームであり得る。

【0241】

一部の実施形態では、試料においてタンパク質、グリカン、またはプロテオグリカン（例えば、限定されるものではないが、炭水化物またはグリカン部分を有するタンパク質を含む）として1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する方法は、試料を、目的の提供されるマーカーを対象にする1つまたは複数の抗体剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、そのような方法は、試料を、1つまたは複数の検出標識と接触させるステップも含む。一部の実施形態では、抗体剤は、1つまたは複数の検出標識で標識される。

【0242】

一部の実施形態では、目的のバイオマーカーと目的のバイオマーカーのための抗体剤との間の結合の検出は、1つまたは複数の検出剤についての吸光度値または発光値を決定するステップを含む。例えば、吸光度値または発光値は、ナノ粒子によって発現される目的のバイオマーカーの量および／または濃度を示す（例えば、より高い吸光度は、ナノ粒子によって発現される目的のバイオマーカーのより高いレベルを示す）。一部の実施形態で

は、検出剤についての吸光度値または発光値は、閾値を上回る。一部の実施形態では、検出剤についての吸光度値または発光値は、閾値よりも、少なくとも1.3、少なくとも1.4、少なくとも1.5、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2.0、少なくとも2.5、少なくとも3.0、少なくとも3.5倍、またはそれよりも高い。一部の実施形態では、閾値は、対照または参照群の集団（例えば、非がん対象）全体で決定される。

【0243】

一部の実施形態では、1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する方法は、核酸として1つまたは複数の提供されるマーカーを検出するための方法を含む。1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する例示的な核酸に基づく方法としては、限定されるものではないが、核酸増幅方法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）、転写-媒介増幅（TMA）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、ストランド置換増幅（SDA）、および核酸配列に基づく増幅（NASBA）を行うステップを含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する核酸に基づく方法は、1つまたは複数の核酸プローブと目的のバイオマーカーをコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列との間のハイブリダイゼーションを検出するステップを含む。一部の実施形態では、核酸プローブは、目的のバイオマーカーをコードする1つまたは複数のヌクレオチド配列のうちの1つの少なくとも一部分に対してそれぞれ相補的である。一部の実施形態では、目的のバイオマーカーをコードするヌクレオチド配列は、DNA（例えば、cDNA）を含む。一部の実施形態では、目的のバイオマーカーをコードするヌクレオチドとしては、RNA（例えば、mRNA、snRNA、miRNA、siRNA、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、またはpiwi相互作用RNA）が挙げられる。

【0244】

一部の実施形態では、1つまたは複数の提供されるマーカーを検出する方法は、近接ライゲーション-免疫定量的ポリメラーゼ連鎖反応（pliq-PCR）を含む。pliq-PCRは、EVをプロファイリングするための他の技術を上回るある特定の利点を有し得る。例えば、pliq-PCRは、他の標準的なイムノアッセイ、例えば、ELISAよりも3桁高い感度を有し得る（Darmanis et al., 2010；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）。一部の実施形態では、pliq-PCR反応は、痕跡レベルの腫瘍由来EV、例えば、1mLあたり1000までのEVを検出することを可能にする、極めて低いLODを有するように設計することができる。

【0245】

一部の実施形態では、1つまたは複数の提供されるマーカーを検出するための方法は、例えば、それぞれ、約 10^3 および約 10^4 EVのLODが報告されている（Shao et al., 2018；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）、Nanoplasmonic Exosome (nPLEX) センサー（Im et al., 2014；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）およびIntegrated Magnetic-Electrochemical Exosome (iMEX) センサー（Jeong et al., 2016；これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる）を含む、EVを検出するための他の技術を含んでいてもよい。

【0246】

一部の実施形態では、ナノ粒子における1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出するための方法は、バルクEV試料分析に基づくことができる。

【0247】

一部の実施形態では、ナノ粒子における1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出するための方法は、個々のEVをプロファイリングすること（例えば、単一EVプロファイリングアッセイ）に基づくことができ、これは、下記の「個々のナノ粒子をプロフ

アイリングするための例示的な方法」という表題のセクションでさらに論じられる。

【0248】

一部の実施形態では、試料におけるナノ粒子は、本開示に従って1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出する前に、固体基材上で捕捉または固定化されてもよい。一部の実施形態では、ナノ粒子は、例えば、吸着を含む非特異的相互作用によって、固体基材表面上で捕捉されてもよい。一部の実施形態では、ナノ粒子は、固体基材表面上に選択的に捕捉されてもよい。例えば、一部の実施形態では、固体基材表面は、ナノ粒子に特異的に結合する薬剤（例えば、そのようなナノ粒子、例えば、肺がんに関連するナノ粒子を特異的に標的にする抗体剤）でコーティングされていてもよい。一部の実施形態では、固体基材表面は、親和性結合対のメンバーでコーティングされていてもよく、捕捉される目的の実体（例えば、細胞外小胞を含む、例えば、ナノ粒子）は、親和性結合対の相補的メンバーにコンジュゲートされていてもよい。一部の実施形態では、例示的な親和性結合対としては、例えば、限定されるものではないが、ビオチンおよびアビジン様分子、例えば、ストレプトアビジンが挙げられる。当業者に理解されるであろうように、他の適切な親和性結合対を、固体基材表面への目的の実体の捕捉を容易にするために使用することもできる。一部の実施形態では、目的の実体は、例えば、その両方が、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれ、その両方が、未希釈ヒト血液または血漿試料から細胞外小胞を単離するための交流電マイクロアレイチップデバイスの使用を記載している、Ibsen et al. ACS Nano., 11: 6641-6651 (2017)およびLewis et al. ACS Nano., 12: 3311-3320 (2018)に記載されるように、電流の適用によって固体基材表面上で捕捉されてもよい。

【0249】

固体基材は、ナノ粒子を捕捉するために好適であり、下流での取り扱い、処理、および／または検出を妨げない形態で提供されてもよい。例えば、一部の実施形態では、固体基材は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体基材は、表面であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、そのような表面は、アッセイチャンバーの捕捉表面（例えば、管、ウェル、マイクロウェル、プレート、フィルター、膜、マトリックスなどを含む）であってもよい。したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載される方法は、試料において提供されるバイオマーカーを検出する前に、ナノ粒子を固体基材上に捕捉するステップまたはそれを固定化するステップを含む。

【0250】

一部の実施形態では、試料は、ナノ粒子を固体基材表面上に捕捉する前に、例えば、望ましくない実体、例えば、細胞デブリまたは細胞を除去するために処理されてもよい。例えば、一部の実施形態では、そのような試料は、例えば、細胞デブリ、細胞、および／または他の粒子を除去するために、遠心分離に供されてもよい。加えて、または代替的に、一部の実施形態では、そのような試料は、サイズ排除に基づく精製または濾過に供されてもよい。さまざまなサイズ排除に基づく精製または濾過は、当技術分野において公知であり、当業者は、一部の事例では、試料が、特異的な分子量または粒子径カットオフに基づくスピンカラム精製に供されてもよいことを認識するであろう。当業者は、精製目的のための適切な分子量または粒子径カットオフを、例えば、ナノ粒子のサイズに基づいて選択することができることも認識するであろう。例えば、一部の実施形態では、サイズ排除分離方法は、ある特定のサイズ（例えば、30 nm超および1000 nm以下、または70 nm超および200 nm以下）の細胞外小胞を含むナノ粒子の画分を単離するために、ナノ粒子を含む試料に適用されてもよい。典型的には、ナノ粒子は、30 nm～数マイクロメートルの直径の範囲であってもよい。例えば、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれるChuo et al., "Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods" Journal of Biomedical Sciences 25: 91 (2018)を参照されたく、これは、異なる細胞外小胞（EV）サブタイプについてのサイズの情報：ミグラソーム（0.5～3 μm）、微小小胞体（0.1～1 μm）

、オンコソーム（ $1 \sim 10 \mu\text{m}$ ）、エキソマー（ $< 50 \text{nm}$ ）、小エキソソーム（ $60 \sim 80 \text{nm}$ ）、および大エキソソーム（ $90 \sim 120 \text{nm}$ ）を提供する。一部の実施形態では、約 $30 \text{nm} \sim 1000 \text{nm}$ のサイズ範囲を有するナノ粒子は、例えば、一部の実施形態では、検出アッセイのために、1つまたは複数のサイズ排除分離方法によって単離されてもよい。一部の実施形態では、特異的EVサブタイプは、例えば、一部の実施形態では、検出アッセイのために、1つまたは複数のサイズ排除分離方法によって単離されてもよい。

【0251】

一部の実施形態では、試料におけるナノ粒子は、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出する前に、処理されてもよい。異なる試料の処理および／または調製は、例えば、検出されるナノ粒子において標的（例えば、標的バイオマーカー）を安定化するために、および／または標的（例えば、小胞内タンパク質および／またはRNA、例えば、mRNA、snRNA、miRNA、siRNA、オーファンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、もしくはpiwi相互作用RNA）の検出アッセイ（例えば、本明細書に記載される通り）への曝露を容易にするために、および／または非特異的結合を低減するために、行うことができる。そのような試料の処理および／または調製の例は、当技術分野において公知であり、限定されるものではないが、分子標的の架橋（例えば、固定）、生物学的実体（例えば、細胞または細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子）の透過処理、および／または非特異的結合部位の遮断が挙げられる。

【0252】

一態様では、本開示は、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーが、一部の実施形態では、ナノ粒子を含む生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）であり得るそれを必要とする対象からの生体試料中に存在するか、または存在しないかどうかを検出するための方法を提供する。一部の実施形態では、そのような方法は、（a）対象からの生体試料、例えば、血液由来試料（例えば、血漿試料）において、肺がんの標的バイオマーカーシグネチャーを発現する目的の生物学的実体（例えば、ナノ粒子を含む）を検出するステップ；および（b）生体試料（例えば、血液由来試料）における目的の標的バイオマーカーシグネチャー発現生物学的実体（例えば、ナノ粒子）のレベルを示す試料情報を、参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップを含む。一部の実施形態では、参照閾値レベルは、参照対象、例えば、非がん対象の集団からの比較可能な試料におけるそのような標的バイオマーカーシグネチャーを発現する目的の生物学的実体（例えば、ナノ粒子）のレベルに対応する。一部の実施形態では、例示的な非がん対象としては、健康な対象（例えば、55歳より下または55歳より上などの、例えば、既定の年齢範囲の健康な対象）、非肺関連の健康上の疾患、障害、または状態を有する対象（例えば、卵巣がん、結腸直腸がんなどのような非肺がんを有する対象、または慢性閉塞性肺疾患もしくは慢性肺感染症の症状を有する対象を含む）、良性肺腫瘍（例えば、胸部X線または低線量CTスキャンなどのイメージングにより肺において観察された良性腫瘍）を有する対象、およびその組合せが挙げられる。

【0253】

一部の実施形態では、試料は、本明細書に記載されるアッセイにおける利用の前に、ある特定の特徵について事前スクリーニングされる。一部の実施形態では、ある特定の事前スクリーニング基準を満たす試料は、事前スクリーニング基準を満たしていない試料よりも、診断適用のためにより好適である。例えば、一部の実施形態では、試料は、例えば、正常、溶血（赤色）、黄疸（黄色）、および／または脂肪（濁った）の試料である、公知の標準を使用して、外観について視覚的に検査される。一部の実施形態では、次いで、試料は、公知の標準的なスケール（例えば、1、2、3、4、5）で格付けすることができ、結果が記録される。一部の実施形態では、試料は、溶血（例えば、ヘム）について視覚的に検査され、1～5のスケールで格付けされ、ここで、外観検査は、公知の濃度と相関し、例えば、1は、およそ 0mg/dL を示し、2は、およそ 50mg/dL を示し、3

10

20

30

40

50

は、およそ150mg/dLを示し、4は、およそ250mg/dLを示し、5は、およそ525mg/dLを示す。一部の実施形態では、試料は、黄疸レベル（例えば、ビリルビン）が視覚的に検査され、1～5のスケールで格付けされ、ここで、外観検査は、公知の濃度と相関し、例えば、1は、およそ0mg/dLを示し、2は、およそ1.7mg/dLを示し、3は、およそ6.6mg/dLを示し、4は、およそ16mg/dLを示し、5は、およそ30mg/dLを示す。一部の実施形態では、試料は、濁度（例えば、脂質）について視覚的に検査され、1～5のスケールで格付けされ、ここで、外観検査は、公知の濃度と相関し、例えば、1は、およそ0mg/dLを示し、2は、およそ125mg/dLを示し、3は、およそ250mg/dLを示し、4は、およそ500mg/dLを示し、5は、およそ1000mg/dLを示す。

10

【0254】

一部の実施形態では、1つまたは複数の測定基準におけるある特定のレベル未満、例えば、4のスコアに等しいまたはそれ未満にスコア化される試料は、本明細書に記載されるアッセイにおいて利用されてもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の測定基準におけるある特定のレベル未満、例えば、3のスコアに等しいまたはそれ未満にスコア化される試料は、本明細書に記載されるアッセイにおいて利用されてもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の測定基準におけるある特定のレベル未満、例えば、2のスコアに等しいまたはそれ未満にスコア化される試料は、本明細書に記載されるアッセイにおいて利用されてもよい。一部の実施形態では、3つすべての測定基準（例えば、溶血、黄疸、および脂肪血症）におけるある特定のレベル未満、例えば、2のスコアに等しいまたはそれ未満にスコア化される試料は、本明細書に記載されるアッセイにおいて利用されてもよい。一部の実施形態では、溶血、ビリルビン、および／または脂肪血などの事前スクリーニング基準における低い外観検査スコア（例えば、2のスコアに等しいまたはそれ未満）は、本明細書に記載されるアッセイにおいて生じる診断特性（例えば、Ct値）に対する明らかな効果を有していなくてもよい（例えば、それと相関しなくてもよい）。

20

【0255】

一部の実施形態では、試料が、参照閾値レベル（例えば、本明細書に記載されるもの）と比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルの上昇を示す場合に、試料は、標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、本明細書に記載されるもの）の存在について陽性であると決定される。一部の実施形態では、そのレベルが、参照閾値レベルと比較して、例えば、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%またはそれよりも高いを含んで、少なくとも30%またはそれよりも高い場合に、試料は、標的バイオマーカーシグネチャーの存在について陽性であると決定される（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルによって反映される通り）。一部の実施形態では、そのレベルが、参照閾値レベルと比較して、例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも750倍、少なくとも1000倍、少なくとも2500倍、少なくとも5000倍、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも2倍またはそれよりも高い場合に、試料は、標的バイオマーカーシグネチャーの存在について陽性であると決定される（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルによって反映される通り）。

30

40

【0256】

一部の実施形態では、2項分類システムを使用して、試料が標的バイオマーカーシグネチャーの存在について陽性であるかどうかを決定されてもよい。例えば、一部の実施形態では、試料は、そのレベルが参照閾値レベル、例えば、カットオフ値であるか、またはそれを上回る場合に、標的バイオマーカーシグネチャーの存在について陽性であると決定される（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルによって反映される通り）。一部の実施形態では、そのような参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は

50

、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の感度および／または特異度が達成され得るように、対照対象から得られた平均値から離れたある特定の数の標準偏差を選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、そのような参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の感度および／または特異度が達成され得るように、対照対象から得られた最大アッセイシグナルから離れたある特定の数の標準偏差を選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、そのような参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の感度および／もしくは特異度が達成され得るように、（i）対照対象から得られた平均値から離れたある特定の数の標準偏差、または（ii）対照対象から得られた最大アッセイシグナルから離れたある特定の数の標準偏差のいずれかのより制限的ではないものを選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）の決定のための対照対象としては、限定されるものではないが、健康な対象、炎症状態（例えば、慢性閉塞性肺疾患（COPD））を有する対象、良性肺腫瘍を有する対象、およびその組合せが挙げられ得る。一部の実施形態では、健康な対象および炎症状態（例えば、COPD）を有する対象は、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）の決定に含まれる。一部の実施形態では、良性肺腫瘍を有する対象は、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）の決定に含まれない。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の特異度（例えば、少なくとも95%またはそれよりも高い特異度〔例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれよりも高い特異度を含む〕、例えば、一部の実施形態では、少なくとも99.8%の特異度）が達成され得るように、（i）対照対象から得られた平均値、または（ii）対照対象から得られた最大アッセイシグナルから離れた少なくとも1.5またはそれよりも大きい標準偏差（SD）（例えば、少なくとも1.6、少なくとも1.7、少なくとも1.8、少なくとも1.9、少なくとも2、少なくとも2.1、少なくとも2.2、少なくとも2.3、少なくとも2.4、少なくとも2.5、少なくとも2.6、少なくとも2.7、少なくとも2.8、少なくとも2.9、少なくとも3、少なくとも3.1、少なくとも3.2、少なくとも3.3、少なくとも3.4、少なくとも3.5、少なくとも3.6、またはそれよりも大きいSDを含む）を選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の特異度（例えば、少なくとも99%、またはそれよりも高い特異度）が達成され得るように、（i）対照対象から得られた平均値、または（ii）対照対象から得られた最大アッセイシグナルから離れた少なくとも2.9SD（例えば、少なくとも2.93SD）を選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の所望の特異度（例えば、少なくとも99%、またはそれよりも高い特異度）が達成され得るように、（i）対照対象から得られた平均値、または（ii）対照対象から得られた最大アッセイシグナルのより制限的ではないものから離れた少なくとも2.9SD（例えば、少なくとも2.93SD）を選択することによって決定されてもよい。一部の実施形態では、そのような参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、目的の特異度および／または感度（例えば、本明細書に記載される通り）が達成され得るように、正常な健康な組織対肺がん試料における標的バイオマーカーの発現レベル（例えば、転写レベル）に基づいて決定されてもよい。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、例えば、肺がんのステージおよび／もしくはサブタイプ、ならびに／または患者の特徴、例えば、患者の年齢、肺がんについてのリスク因子（例えば、遺伝的リスク対平均リスク、生活歴関連リスク因子）、症候性／無症候性状態、ならびにその組合せに応じて変わり得る。

【0257】

一部の実施形態では、そのような参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、健康な

10

20

30

40

50

対象（例えば、既定の年齢範囲の対象）、および必要に応じて、炎症状態（例えば、COPD）を有する対象の全体での対数正規分布、ならびに目的の特異度を達成するために必要なレベルの選択に基づいて、例えば、肺がんまたはそのサブタイプの有病率に基づいて、決定されてもよい。一部の実施形態では、目的の特異度は、例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも70%であってもよい。

【0258】

本開示は、数ある中でも、例えば、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を含む試料から、対象が、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいかどうかを決定するための技術も提供する。例えば、一部の実施形態では、それを必要とする対象からの生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）が、参照閾値レベル、例えば、カットオフ値（例えば、本開示に従って決定される通り）であるか、またはそれを上回る標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す場合に、対象は、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして分類される。一部のそのような実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、健康な対象（例えば、既定の年齢範囲の対象）、および必要に応じて、炎症状態（例えば、COPD）を有する対象の全体での対数正規分布、ならびに目的の特異度を達成するために必要なレベルの選択に基づいて、例えば、肺がんまたはそのサブタイプの有病率に基づいて、決定されてもよい。一部の実施形態では、目的の特異度は、例えば、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも70%であってもよい。

【0259】

一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、目的の特異度および／または感度（例えば、本明細書に記載される通り）が達成され得るように、正常な健康な組織対肺がん試料における標的バイオマーカーシグネチャーの個々の標的バイオマーカーの発現レベル（例えば、転写レベル）に基づいて決定されてもよい。一部の実施形態では、参照閾値レベル（例えば、カットオフ値）は、例えば、肺がんのステージおよび／もしくはサブタイプ、ならびに／または患者の特徴、例えば、患者の年齢、肺がんについてのリスク因子（例えば、遺伝的リスク対平均リスク、生活歴関連リスク因子）、症候性／無症候性状態、およびその組合せに応じて変わり得る。

【0260】

一部の実施形態では、それを必要とする対象からの生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）が、参照閾値レベルを満足するバイオマーカーの組合せのレベルを示す場合に、対象は、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして分類される。例えば、一部の実施形態では、それを必要とする対象からの体液由来試料（例えば、限定されるものではないが、血液由来試料）が、参照閾値レベルと比べて、標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞のレベルの上昇を示す場合に、対象は、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして分類される。一部の実施形態では、それを必要とする対象は、対象の生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）が、参照閾値レベルと比較して、例えば、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも30%またはそれよりも高い標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして分類される。一部の実施形態では、それを必要とする対象は、対象の生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）が、参照閾値レベルと比較して、例えば、少なくとも3倍、少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少な

くとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも30倍、少なくとも40倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも90倍、少なくとも100倍、少なくとも250倍、少なくとも500倍、少なくとも750倍、少なくとも1000倍、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも2倍またはそれよりも高い標的バイオマーカーシグネチャー発現ナノ粒子のレベルを示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして分類される。

【0261】

それを必要とする対象からの生体試料（例えば、一部の実施形態では、体液由来試料、例えば、限定されるものではないが、血液由来試料など）が、参照閾値レベルと同等のレベルを示す場合に、対象は、肺がんを有する可能性が低いか、またはそれに罹患しやすい可能性が低いとして分類される。一部のそのような実施形態では、参照閾値レベルは、参照対象、例えば、非がん対象の集団からの比較可能な試料における標的バイオマーカーシグネチャーを発現するナノ粒子のレベルに対応する。一部の実施形態では、例示的な非がん対象としては、健康な対象（例えば、55歳より下または55歳より上などの、例えば、既定の年齢範囲の健康な対象）、非肺関連の健康上の疾患、障害、または状態を有する対象（例えば、膵臓がん、結腸直腸がんなどのような非肺がんを有する対象、または慢性閉塞性肺疾患もしくは慢性肺感染症の症状を有する対象を含む）、良性肺腫瘍（例えば、胸部X線または低線量CTスキャンなどのイメージングにより肺において観察された良性腫瘍）を有する対象、およびその組合せが挙げられる。

【0262】

IV. 個々のナノ粒子をプロファイリングするための例示的な方法

一部の実施形態では、個々の細胞外小胞をプロファイリングするためのアッセイ（例えば、単一EVプロファイリングアッセイ）を使用して、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出することができる。例えば、一部の実施形態では、そのようなアッセイは、(i) 肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるマーカーを標的にすることによる捕捉アッセイ、および(ii) 肺がんのためのそのような標的バイオマーカーシグネチャーの少なくとも1つまたは複数の追加の提供されるマーカーについての検出アッセイを含んでいてもよく、そのような捕捉アッセイは、そのような検出アッセイの前に行われる。

【0263】

本開示を読む当業者は、個々の細胞外小胞を検出するまたはプロファイリングするための本明細書に記載されるアッセイが、細胞外小胞を含む目的のサイズ（例えば、一部の実施形態では、約30nm～約100nmの範囲内のサイズ）を有するナノ粒子の表面上に存在する表面バイオマーカーを検出することもできることを理解するであろう。

【0264】

一部の実施形態では、捕捉アッセイは、それを必要とする対象の生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）から腫瘍関連ナノ粒子（例えば、肺腫瘍関連ナノ粒子）を選択的に捕捉するために行われる。一部の実施形態では、捕捉アッセイは、ある特定のサイズ範囲および／またはある特定の特徴のナノ粒子、例えば、肺がんに関連するナノ粒子を選択的に捕捉するために行われる。一部のそのような実施形態では、捕捉アッセイの前に、生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）は、事前に処理されて、例えば、限定されるものではないが、可溶性タンパク質および妨げる実体、例えば、細胞デブリなどを含む、夾雑物が除去されてもよい。例えば、一部の実施形態では、ナノ粒子は、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して、対象の生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）から精製される。一部のそのような実施形態では、ナノ粒子は、一部の実施形態では、少なくとも90%またはそれよりも多く（例えば、少なくとも93%、95%、97%、99%またはそれよりも多くを含む）の可溶性タンパク質および他の妨げる薬剤、例えば、細胞デブリなどを除去し得るサイズ排除クロマトグラフィーを使用して、生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）から直接的

に精製することができる。

【0265】

一部の実施形態では、捕捉アッセイは、生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）を、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの少なくとも1つまたは複数の提供されるバイオマーカーに結合する標的捕捉部分を含む少なくとも1つの捕捉剤と接触させるステップを含む。一部の実施形態では、捕捉アッセイは、マルチプレックス化されてもよく、これは、生体試料（例えば、体液由来試料、例えば、血液由来試料）を、捕捉剤のセットと接触させるステップであって、それぞれの捕捉剤が、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの別個の提供されるバイオマーカーに結合する標的捕捉部分を含む、ステップを含む。一部の実施形態では、標的捕捉部分は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーまたは表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるおおよび／または利用されるもの）を対象にする。

10

【0266】

一部の実施形態では、そのような標的捕捉部分は、固体基材上に固定化されていてもよい。したがって、一部の実施形態では、捕捉アッセイにおいて用いられる捕捉剤は、それにコンジュゲートされた少なくとも1つもしくは複数（例えば、1、2、3、4、5、またはそれよりも多く）の標的捕捉部分を含み、それぞれの標的捕捉部分が、細胞外小胞関連表面バイオマーカーもしくは表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるおおよび／または利用されるもの）を対象にする、固体基材であるか、またはそれを含む。固体基材は、細胞外小胞を含み、下流での取り扱い、処理、おおよび／または検出を妨げない、目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を捕捉するために好適な形態で提供されてもよい。例えば、一部の実施形態では、固体基材は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体基材は、表面であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、そのような表面は、アッセイチャンバーの捕捉表面（例えば、管、ウェル、マイクロウェル、プレート、フィルター、膜、マトリックスなどを含む）であってもよい。一部の実施形態では、捕捉剤は、それにコンジュゲートされた標的捕捉部分を含む磁気ビーズであるか、またはそれを含む。

20

【0267】

一部の実施形態では、検出アッセイは、捕捉アッセイによって捕捉されたナノ粒子（例えば、上記に記載される通り）において、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、捕捉アッセイにおいて標的にされるものとは異なるもの）の1つまたは複数の提供されるバイオマーカーを検出するために行われる。一部の実施形態では、検出アッセイは、イムノPCRを含んでいてもよい。一部の実施形態では、イムノPCRは、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの単一の提供されるバイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を標的にする少なくとも1つのプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、イムノPCRは、標的バイオマーカーシグネチャーの同じバイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）の異なるエピトープを対象にする、多数の（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはそれよりも多く）のプローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、イムノPCRは、本明細書に記載される異なる提供されるバイオマーカーをそれぞれ対象にする、多数（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはそれよりも多く）のプローブを含んでいてもよい。

30

40

【0268】

一部の実施形態では、検出アッセイは、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、RT-PCRは、本明細書に記載される単一の提供されるバイオマーカーを標的とする少なくとも1つのプライマー／プローブセットを含んでいてもよい。一部の実施形態では、RT-PCRは、それぞれのセットが本明細書に記載される異なる提供されるバイオマーカーを対象にする、多数（例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、またはそれよりも多く）のプライマー／プロ

50

ープセットを含んでいてもよい。

【0269】

一部の実施形態では、検出アッセイは、例えば、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子（例えば、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーを発現する捕捉された細胞外小胞）内の肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーの共局在化を決定するために、近接ライゲーションイムノ定量的ポリメラーゼ連鎖反応（pliq-PCR）を含んでいてもよい。

【0270】

一部の実施形態では、検出アッセイは、一部では、個々のナノ粒子における標的バイオマーカーシグネチャーの相互作用および／または共局在に基づく、出願人によって開発され、両方とも2020年2月28日に出願され、「標的実体検出のためのシステム、組成物、および方法」という名称の米国特許出願第16／805,637号（US11,085,089号として発行）、および国際出願第PCT／US2020／020529号（WO2020180741号として公開）（「'089特許」および「'529出願」；その両方とも、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる）に記載される標的実体検出システムを用いる。例えば、そのような標的実体検出システム（'089特許および'529出願に記載され、および「提供される標的実体検出システムおよびそれを含む方法」という表題のセクションで下記にもさらに記載される通り）は、試料（例えば、生体試料、環境試料、または他の試料）において、一部の実施形態では、単一実体レベルで、少なくとも1つまたは複数（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多く）の標的（例えば、分子標的）を含む目的の実体（例えば、目的の生物学的または化学的実体、例えば、ナノ粒子または分析物）を検出することができる。本開示を読む当業者は、提供される標的実体検出システムが、例えば、肺がんの検出のためを含んで、多種多様な適用および／または目的のために有用であることを認識するであろう。例えば、一部の実施形態では、提供される標的実体検出システムは、医学的適用および／または目的に有用であり得る。一部の実施形態では、提供される標的実体検出システムは、疾患または状態（例えば、肺がん）について、個体（例えば、一部の実施形態では、無症候性個体であってもよく、または一部の実施形態では、肺がんに関連する1つもしくは複数の症状を経験している個体であってもよく、または一部の実施形態では、肺がんについてリスクがある個体、例えば、肺がんについての遺伝的リスクおよび／もしくは生活歴関連危険因子を有する個体、または喫煙個体などであってよい）をスクリーニングする（例えば、定期的にスクリーニングする）ために有用であり得る。一部の実施形態では、提供される標的実体検出システムは、異なる種類のがんについて（例えば、そのうちの1つが肺がんであり得る多数の異なるがんについて）、個体（例えば、一部の実施形態では、無症候性個体であってもよく、または一部の実施形態では、肺がんに関連する1つもしくは複数の症状を経験している個体であってもよく、または一部の実施形態では、肺がんについてリスクがある個体、例えば、肺がんについての遺伝的リスクおよび／もしくは生活歴関連危険因子を有する個体、または喫煙個体などであってよい）をスクリーニングする（例えば、定期的にスクリーニングする）ために有用であり得る。一部の実施形態では、提供される標的実体検出システムは、無症候性個体を含むか、またはその個体からなる集団に適用される場合にも、有効である（例えば、十分に高い感度および／または低い擬陽性率および／または偽陰性率の結果に起因する）。一部の実施形態では、提供される標的実体検出システムは、疾患処置（例えば、肺がんの処置）と併せたコンパニオン診断として有用であり得る。

【0271】

一部の実施形態では、多数（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多く）の検出アッセイは、ナノ粒子、例えば、捕捉アッセイによって捕捉されたもの（例えば、上記に記載される通り）において、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、捕捉アッセイにおいて標的にされるものとは異なるもの）の多数のバイオマーカー（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多く）を検出するために行われてもよい。例えば、一部の実施形態では、多数の検出アッセイは、（i）提供される標的実体

検出システム、または ' 0 8 9 特許および ' 5 2 9 出願に記載されるか、ならびに／もしくは本明細書に記載されるシステム；ならびに (i i) イムノPCRを含んでもよい。一部の実施形態では、多数の検出アッセイは、(i) 提供される標的実体検出システム、または ' 0 8 9 特許および ' 5 2 9 出願に記載されるシステム；ならびに (i i) RT-PCRを含んでもよい。

【 0 2 7 2 】

例えば、一部の実施形態では、細胞外小胞を含む対象の試料は、最初に、標的実体検出システム、または ' 0 8 9 特許および ' 5 2 9 出願に記載されるか、ならびに／もしくは本明細書に記載されるシステムを使用する、表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）の検出に供され、次いで、小胞内分析物を放出させるために溶解緩衝液に、
それに続いて、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーの検出のための核酸アッセイ（例えば、一部の実施形態では、RT-qPCR）に供されてもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、本明細書に記載されるバイオマーカー遺伝子によってコードされるmRNA転写物であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、マイクロRNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、オフアンノンコーディングRNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、長鎖ノンコーディングRNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、piwi相互作用RNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、環状RNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、1つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、核小体低分子RNAであってもよく、またはそれを含んでもよい。

【 0 2 7 3 】

V. 提供される標的実体検出システムおよびそれを含む方法

一部の実施形態では、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーのための検出アッセイにおいて有用であり得る標的実体検出システムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための多数の検出プローブを含む。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、またはそれよりも多くの検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための2～50の検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための2～30の検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための2～25の検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための5～30の検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、そのようなシステムは、それぞれ特異的標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）のための5～25の検出プローブを含んでもよい。一部の実施形態では、セットにおけるそのような検出プローブのうちの少なくとも2つは、標的バイオマーカーシグネチャーの同じバイオマーカーを対象にしてもよい。一部の実施形態では、セットにおけるそのような検出プローブのうちの少なく

とも2つは、標的バイオマーカーシグネチャーの同じバイオマーカーの同じエピトープを対象にしているもよい。一部の実施形態では、セットにおけるそのような検出プローブのうちの少なくとも2つは、標的バイオマーカーシグネチャーの同じバイオマーカーの異なるエピトープを対象にしているもよい。

【0274】

一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、単一の疾患または状態、例えば、肺がんの検出のために使用されてもよい。一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、例えば、そのうちの1つが肺がんである、少なくとも2つまたはそれよりも多くの疾患または状態の検出を可能にし得る。一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、例えば、肺腺癌肺がん、小細胞肺がん、扁平上皮細胞および移行細胞肺がん、大細胞肺がん、非小細胞癌肺がん、他の既定された肺がん癌種、肺がん肉腫、ならびに他の既定された種類の当技術分野において公知の肺がん (SEER Cancer Statistics Review 1975-2017) を含む、ある特定のサブタイプの肺がんの検出を可能にし得る。一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、例えば、ステージI、ステージII、ステージIII、および／またはステージIVを含む、ある特定のステージの肺がんの検出を可能にし得る。したがって、一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、多数（例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、またはそれよりも多く）のセットの検出プローブを含んでいてもよく、それぞれのセットは、異なる疾患、または異なる種類の疾患もしくは状態の検出を対象にする。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システムにおける使用のために適切な検出プローブは、多数（例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、またはそれよりも多く）のセットの検出プローブを含み、一部の実施形態では、それぞれのセットは、そのうちの1つが肺がんである異なる種類のがんの検出を対象にするか、または一部の実施形態では、それぞれのセットは、さまざまなサブタイプおよび／もしくはステージの肺がんの検出を対象にする。

【0275】

検出プローブ

一部の実施形態では、本明細書で提供されるおよび／または利用される検出プローブは、標的結合部分、および標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインを含む。一部の実施形態では、標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの少なくとも一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインのそれぞれの末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含んでいてもよい。一部の実施形態では、検出プローブは、近接ライゲーション-免疫定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (pliq-PCR) に好適であり得、pliq-PCR検出プローブと称され得る。

【0276】

A. 標的結合部分

オリゴヌクレオチドドメインにカップリングされた標的結合部分は、標的（例えば、標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー；当業者は、標的バイオマーカーが特定の形態または部分／構成要素である場合に、標的結合部分がその形態または部分／構成要素に特異的に結合することを認識するであろう）に特異的に結合する実体または薬剤である。一部の実施形態では、標的結合部分は、標的（例えば、分子標的）について、少なくとも約 10^{-4} M、少なくとも約 10^{-5} M、少なくとも約 10^{-6} M、少な

くとも約 10^{-7} M、少なくとも約 10^{-8} M、少なくとも約 10^{-9} M、またはそれよりも低い結合親和性（例えば、解離定数によって測定される通り）を有していてもよい。当業者は、一部の事例では、結合親和性（例えば、解離定数によって測定される通り）が、2つの分子間の非共有結合的な分子間相互作用、例えば、水素結合、静電相互作用、疎水性およびファンデルワールス力によって影響を受け得ることを認識するであろう。代替的に、または加えて、リガンドとその標的分子との間の結合親和性は、他の分子の存在によって影響を受けてもよい。当業者は、例えば、限定されるものではないが、ELISA、表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイ、ルミネックス単一抗原（LSA）アッセイ、バイオレイヤー干渉法（BLI）（例えば、Octet）アッセイ、グレーティング結合干渉法、および分光学的アッセイを含む、本開示に従って結合親和性および／または解離定数を測定するための各種の技術に精通しているであろう。

10

【0277】

一部の実施形態では、標的結合部分は、例えば、炭水化物、核酸、脂質、金属、ポリペプチド、低分子などのような任意の化学クラスの薬剤、および／もしくはその組合せであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、親和性剤、例えば、抗体、アフィマー、アプタマー、レクチン、*singlec* などであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、抗体剤、例えば、標的もしくはそのエピトープ、例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカーもしくはそのエピトープに特異的に結合する抗体剤であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、提供されるバイオマーカーのための標的結合部分は、市販のものであってもよい。一部の実施形態では、提供されるバイオマーカーのための標的結合部分は、本明細書に記載されるアッセイにおける使用の目的のために設計および作出されていてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、アプタマー、例えば、標的もしくはそのエピトープ、例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカーもしくはそのエピトープに特異的に結合するアプタマーであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、標的結合部分は、標的もしくはそのエピトープ、例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカーもしくはそのエピトープに特異的に結合するアフィマー分子であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、標的結合部分は、本明細書に提供される炭水化物依存性マーカーに特異的に結合するレクチンもしくは *singlec* であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、そのようなアフィマー分子は、対応する抗体の特異性および親和性と類似する特異性および親和性で、標的もしくはそのエピトープ（例えば、本明細書に記載される通り）に結合するペプチドもしくはポリペプチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的は、肺がんに関連する標的であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。例えば、一部のそのような実施形態では、がん関連標的は、2つ以上のがん（すなわち、少なくとも2つまたはそれよりも多くのがん）と関連する標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、がん関連標的は、典型的には、がんに関連する標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、がん関連標的は、特異的組織のがん、例えば、肺がんに関連する標的であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、がん関連標的は、特定のがん、例えば、特定の肺がんに関連する標的であり得るか、またはそれを含み得る。

20

30

40

【0278】

一部の実施形態では、標的結合部分は、生物学的実体（例えば、限定されるものではないが、細胞および／またはナノ粒子を含む）に存在する標的を認識し、それに特異的に結合する。例えば、一部の実施形態では、標的結合部分は、腫瘍関連抗原またはそのエピトープを認識し、それに特異的に結合してもよい。一部の実施形態では、腫瘍関連抗原は、がん、例えば、皮膚がん、脳がん（例えば、神経膠芽腫を含む）、乳がん、結腸直腸がん、肝臓がん、肺がん、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、および皮膚がんなどに関連する抗原であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、肺がん（例えば、肺腺癌、小細胞肺がん、非小細胞肺がんなど）と関連する腫瘍抗

50

原を認識してもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、肺腺癌と関連する腫瘍抗原を認識してもよい。

【0279】

一部の実施形態では、標的結合部分は、小胞内標的、例えば、提供される小胞内タンパク質またはRNA（例えば、mRNA、snRNA、miRNA、siRNA、オファノンノンコーディングRNA、長鎖ノンコーディングRNA、またはpiwi相互作用RNA）に特異的に結合してもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、ナノ粒子上／内に存在する表面標的、例えば、肺がん関連ナノ粒子上に存在する表面バイオマーカーに特異的に結合してもよい。

【0280】

一部の実施形態では、標的結合部分は、オフターゲット相互作用について査定される。一部の実施形態では、標的結合部分は、免疫捕捉、それに続いて質量分析を使用して査定される（例えば、複雑な試料においてオフターゲット結合事象を明らかにするため）。一部の実施形態では、標的結合部分は、例えば、数千のヒトタンパク質またはグリカンが、チップ上に配列され、抗体の結合が、すべての利用可能な標的にわたってプロファイリングされる（例えば、特異的抗体は、目的の標的にのみ結合する）、タンパク質またはグリカンアレイを使用して査定される。一部の実施形態では、標的結合部分は、従来のイムノアッセイ、例えば、ウエスタンブロットを使用して査定される。一部の実施形態では、標的結合部分は、一般的なオフターゲット非特異的結合（例えば、他の抗体、DNA、脂質などへの結合）について査定される。一部の実施形態では、そのような一般的なオフターゲット非特異的結合は、偽陽性シグナルを同定するための陰性対照を使用して（例えば、1つまたは複数の抗体が非特異的に結合し、標的には結合しないことを示唆する）、測定および同定されてもよい。

【0281】

一部の実施形態では、標的結合部分は、特異的な状態または疾患（例えば、がん）のためのバイオマーカーを対象にし、このバイオマーカーは、例えば、そのようなバイオマーカー（例えば、予測バイオマーカー）を同定するために、患者生検および／または患者データの集団またはライブラリー（例えば、何十、何百、何千、何万、何十万、またはそれよりも多い）を分析することによって決定されるか、または決定されている。

【0282】

一部の実施形態では、関連するバイオマーカーは、例えば、データ解析を介して、同定されたものおよび／または特徴付けられたものであってもよい。一部の実施形態では、例えば、多様なデータのセット（例えば、一部の実施形態では、バルクRNAシーケンシング、単一細胞RNA（scRNA）シーケンシング、質量分析、組織診、翻訳後改変データ、in vitroおよび／またはin vivo実験データのうちの1つまたは複数を含む）は、疾患または状態（例えば、がん）に非常に特異的であるバイオマーカー（例えば、予測マーカー）を同定するために、機械学習および／またはコンピューター計算モデルにより解析することができる。

【0283】

一部の実施形態では、標的結合部分は、組織特異的標的、例えば、特異的組織、例えば、脳、乳房、結腸、卵巣および／または女性生殖系と関連する他の組織、膵臓、前立腺および／または男性生殖系と関連する他の組織、肝臓、肺、ならびに皮膚などと関連する標的を対象にする。一部の実施形態では、そのような組織特異的標的は、正常な健康な組織および／または罹患組織、例えば腫瘍と関連していてもよい。一部の実施形態では、標的結合部分は、対象の正常で健康な状態と特異的に関連する標的を対象にする。

【0284】

一部の実施形態では、多数の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）において利用される個々の標的結合実体は、異なる標的を対象にする。一部の実施形態では、そのような異なる標的は、異なるマーカータンパク質またはポリペプチドとなってもよい。一部の実施形態では、そのような異なる標的は、同じマーカ

10

20

30

40

50

ータンパク質またはポリペプチドの異なるエピトープとなってもよい。一部の実施形態では、多数の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）において利用される2つまたはそれよりも多くの個々の標的結合実体は、同じ標的を対象にしているもよい。

【0285】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための多数の検出プローブにおいて利用される個々の標的結合実体は、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、上記の「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションに記載されるもの）の異なる標的バイオマーカーを対象にしているもよい。例えば、一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびEpCAMを対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびSLC34A2を対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、MUC1およびCEACAM6を対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。

10

【0286】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための多数の検出プローブにおいて利用される個々の標的結合実体は、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャー（例えば、上記の「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションに記載されるもの）の同じ標的バイオマーカーを対象にしているもよい。一部の実施形態では、そのような標的結合実体は、肺がんのためのそのような標的バイオマーカーシグネチャーの同じ標的バイオマーカーの同じまたは異なるエピトープを対象にしているもよい。例えば、一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CEACAM6（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、ALCAM（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CD55（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CD1（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CDH3（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CD274（PD-L1）（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、CEACAM5（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なるエピトープ）をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有しているもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、DSG2（例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および／または同じエピトープもしくは異なる

20

30

40

50

エピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、EGFR(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、EPCAM(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、FOLR1(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、IG1FR(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、MET(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、MSLN(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、MUC1(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、SLC34A2(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、sTn抗原(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、Tn抗原(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、T抗原(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、TACSTD(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。一部の実施形態では、多数のうちの少なくとも2つの検出プローブは、TNFRSF10B(例えば、そのインタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン、および/または同じエピトープもしくは異なるエピトープ)をそれぞれ対象にするそれらの標的結合実体を有していてもよい。

10

20

30

40

50

【0287】

B. オリゴヌクレオチドドメイン

一部の実施形態では、本開示に従った使用のためのオリゴヌクレオチドドメイン(例えば、標的結合部分にカップリングされていてもよい)は、二本鎖部分、およびオリゴヌク

レオチドドメインの一方または両方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含んでいてもよい。オリゴヌクレオチドドメインがそれぞれの末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む一部の実施形態では、一本鎖オーバーハングは、二本鎖部分の異なる鎖から伸びている。オリゴヌクレオチドドメインがオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの他方の末端は、平滑末端であってもよい。

【0288】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、ワトソン-クリック型または類似の塩基対相互作用、およびその任意の組合せに参与することができる、リボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、合成ヌクレオチド残基を含んでいてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、DNAであるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、ペプチド核酸（PNA）であるか、またはそれを含む。

【0289】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、少なくとも一部では、例えば、検出される目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）の物理的特徴、ならびに／または検出される目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）における分子標的の選択および局在によって決定される長さを有していてもよい。一部の実施形態では、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブが、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）に結合する場合に、第1の一本鎖オーバーハングおよび第2の一本鎖オーバーハングが、一本鎖オーバーハング間の相互作用（例えば、ハイブリダイゼーション）を可能にするのに十分に近接しているような長さを有するように構成される。例えば、目的の実体（例えば、生物学的実体）が、細胞外小胞（例えば、エキソソーム）である場合、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、それらの個々の一本鎖オーバーハングが、対応する検出プローブが同じ細胞外小胞に結合した場合に互いにアニールするか、または相互作用するのに十分に近接するような長さをそれぞれ独立して有していてもよい。例えば、一部の実施形態では、細胞外小胞（例えば、エキソソーム）を検出するための検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、約20nm～約200nm、約40nm～約500nm、約40nm～約300nm、または約50nm～約150nmの長さをそれぞれ独立して有していてもよい。一部の実施形態では、細胞外小胞（例えば、エキソソーム）を検出するための検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、約20nm～約200nmの長さをそれぞれ独立して有していてもよい。一部の実施形態では、セットにおける検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインの長さは、それらが同じ目的の実体に同時に結合する場合に、それらが互いを見出す確率を増加させるおよび／または最大化するためにそれぞれ独立して変更することができる。細胞外小胞を検出するための検出プローブにおける使用のために設計されたそのようなオリゴヌクレオチドドメインは、細胞外小胞を含む目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を検出するための検出プローブにおいて使用することもできる。

【0290】

したがって、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術における使用のためのオリゴヌクレオチドドメインは、約20から最大で約1000ヌクレオチドまでの範囲の長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、約30から最大で約1000ヌクレオチドまでの範囲の長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、約30～約500ヌクレオチド、約30～約250ヌクレオチド、約30～約200ヌクレオチド、約30～約150ヌクレオチド、約40～約150ヌクレオチド、約40～約125ヌクレオチド、約40～約100ヌクレオチド、約40～約60ヌクレオチド、約50～約90ヌクレオチド、約50～約80ヌクレオチドの範囲の長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、例えば、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60

、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも250、少なくとも500、少なくとも750、少なくとも1000、またはそれよりも長いヌクレオチドを含んで、少なくとも20またはそれよりも長いヌクレオチドの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、例えば、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40ヌクレオチド以下、30ヌクレオチド以下、20以下、またはそれよりも短いヌクレオチドを含んで、1000以下またはそれよりも短いヌクレオチドの長さを有していてもよい。

【0291】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、約20nm～約500nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、約20nm～約400nm、約30nm～約200nm、約50nm～約100nm、約30nm～約70nm、または約40nm～約60nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、例えば、少なくとも約30nm、少なくとも約40nm、少なくとも約50nm、少なくとも約60nm、少なくとも約70nm、少なくとも約80nm、少なくとも約90nm、少なくとも約100nm、少なくとも約200nm、少なくとも約300nm、少なくとも約400nm、またはそれよりも長いを含んで、少なくとも約20nmまたはそれよりも長い長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインは、例えば、900nm以下、800nm以下、700nm以下、600nm以下、500nm以下、400nm以下、300nm以下、200nm以下、100nm以下、またはそれよりも短いを含んで、1000nm以下またはそれよりも短い長さを有していてもよい。

【0292】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術における使用のためのオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、約30から最大で約1000ヌクレオチドまでの範囲の長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、約30～約500ヌクレオチド、約30～約250ヌクレオチド、約30～約200ヌクレオチド、約30～約150ヌクレオチド、約40～約150ヌクレオチド、約40～約125ヌクレオチド、約40～約100ヌクレオチド、約50～約90ヌクレオチド、約50～約80ヌクレオチドの範囲の長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、例えば、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、少なくとも100、少なくとも250、少なくとも500、少なくとも750、少なくとも1000、またはそれよりも長いヌクレオチドを含んで、少なくとも30またはそれよりも長いヌクレオチドの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、例えば、900以下、800以下、700以下、600以下、500以下、400以下、300以下、200以下、100以下、90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、またはそれよりも短いヌクレオチドを含んで、1000以下またはそれよりも短いヌクレオチドの長さを有していてもよい。

【0293】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、約20nm～約500nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、約20nm～約400nm、約30nm～約200nm、約50nm～約100nm、約30nm～約70nm、または約40nm～約60nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、例えば、少なくとも約30nm、少なくとも約40nm、少なくとも約50nm、少なくとも約60nm、少なくとも約70nm、少なくとも約80nm、少なくとも約90nm、少なくとも約100nm、少なくとも約200nm、少なくとも約300nm、少なくとも約400nm、またはそれよりも長いを含んで、少なくとも約20nmまたはそれよりも長い長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖

部分は、例えば、900 nm以下、800 nm以下、700 nm以下、600 nm以下、500 nm以下、400 nm以下、300 nm以下、200 nm以下、100 nm以下、またはそれよりも短いを含んで、1000 nm以下またはそれよりも短い長さを有していてもよい。

【0294】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、検出プローブが、個々の相補的一本鎖オーバーハング（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）のハイブリダイゼーションにより互いに接続される場合に、個々のオリゴヌクレオチドドメインの合計の長さ（もしあれば、標的結合部分をオリゴヌクレオチドドメインに連結するリンカーを含む）が、個々の標的結合実体が目的の実体（例えば、細胞外小胞）の完全に特徴的な長さ（例えば、直径）に実質的に及ぶのを可能にするために十分に長いことを特徴とする。例えば、ナノ粒子（例えば、細胞外小胞）が目的の実体である一部の実施形態では、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインの合計の長さ（もしあれば、標的結合部分をオリゴヌクレオチドドメインに連結するリンカーを含む）は、検出プローブが互いに完全に接続される場合、およそ50～200 nmであってもよい。

10

【0295】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、プライマーのための結合部位を含んでいてもよい。一部の実施形態では、プライマーのためのそのような結合部位は、ミスプライミングまたはプライマー二量体の可能性を低減するか、または最小化するように設計されたヌクレオチド配列を含んでいてもよい。そのような特色は、一部の実施形態では、検出下限を減少させ、したがって、本明細書に提供されるシステムの感度を増加させることができる。一部の実施形態では、プライマーのための結合部位は、別のプライマー結合部位と類似のアニール温度を有するように設計されたヌクレオチド配列を含んでいてもよい。

20

【0296】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、対象（例えば、ヒト対象）のゲノムおよび／または遺伝子転写物（例えば、ゲノムDNAおよび／またはRNA、例えば遺伝子のmRNA）と典型的に関連する核酸配列（例えば、DNAおよび／またはRNA配列）との重複を低減するか、または最小化するように設計されたヌクレオチド配列を含んでいてもよい。そのような特色は、一部の実施形態では、検出の間に、試料中に（例えば、夾雑物として）存在し得る対象の任意のゲノムDNAおよび／またはmRNA転写物の干渉を低減してもよく、または最小化してもよい。

30

【0297】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、自己二量体、ホモ二量体、またはヘテロ二量体の形成を低減するか、または最小化するように設計されたヌクレオチド配列を有していてもよい。

【0298】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術における使用のためのオリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、約2～約20ヌクレオチドの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、約2～約15ヌクレオチド、約2～約10ヌクレオチド、約3～約20ヌクレオチド、約3～約15ヌクレオチド、約3～約10ヌクレオチドの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、一本鎖オーバーハングは、少なくとも1～5ヌクレオチドの長さを有し得る。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも20ヌクレオチド、またはそれよりも長いを含んで、少なくとも2またはそれよりも長いヌクレオチドの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、例えば、15以下、14以下、13以下、12以下、11以下、10以下、9以下、8以下

40

50

、7以下、6以下、5以下、4以下、またはそれよりも短いヌクレオチドを含んで、20以下またはそれよりも短いヌクレオチドの長さを有していてもよい。

【0299】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、約1nm～約10nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、約1nm～約5nmの長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、例えば、少なくとも約1nm、少なくとも約1.5nm、少なくとも約2nm、少なくとも約3nm、少なくとも約4nm、少なくとも約5nm、少なくとも約6nm、少なくとも約7nm、少なくとも約8nm、少なくとも約9nm、少なくとも約10nm、またはそれよりも長いを含んで、少なくとも約0.5nmまたはそれよりも長い長さを有していてもよい。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、例えば、9nm以下、8nm以下、7nm以下、6nm以下、5nm以下、4nm以下、3nm以下、2nm以下、1nm以下、またはそれよりも短いを含んで、10nm以下またはそれよりも短い長さを有していてもよい。

10

【0300】

オリゴヌクレオチドドメインの一本鎖オーバーハングは、相補的一本鎖オーバーハングのハイブリダイゼーションにより、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む二本鎖複合体が形成され得るように、第2の検出プローブの一本鎖オーバーハングの少なくとも一部分と相補的であるヌクレオチド配列を含むように設計される。一部の実施形態では、相補的一本鎖オーバーハングのヌクレオチド配列は、適切な核酸リガーゼの存在下での最適なライゲーション効率のために選択される。一部の実施形態では、一本鎖オーバーハングは、目的の特異的な核酸リガーゼ（例えば、DNAリガーゼ、例えば、T4またはT7リガーゼ）による効率的なライゲーションのために優先的に選択されるヌクレオチド配列を有する。例えば、そのような一本鎖オーバーハングは、例えば、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれるSong et al., "Enzyme-guided DNA sewing architecture" Scientific Reports 5: 17722 (2015)に記載されているように、GAGTのヌクレオチド配列を有していてもよい。

20

【0301】

2つの検出プローブが、個々の相補的一本鎖オーバーハングのハイブリダイゼーションにより一緒にカップリングする場合、ハイブリダイズした一本鎖オーバーハングを含むそれらの個々のオリゴヌクレオチドドメインは、一部の実施形態では、目的の実体（例えば、生物学的実体）の特徴的な長さ（例えば、直径）の約90%～110%または約95%～105%の合計の長さを有し得る。例えば、生物学的実体がエキソソームである一部の実施形態では、合計の長さは、約50nm～約200nm、または約75nm～約150nm、または約80nm～約120nmであり得る。

30

【0302】

C. 標的結合部分とオリゴヌクレオチドドメインとの間のカップリング

オリゴヌクレオチドドメインおよび標的結合部分は、共有結合的な連結によって、および／または非共有結合的な会合（例えば、タンパク質間相互作用、例えば、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用および／またはイオン相互作用など）によって、検出プローブにおいて一緒にカップリングされ得る。一部の実施形態では、本開示に従った使用のために適切な検出プローブは、標的結合部分およびオリゴヌクレオチドドメインを含むコンジュゲート分子であり、2つの構成要素は、典型的には、例えば、結合により直接的に、または1つもしくは複数のリンカーにより間接的に、互いに共有結合的にカップリングされる。一部の実施形態では、標的結合部分は、共有結合的な連結（例えば、結合により直接的に、または1つもしくは複数のリンカーにより間接的に）、および／または非共有結合的な会合（例えば、タンパク質間相互作用、例えば、ストレプトアビジン-ビオチン相互作用および／またはイオン相互作用など）によって、オリゴヌクレオチドドメインの2つの鎖のうち一方にカップリングされる。

40

50

【0303】

リンカーが用いられる場合、一部の実施形態では、リンカーは、選択されたリンカーによりオリゴヌクレオチドドメインの一方または両方の鎖への標的結合部分の共有結合的な付着を提供するように選択される。一部の実施形態では、リンカーは、オリゴヌクレオチドドメインの一方または両方の鎖への標的結合部分の得られる共有結合的な付着が、その標的に向けられた標的結合部分の所望の結合親和性を維持するように、選択される。一部の実施形態では、リンカーは、その標的に向けられた標的結合部分の結合特異性を増強するように選択される。目的のリンカーおよび／またはコンジュゲーション方法は、標的結合部分、例えば、そのサイズおよび／または電荷に応じて広く変わり得る。一部の実施形態では、リンカーは、生物学的に不活性である。

10

【0304】

標的結合部分をオリゴヌクレオチドにカップリングするための各種のリンカーおよび／または方法は、当業者に公知であり、本開示に従って使用することができる。一部の実施形態では、リンカーは、標的結合部分に共有結合的に付着することができる反応性官能基とともに、いずれかの末端にスペーサー基を含むことができる。リンカーにおいて使用することができるスペーサー基の例としては、限定されるものではないが、脂肪族および不飽和炭化水素鎖（例えば、C4、C5、C6、C7、C8、C9、C10、C11、C12、C13、C14、C15、C16、C17、C18、C19、C20、またはそれよりも長いものを含む）、酸素（例えば、エーテル、例えば、ポリエチレングリコール）または窒素（ポリアミン）などのヘテロ原子を含有するスペーサー、ペプチド、炭水化物、ヘテロ原子を含有し得る環式または非環式系が挙げられる。共有結合的な付着を容易にする反応性官能基の非限定的な例としては、求核性官能基（例えば、アミン、アルコール、チオール、および／またはヒドラジド）、求電子性官能基（例えば、アルデヒド、エステル、ビニルケトン、エポキシド、イソシアネート、および／またはマレイミド）、環化付加反応、ジスルフィド結合の形成、または金属への結合が可能な官能基が挙げられる。一部の実施形態では、例示的な反応性官能基は、限定されるものではないが、第一級および第二級アミン、ヒドロキサム酸、N-ヒドロキシスクシンイミジル（NHS）エステル、ジベンゾシクロオクチン（DBCO）-NHSエステル、アジド-NHSエステル、アジド酢酸NHSエステル、プロパルギル-NHSエステル、トランス-シクロオクテン-NHSエステル、N-ヒドロキシスクシンイミジルカルボネート、オキシカルボニルイミダゾール、ニトロフェニルエステル、トリフルオロエチルエステル、グリシジルエーテル、ビニルスルホン、マレイミド、アジドベンゾイルヒドラジド、N-[4-(p-アジドサリチルアミノ)ブチル]-3'-[2'-ピリジルジチオ]プロピオンアミド、ビス-スルホスクシンイミジルスベレート、ジメチルアジピミデート、ジスクシンイミジルタータレート、N-マレイミドブチリルオキシスクシンイミドエステル、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート、N-スクシンイミジル[4-アジドフェニル]-1,3'-ジチオプロピオネート、N-スクシンイミジル[4-ヨードアセチル]アミノベンゾエート、グルタルアルデヒド、およびスクシンイミジル4-[N-マレイミドメチル]シクロヘキサン-1-カルボキシレート、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（SPDP）、4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボン酸N-ヒドロキシスクシンイミドエステル（SMCC）、ならびにその任意の組合せである。

20

30

40

【0305】

一部の実施形態では、標的結合部分（例えば、標的結合抗体剤）は、N-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）エステル化学を使用して、オリゴヌクレオチドドメインの一方または両方の鎖にカップリングまたはコンジュゲートされる。NHSエステルは、遊離第一級アミンと反応し、安定な共有結合的な付着をもたらす。一部の実施形態では、第一級アミノ基は、スペーサー基、例えば、限定されるものではないが、脂肪族および不飽和炭化水素鎖（例えば、C6またはC12スペーサー基）とともに、末端に位置することができる。

50

【0306】

一部の実施形態では、標的結合部分（例えば、標的結合親和性剤）は、例えば、コンジュゲートされた標的結合部分（例えば、コンジュゲートされた標的結合親和性剤）の結合特異性を増強するために、当技術分野において公知の部位特異的コンジュゲーション方法を使用して、オリゴヌクレオチドドメインの一方または両方の鎖にカップリングまたはコンジュゲートすることができる。部位特異的コンジュゲーション方法の例としては、限定されるものではないが、ジスルフィド結合、C末端、炭水化物残基もしくはグリカン、および／または非天然アミノ酸標識化によるカップリングまたはコンジュゲーションが挙げられる。標的結合部分が親和性剤であるか、またはそれを含む一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的結合部分に存在する少なくとも1つまたは複数の遊離アミン基を介して、標的結合部分にカップリングまたはコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的結合部分に存在する少なくとも1つまたは複数の反応性チオール基を介して、親和性剤であるか、またはそれを含む標的結合部分にカップリングまたはコンジュゲートすることができる。一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、標的結合部分に存在する少なくとも1つまたは複数の炭水化物残基を介して、抗体剤もしくはペプチドアプタマーであるか、またはそれを含む標的結合部分に、カップリングまたはコンジュゲートすることができる。

10

【0307】

一部の実施形態では、多数のオリゴヌクレオチド（例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、またはそれよりも多く）は、標的結合部分（例えば、標的結合抗体剤）にカップリングまたはコンジュゲートすることができる。

20

【0308】

例示的な二重標的実体検出システム

一部の実施形態では、本開示によって提供される（および、例えば、肺がんに関連するナノ粒子を、例えば、単一実体レベルで検出するために有用である）標的実体検出システムは、提供される標的バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）のための第1の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）の第1の集団、および提供される標的バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）のための第2の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）の第2の集団を含んでいてもよい。一部の実施形態では、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブは、同じ提供される標的バイオマーカーを対象にする。一部の実施形態では、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブは、異なる提供される標的バイオマーカーを対象にする。

30

【0309】

図2は、(i) その発現レベルが、同じ標的（例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）の2つの分子が近接して見出されるように十分に高い、少なくとも1つの標的（例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）、または(ii) 少なくとも2つまたはそれよりも多くの別個の標的（例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）を含む、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を単一実体レベルで検出するための例示的な二重標的実体検出システムを図示する。第1の検出プローブは、第1の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー1を対象にする）、および第1の標的結合部分にカップリングされた第1のオリゴヌクレオチドドメインを含み、第1のオリゴヌクレオチドドメインは、第1の二本鎖部分、および第1のオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた第1の一本鎖オーバーハングを含む。図2に示されるように、第1のオリゴヌクレオチドドメインは、より長い鎖（鎖3）およびより短い鎖（鎖1）のハイブリダイゼーションから生じ、それによって、二本鎖部分、および一方の末端で一本鎖オーバーハングを形成してもよい。一部の実施形態では、第1の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー1を対象にする）は、第1のオリゴヌクレオチドド

40

50

メインの鎖（例えば、鎖 1）の 5' 末端または 3' 末端にカップリングされる（例えば、共有結合的にカップリングされる）。一部の実施形態では、第 1 の標的結合部分にカップリングされた鎖の 5' 末端または 3' 末端は、リンカーで改変されていてもよい（例えば、スパーサー基ありまたはなしで、本明細書で記載されるおおよび／または利用される通り）。一部の実施形態では、第 1 のオリゴヌクレオチドドメインの別の鎖（例えば、鎖 3）の 5' 末端は、遊離リン酸基を有する。

【0310】

図 2 に表される実施形態では、第 2 の検出プローブは、第 2 の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー 2 を対象にする）、および第 2 の標的結合部分にカップリングされた第 2 のオリゴヌクレオチドドメインを含み、第 2 のオリゴヌクレオチドドメインは、第 2 の二本鎖部分、および第 2 のオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた第 2 の一本鎖オーバーハングを含む。図 2 に示されるように、第 2 のオリゴヌクレオチドドメインは、より長い鎖（鎖 4）およびより短い鎖（鎖 2）のハイブリダイゼーションから生じ、それによって、二本鎖部分、および一方の末端で一本鎖オーバーハングを形成してもよい。一部の実施形態では、第 2 の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー 2 を対象にする）は、第 2 のオリゴヌクレオチドドメインの鎖（例えば、鎖 2）の 5' 末端にカップリングされる（例えば、共有結合的にカップリングされる）。一部の実施形態では、第 2 の標的結合部分にカップリングされた鎖の 5' 末端は、リンカーで改変されていてもよい（例えば、スパーサー基ありまたはなしで、本明細書で記載されるおおよび／または利用される通り）。一部の実施形態では、第 2 のオリゴヌクレオチドドメインの別の鎖（例えば、鎖 4）の 5' 末端は、遊離リン酸基を有する。

【0311】

第 1 の一本鎖オーバーハングおよび第 2 の一本鎖オーバーハングの少なくとも一部分は、それらが十分に近接している場合に、例えば、第 1 の検出プローブおよび第 2 の検出プローブが同じ目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）に同時に結合する場合に、それらがハイブリダイズして、二本鎖複合体を形成することができるように、互いを補完する。一部の実施形態では、第 1 の一本鎖オーバーハングおよび第 2 の一本鎖オーバーハングは、それらがハイブリダイズして二本鎖複合体を形成する場合に、それらの個々のオリゴヌクレオチドドメイン間にギャップ（ライゲーションするためのニック以外）が存在せず、それぞれ個々の標的結合部分が、二本鎖複合体の反対側の末端に位置するように、等しい長さを有する。例えば、一部の実施形態では、ライゲーションが起こる前に、二本鎖複合体は形成され、二本鎖複合体は、それらの個々の一本鎖オーバーハング（例えば、4 ヌクレオチドの長さを有する）の直接ハイブリダイゼーションにより互いにカップリングされた第 1 の検出プローブおよび第 2 の検出プローブを含み、それぞれ個々の標的結合部分（例えば、それぞれ、標的がんマーカー 1 および標的がんマーカー 2 を対象にする）は、二本鎖複合体の反対側の末端に存在する。そのような実施形態では、二本鎖複合体の両方の鎖（個々のオリゴヌクレオチドドメイン間にニックを含む）は、例えば、増幅および検出のためにライゲーション可能である。一部の実施形態では、二本鎖複合体は（例えば、ライゲーションが起こる前）、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含むことができ、第 1 の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー 1 を対象にする）および第 2 の標的結合部分（例えば、標的がんマーカー 2 を対象にする）は、目的の実体に同時に結合する。

【0312】

肺がんの検出のための二重標的実体検出システムの一部の実施形態では、第 1 の検出プローブの第 1 の標的結合部分は、第 1 の標的表面バイオマーカー（例えば、「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションに提供されるもの）を対象にしている一方で、第 2 の検出プローブの第 2 の標的結合部分は、第 2 の標的表面バイオマーカー（例えば、「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションにおいて提供されるもの）を対象にしている。一部の実

施形態では、第1の検出プローブの第1の標的結合部分は、第1の標的小胞内バイオマーカー（例えば、「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションに提供されるもの）を対象にしているてもよい一方で、第2の検出プローブの第2の標的結合部分は、第2の標的小胞内バイオマーカー（例えば、「肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーおよび／または標的バイオマーカーシグネチャー」という表題のセクションにおいて提供されるもの）を対象にしているてもよい。一部の実施形態では、第1の標的結合部分および第2の標的結合部分は、同じ標的表面バイオマーカーまたは同じ標的小胞内バイオマーカーの同じまたは異なるエピトープを対象にしているてもよい。一部の実施形態では、第1の標的結合部分および第2の標的結合部分は、異なる標的表面バイオマーカーまたは異なる標的小胞内バイオマーカーを対象にしているてもよい。

10

【0313】

肺がんの検出のための二重標的実体検出システムの一部の実施形態では、第1の検出プローブは、第1のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたCEACAM6（例えば、インタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン）を対象にする第1の標的結合部分を含む一方で、第2の検出プローブは、第2のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたCEACAM6（例えば、インタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン）を対象にする第2の標的結合部分を含む。一部のそのような実施形態では、第1の標的結合部分および第2の標的結合部分は、CEACAM6（例えば、インタクトタンパク質形態、またはその断片、例えば、その細胞外ドメイン）の同じまたは異なるエピトープを対象にし得る。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、同じであってもよい。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、異なっているてもよい。

20

【0314】

肺がんの検出のための二重標的実体検出システムの一部の実施形態では、第1の検出プローブは、第1のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたCEACAM6ポリペプチドを対象にする第1の標的結合部分を含む一方で、第2の検出プローブは、第2のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたEPCAMポリペプチドを対象にする第2の標的結合部分を含む。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、同じであってもよい。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、異なっているてもよい。

30

【0315】

肺がんの検出のための二重標的実体検出システムの一部の実施形態では、第1の検出プローブは、第1のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたCEACAM6ポリペプチドを対象にする第1の標的結合部分を含む一方で、第2の検出プローブは、第2のオリゴヌクレオチドドメインにコンジュゲートされたSLC34A2ポリペプチドを対象にする第2の標的結合部分を含む。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、同じであってもよい。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインおよび第2のオリゴヌクレオチドドメインの二本鎖部分は、異なっているてもよい。

40

【0316】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための二重標的実体検出システムは、検出プローブの少なくとも2つの別個のセットを含んでいてもよい。例えば、一部の実施形態では、それぞれのセットは、1つまたは複数の標的バイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を含む別個の標的バイオマーカーシグネチャーを対象にしているてもよい。

【0317】

一部の実施形態では、検出プローブの少なくとも2つの別個のセットを含む二重標的実体検出システムはまた、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする捕捉剤を含む捕

50

捉アッセイを含んでいてもよい。

【0318】

一部の実施形態では、本明細書に記載される捕捉プローブまたは検出プローブを含むバイオマーカープローブ（例えば、バイオマーカーシグネチャー）の任意の組合せは、本明細書に記載される捕捉プローブまたは検出プローブを含むバイオマーカープローブ（例えば、バイオマーカーシグネチャー）の任意の他のセットと組み合わせて利用されてもよい。

例示的な三重または多重（ $n \geq 3$ ）標的実体検出システム

【0319】

一部の実施形態では、本開示によって提供される（および例えば、単一実体レベルで例えば、肺がんに関連するナノ粒子を検出するために有用な）標的実体検出システムは、別個の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）の n 集団を含んでいてもよく、ここで、 $n \geq 3$ である。例えば、一部の実施形態では、 $n = 3$ である場合に、標的実体検出システムは、第1の標的のための第1の検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）、第2の標的のための第2の検出プローブの集団（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）、および第3の標的のための第3の検出プローブの集団（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）を含んでいてもよい。

【0320】

図13は、単一実体レベルで、3つの別個の分子標的を含む目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、ナノ粒子）を検出するための例示的な三重標的実体検出システムを図示する。第1の検出プローブは、第1の標的結合部分（例えば、抗がんマーカー1抗体剤）、および第1の標的結合部分にカップリングされた第1のオリゴヌクレオチドドメインを含み、第1のオリゴヌクレオチドドメインは、第1の二本鎖部分、および第1のオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた第1の一本鎖オーバーハングを含む。図13に示されるように、第1のオリゴヌクレオチドドメインは、より長い鎖（鎖8）およびより短い鎖（鎖1）のハイブリダイゼーションから生じ、それによって、二本鎖部分、および一方の末端で一本鎖オーバーハングを形成してもよい。一部の実施形態では、第1の標的結合部分（例えば、抗がんマーカー1抗体剤）は、第1のオリゴヌクレオチドドメインの鎖（例えば、鎖1）の5'末端にカップリングされる（例えば、共有結合的にカップリングされる）。一部の実施形態では、第1の標的結合部分にカップリングされた鎖の5'末端は、リンカーで改変されていてもよい（例えば、スパーサー基ありまたはなしで、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）。一部の実施形態では、第1のオリゴヌクレオチドドメインの別の鎖（例えば、鎖8）の5'末端は、遊離リン酸基を有する。

【0321】

図13に表される実施形態では、第2の検出プローブは、第2の標的結合部分（例えば、抗がんマーカー3抗体剤）、および第2の標的結合部分にカップリングされた第2のオリゴヌクレオチドドメインを含み、第2のオリゴヌクレオチドドメインは、第2の二本鎖部分、および第2のオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた第2の一本鎖オーバーハングを含む。図13に示されるように、第2のオリゴヌクレオチドドメインは、より長い鎖（鎖4）およびより短い鎖（鎖2）のハイブリダイゼーションから生じ、それによって、二本鎖部分、および一方の末端で一本鎖オーバーハングを形成してもよい。一部の実施形態では、第2の標的結合部分（例えば、抗がんマーカー3抗体剤）は、第2のオリゴヌクレオチドドメインの鎖（例えば、鎖2）の5'末端にカップリングされる（例えば、共有結合的にカップリングされる）。一部の実施形態では、第2の標的結合部分にカップリングされた鎖の5'末端は、リンカーで改変されていてもよい（例えば、スパーサー基ありまたはなしで、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）。一部の実施形態では、第2のオリゴヌクレオチドドメインの別の鎖（例えば、鎖4）の5'末端は、遊離リン酸基を有さない。

10

20

30

40

50

【0322】

第3の検出プローブは、第3の標的結合部分（例えば、抗がんマーカー2抗体剤）、および第3の標的結合部分にカップリングされた第3のオリゴヌクレオチドドメインを含み、第3のオリゴヌクレオチドドメインは、第3の二本鎖部分、および第3のオリゴヌクレオチドドメインのそれぞれの末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む。例えば、一本鎖オーバーハングは、第3のオリゴヌクレオチドドメインの鎖の一方の末端から伸びている一方で、別の一本鎖オーバーハングは、第3のオリゴヌクレオチドドメインの異なる鎖の反対側の末端から伸びている。図13に示されるように、第3のオリゴヌクレオチドドメインは、2つの鎖（例えば、鎖9および10）の部分のハイブリダイゼーションから生じ、それによって、二本鎖部分、およびそれぞれの末端で一本鎖オーバーハングを形成してもよい。例えば、一本鎖オーバーハング（3A）は、第3の検出プローブの鎖9の5'末端で形成され、鎖9の5'末端は、遊離リン酸基を有する。加えて、一本鎖オーバーハング（3B）は、同じ第3の検出プローブの鎖10の5'末端で形成され、第3の標的結合部分（例えば、抗標的2抗体剤）も、鎖10の5'末端にカップリングされる（例えば、共有結合的にカップリングされる）。一部の実施形態では、第3の標的結合部分にカップリングされた鎖（例えば、鎖10）の5'末端は、リンカーで改変されていてもよい（例えば、スパーサー基ありまたはなしで、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）。

10

【0323】

3つすべての検出プローブが、十分に近接している場合、例えば、3つすべての検出プローブが、同じ目的の実体（例えば、生物学的実体）に同時に結合する場合、（i）第3の検出プローブの一本鎖オーバーハング（例えば、3A）の少なくとも一部分は、第2の検出プローブの一本鎖オーバーハングの対応する相補的部分にハイブリダイズし、（ii）第3の検出プローブの別の一本鎖オーバーハング（例えば、3B）の少なくとも一部分は、第1の検出プローブの一本鎖オーバーハングの対応する相補的部分にハイブリダイズする。結果として、線状配置で互いにカップリングした3つすべての検出プローブを含む二本鎖複合体が、対応する一本鎖オーバーハングの直接ハイブリダイゼーションによって形成される。例えば、図13を参照されたい。

20

【0324】

提供される技術における少なくとも3つまたはそれよりも多く（ $n \geq 3$ ）の検出プローブの使用を含む一部の実施形態では、検出プローブの一本鎖オーバーハングがそれぞれ個々のパートナーにアニールして、二本鎖複合体を形成する場合、少なくとも（ $n-2$ ）の標的結合部分が、二本鎖複合体の内部部分に存在する。そのような実施形態では、二本鎖複合体の別の鎖が、任意の内部標的結合部分を含有せず、したがって、例えば、増幅および検出のために、ライゲーションされた鑄型を形成するためにライゲーション可能であるように、二本鎖複合体の一本鎖に存在する内部標的結合部分を有することが望ましい。例えば、図13（3つの検出プローブを使用する）、図14（4つの検出プローブを使用する）、および図15（ n の検出プローブを使用する）を参照されたい。

30

【0325】

二本鎖複合体の鎖が少なくとも1つまたは複数の内部標的結合部分を含む一部の実施形態では、鎖は、内部標的結合部分がカップリングされた検出プローブのオリゴヌクレオチド鎖の末端と、別の検出プローブのオリゴヌクレオチド鎖の末端との間にギャップを含む。ギャップのサイズは、鎖が核酸リガーゼの存在下でライゲーション不可能になるように十分に大きい。一部の実施形態では、ギャップは、2～8ヌクレオチドのサイズまたは2～6ヌクレオチドのサイズであってもよい。一部の実施形態では、ギャップは、6ヌクレオチドのサイズである。一部の実施形態では、重複（一本鎖オーバーハング間のハイブリダイゼーション領域）は、2～15ヌクレオチドの長さまたは4～10ヌクレオチドの長さであり得る。一部の実施形態では、重複（一本鎖オーバーハング間のハイブリダイゼーション領域）は、8ヌクレオチドの長さである。ギャップおよび／またはハイブリダイゼーション領域のサイズは、ライゲーションされた鑄型（内部標的結合部分を含まない）お

40

50

よびライゲーションされていない鑄型（少なくとも1つの内部標的結合部分を含む）から最適なシグナル分離を提供するように選択される。図13～15は、目的の実体（例えば、生物学的実体）への検出プローブの結合を示していないが、二本鎖複合体（例えば、ライゲーションが起こる前）が、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含むことができ、少なくとも3つまたはそれよりも多くの標的結合部分が、目的の実体に同時に結合することに留意すべきである。

【0326】

一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システム（例えば、本明細書に記載される二重、三重または多重標的実体検出システム）における使用のための検出プローブの組合せ（例えば、セット）の選択（例えば、検出プローブおよび／または特異的バイオマーカーの数）は、例えば、特定の適用に最適であると思われる所望の特異度および／または所望の感度に基づく。例えば、一部の実施形態では、検出プローブの組合せは、肺がんの検出（例えば、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅲ、またはⅣについて）のために、例えば、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも95%またはそれよりも高い特異度を提供するように選択される。一部の実施形態では、検出プローブの組合せは、肺がんの検出（例えば、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅲ、またはⅣについて）のために、例えば、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも30%またはそれよりも高い感度を提供するように選択される。一部の実施形態では、検出プローブの組合せは、肺がんの検出（例えば、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅲ、またはⅣについて）のために、例えば、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも8%またはそれよりも高い陽性予測値を提供するように選択される。一部の実施形態では、検出プローブの組合せは、肺がんの検出（例えば、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅲ、またはⅣについて）のために、例えば、少なくとも3%、少なくとも4%、少なくとも5%、少なくとも6%、少なくとも7%、少なくとも8%、少なくとも9%、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、またはそれよりも高いを含んで、少なくとも2%またはそれよりも高い陽性予測値を提供するように選択される。一部の実施形態では、検出プローブの組合せは、肺がんの検出（例えば、ステージⅠ、Ⅱ、Ⅲ、またはⅣについて）のために、例えば、 7×10^6 EV/mL 試料未満、 6×10^6 EV/mL 試料未満、 5×10^6 EV/mL 試料未満、 4×10^6 EV/mL 試料未満、 3×10^6 EV/mL 試料未満、 2×10^6 EV/mL 試料未満、 1×10^6 EV/mL 試料未満、またはそれよりも低いを含んで、 1×10^7 EV/mL 試料未満またはそれ未満の検出限界（LOD）を提供するように選択される。一部の実施形態では、そのような肺がん検出アッセイは、例えば、肺腺癌、小細胞肺がん、扁平上皮細胞および移行細胞肺がん、大細胞肺がん、非小細胞癌肺がん、他の既定された肺がん癌種、肺がん肉腫、ならびに他の既定された種類の当技術分野において公知の肺がん（SEER Cancer Statistics Review 1975-2017）を含む、肺がんの異なるサブタイプを検出するために使用されてもよい。一部の実施形態では、そのような肺がん検出アッセイは、上皮起源の肺がんを検出するために使用されてもよい。一部の実施形態では、そのような肺がん検出アッセイは、非小細胞肺がん（例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌）を検出するために使用されてもよい。一部の実施形態では、そのような肺がん検出アッセイは、肺腺癌を検出するために使用されてもよい。一部の実施形態では、そのような肺がん検出アッセイは、肺扁平上皮細胞癌を検出するために使用されてもよい。

【0327】

一部の実施形態では、個々の検出プローブではなく、検出プローブの組合せ（例えば、

セット)は、疾患、障害、または状態(例えば、本明細書に記載される特定の肺がんおよび／または肺がんのステージ)の検出に対する特異度を付与し、例えば、1つまたは複数の個々のプローブは、それ自身が、肺がんの特異的ではない標的を対象にしてもよい。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システム(例えば、本明細書に記載される二重、三重または多重標的実体検出システム)における検出プローブの有用な組合せは、関連する疾患、障害、または状態に特異的な標的(すなわち、関連する疾患、障害、または状態に特異的な標的)を対象にする少なくとも1つの検出プローブを含んでいてもよく、関連する疾患、障害、または状態に、必ずしもまたは完全に特異的ではない(例えば、健康である一部または全部の細胞においても見出され得る、特定の疾患、障害、もしくは状態のものではない、および／または目的の特定の疾患ステージのものではない)標的を対象にする少なくとも1つの検出プローブをさらに含んでいてもよい。すなわち、本明細書を読む当業者に認識されるであろうように、本発明に従って利用される検出プローブのセットが、関連する疾患、障害、もしくは状態の検出について一緒に特異的である(すなわち、関連する疾患、障害、または状態と関連する検出のための生物学的実体を、検出のための目的ではない他の生物学的実体から十分に識別する)多数の個々の検出プローブであるか、またはそれを含む限り、セットは、本開示のある特定の実施形態に従って有用である。

10

【0328】

一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システム(例えば、本明細書に記載される二重、三重または多重標的実体検出システム)は、少なくとも1つまたは複数の(例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多く)の対照プローブを、(例えば、一部の実施形態では、疾患特異的バイオマーカー、例えば、がん特異的バイオマーカーおよび／または組織特異的バイオマーカーを認識するために、例えば、本明細書において記載されるおよび／または利用される、標的的特異的検出プローブに加えて)含み得る。一部の実施形態では、対照プローブは、目的の実体(例えば、生物学的実体)へのその結合が、検出シグナルの生成を阻害する(完全に、または部分的に)ように設計される。

20

【0329】

一部の実施形態では、対照プローブは、対照結合部分、および対照結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメイン(例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り)を含み、オリゴヌクレオチドドメインは、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハングを含む。対照結合部分は、対照参照に結合する実体または部分である。一部の実施形態では、対照参照は、正常で健康な細胞に優先的に会合するバイオマーカーであり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、対照参照は、非標的組織から優先的に会合するバイオマーカーであり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、対照プローブの包含は、偽陽性(例えば、対照参照を、必要に応じて、検出される1つまたは複数の標的と組み合わせて含む目的の実体)から生成する検出可能なシグナルを選択的に除去または最小化することができる。それぞれの出願の内容全体が、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、両方とも2020年2月28日に出願され、「標的実体の検出のためのシステム、組成物、および方法」という名称の米国特許出願第16／805,637号(US2020／0299780号として公開；US11,085,089号として発行)、および国際出願PCT／US2020／020529号(WO2020180741号として公開)に記載される他の対照プローブは、提供される標的実体検出システムにおいて有用であり得る。

30

40

【0330】

一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、本明細書で記載されるまたは利用される検出プローブが、固体基材表面に非特異的に結合し得、それらの一部が、任意の過剰なまたは未結合検出プローブを除去するための複数回の洗浄の後でさえアッセイ試料中に残り得る、およびそのような非特異的に結合した検出プローブが、ライゲーション反応において、固体基材表面から外れ、浮遊性になり得、このようにして、それらが互いと相互作用

50

用して、望ましくないバックグラウンドシグナルを生成する非特異的なライゲーシオンされた鑄型を生成することを可能にするという洞察を提供する。したがって、一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システム（例えば、本明細書に記載される二重、三重、または多重標的実体検出）は、目的の実体に結合しないが、ライゲーシオン反応において遊離薬剤として残る残った検出プローブを捕捉し、それによって、そのような浮遊性検出プローブが、他の浮遊性相補的検出プローブと相互作用して、望ましくないバックグラウンドシグナルを生成することを防止するように設計された、少なくとも1つまたは複数（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多く）の阻害剤オリゴヌクレオチドを含み得る。一部の実施形態では、阻害剤オリゴヌクレオチドは、検出プローブ（例えば、本明細書に記載されるまたは利用されるもの）の一本鎖オーバーハングのための結合ドメインを含む一本鎖もしくは二本鎖オリゴヌクレオチドであってもよく、またはそれを含んでいてもよく、阻害剤オリゴヌクレオチドは、プライマー結合部位を含まない。阻害剤オリゴヌクレオチドにおけるそのようなプライマー結合部位の非存在は、阻害剤オリゴヌクレオチドへの検出可能なプローブのライゲーシオンから生じる非特異的なライゲーシオンされた鑄型にプライマーが結合するのを防止し、それによって、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応による、非特異的なライゲーシオンされた鑄型の増幅および／または検出を低減または阻害する。

10

【0331】

一部の実施形態では、阻害剤オリゴヌクレオチドは、検出プローブ（例えば、本明細書に記載されるまたは利用される通り）の一本鎖オーバーハングのための結合ドメインを含み、結合ドメインは、相補的一本鎖オーバーハングを有する遊離の未結合検出プローブが阻害剤オリゴヌクレオチドの結合ドメインに結合することができるように、検出プローブの一本鎖オーバーハングに実質的に相補的であるヌクレオチド配列であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、阻害剤オリゴヌクレオチドは、一方の末端にヘアピンを有していてもよい。一部の実施形態では、阻害剤オリゴヌクレオチドは、一方の末端に検出プローブの一本鎖オーバーハングのための結合ドメインを含む一本鎖オリゴヌクレオチドであってもよく、一本鎖オリゴヌクレオチドの一部は、自己ハイブリダイズして、別の末端でヘアピンを形成することができる。

20

【0332】

一部の実施形態では、本明細書に提供される標的実体検出システム（例えば、本明細書に記載される二重、三重または多重標的実体検出システム）は、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインを別の検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインと会合させるコネクタオリゴヌクレオチドを含まない。一部の実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、それらが目的の実体に結合した場合に、そうでなければ互いと相互作用しないであろう任意の2つの検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインを架橋するように設計される。一部の実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインの少なくとも一部分、および別の検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインの少なくとも一部分とハイブリダイズするように設計される。コネクタオリゴヌクレオチドは、一本鎖、二本鎖、またはその組合せであってもよい。コネクタオリゴヌクレオチドは、任意の標的結合部分（例えば、本明細書に記載されるおよび／または利用される通り）または対照結合部分を含まない。少なくとも一部の実施形態では、コネクタオリゴヌクレオチドは、検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインを間接的に接続するために必ずしも必要ではなく、一部の実施形態では、一部では、本明細書で提供されるおよび／または利用される検出プローブが、それらが十分に近接している場合に、例えば、検出プローブが目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）に同時に結合する場合に、それらの個々のオリゴヌクレオチドドメインが互いに到達し、相互作用するような十分な長さを有するように設計されていることを理由として、そのようなコネクタオリゴヌクレオチドは利用されない。

30

40

【0333】

提供される標的実体検出システムを使用する方法

50

提供される標的実体検出システムは、肺がんの検出と関連するさまざまな適用および／または目的のために、試料において（例えば、生体試料、環境試料、または他の試料において）、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を検出するのに有用である。したがって、本明細書に提供される一部の態様は、本開示に従った使用のために適切な多数（例えば、少なくとも2、少なくとも3、またはそれよりも多く）の検出プローブを使用する方法に関する。一部の実施形態では、方法は、試料（例えば、ヒト対象からの、生体試料、例えば、血液由来試料）における目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を、少なくとも2またはそれよりも多く（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、またはそれよりも多くを含む）の本明細書に記載されるおよび／または利用される検出プローブを含む検出プローブのセットと接触させるステップを含む。一部の実施形態では、方法は、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含む試料を、標的実体検出システム（例えば、本明細書に提供される通り）に付すステップを含む。多数の検出プローブ（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多い）を、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含む試料に、同じ時に、または異なる時に（例えば、連続的に）添加することができる。一部の実施形態では、方法は、多数の検出プローブと接触させる前に、目的の実体を含む試料を、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする少なくとも1つの捕捉剤と接触させるステップを含んでいてもよい。

10

20

【0334】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される方法における使用のための提供される標的実体検出システムは、検出プローブ（例えば、本明細書に記載される通り）の多数（例えば、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、またはそれよりも多く）の別個のセット（例えば、組合せ）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、方法は、試料（例えば、ヒト対象からの生体試料、例えば、血液由来試料）における目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を、検出プローブの多数のセットと接触させるステップを含み、それぞれのセットは、少なくとも2またはそれよりも多く（例えば、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、少なくとも17、少なくとも18、少なくとも19、少なくとも20、またはそれよりも多くを含む）の本明細書に記載されるおよび／または利用される検出プローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、方法は、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含む試料を、標的実体検出システム（例えば、本明細書に提供される通り）に付すステップを含む。多数の検出プローブおよび／または検出プローブの組合せ（例えば、少なくとも2つまたはそれよりも多い）を、目的の実体（例えば、生物学的実体、例えば、細胞外小胞）を含む試料に、同じ時に、または異なる時に（例えば、連続的に）添加することができる。一部の実施形態では、方法は、多数の検出プローブと接触させる前に、目的の実体を含む試料を、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする少なくとも1つの捕捉剤と接触させるステップを含んでいてもよい。

30

40

【0335】

一部の実施形態では、試料における1つまたは複数のバイオマーカーの組合せのプロファイリングからの結果（例えば、Ct値および／またはライゲーションされた核酸鋳型（例えば、ライゲーションされたDNA鋳型）の相対数）間の関係を、臨床情報（例えば、限定されるものではないが、患者の年齢、過去の病歴、X線の結果、喫煙歴などを含む）

50

および／または他の情報と組み合わせて、肺がんを有するか、またはそのリスクがある患者をより良好に分類することができる。さまざまな分類アルゴリズムを使用して、複数の変数間の関係を解釈して、アッセイの感度および／または特異度を増加させることができる。一部の実施形態では、そのようなアルゴリズムとしては、限定されるものではないが、ロジスティック回帰モデル、サポートベクターマシン、勾配ブースティングマシン、ランダムフォレストアルゴリズム、Naive Bayes アルゴリズム、K 近傍アルゴリズム、およびその組合せが挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に記載されるアッセイの性能（例えば、精度）は、例えば、バイオマーカーの組合せの選択（例えば、本明細書に記載される通り）、アルゴリズムを含む他の因子もしくは変数（例えば、臨床情報および／または生活様式情報、例えば、喫煙歴）の選択、および／またはアルゴリズム自体の種類の選択によって改善することができる。

10

【0336】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される技術は、本明細書に記載されるデータセットを使用して訓練および検証される予測アルゴリズムを利用する。ある特定の実施形態では、本明細書に記載される技術は、バイオマーカーシグネチャー（例えば、本明細書に記載される通り）を含む、少なくとも2つ、例えば、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、または5つよりも多くの別々のアッセイからの結果を考慮して設計される試料の訓練から作出されるアルゴリズムを使用して、リスクスコアを作成するために利用される。ある特定の実施形態では、アルゴリズム作成リスクスコアは、少なくとも一部では、少なくとも1つの個々のアッセイ（例えば、個々のバイオマーカーシグネチャー）からの診断データ（例えば、生および／または正規化 Ct 値）を使用して作成することができる。ある特定の実施形態では、参照閾値は、リスクスコア内に含まれ得る。ある特定の実施形態では、肺がんリスクの複数の異なる程度を表す複数の閾値レベルが、リスクスコアに含まれていてもよい。一部の実施形態では、別々の標的バイオマーカーシグネチャーアッセイは、一連のアッセイにおいて個々のアッセイとして行われてもよく、個々のアッセイは、予測アルゴリズムにおいて、等しくまたは異なって重み付けされてもよい。一部の実施形態では、例えば、アルゴリズムにおいて組み合わされる個々のアッセイ（例えば、バイオマーカーアッセイのコホート）の重み付けは、限定されるものではないが、個々のアッセイの感度、個々のアッセイの特異度、個々のアッセイの再現性、個々のアッセイの変動性、個々のアッセイの陽性予測値、および／または特異的なアッセイの検出下限を含む、いくつかの因子によって決定されてもよい。一部の実施形態では、バイオマーカーアッセイのコホートは、特徴（例えば、感度、特異度、検出下限など）に従ってランク付けされてもよく、次いで、バイオマーカーアッセイは、それらの相対ランクに基づいて重み付けされてもよい。

20

30

【0337】

一部の実施形態では、アルゴリズム（本明細書に記載される通り）によって作成されたリスクスコアを、好適な様式で、例えば、名目上のスケールで、例えば、限定されるものではないが、対象が肺がんを有する可能性、対象が肺がんを発生する可能性、および／または肺がんの可能性のあるステージを含む、例えば、いくつかの可能性を反映する0～100のスケールで表すことができる。一部の実施形態では、より高いリスクスコアは、疾患の病状の可能性の増加が存在することを実証することができ、例えば、より低い値からより高い値に、健康な対照、良性対照、ステージⅠ、ステージⅡ、ステージⅢ、およびステージⅣの肺がんを反映し得る。一部の実施形態では、リスクスコアは、他のがん型と比較される場合に、本明細書に記載される技術の交差反応性の可能性を低減するために利用することができる。

40

【0338】

一部の実施形態では、リスクスコアは、年齢、生活歴、X線結果、MRI結果、低線量CTスキャン、またはその任意の組合せなどの他の適用可能な診断データと組み合わせた、本明細書に記載されるアッセイに由来するデータの組合せから作成されてもよい。一部の実施形態では、リスクスコアは、従来の標準治療診断アッセイの予測値を上回り、

50

それを超える予測値、例えば、単独で、または別の診断アッセイとの組合せで利用される、低線量CTスキャニングアッセイが提供する予測値よりも高い予測値を提供する。一部の実施形態では、肺がん（例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌）について高い特異度を有し、他のがんについて低い感度を有するリスクスコアが作成され得る。

【0339】

一部の実施形態では、リスクスコアは、肺がんの検出のための関連臨床カットオフを有していてもよい。例えば、一部の実施形態では、検出のためのリスクスコアの臨床カットオフは、初期および末期肺がんの両方の検出のために少なくとも40%、例えば、少なくとも50%、少なくとも60%、またはそれより高い感度をもたらし、一般的に健康な対象の集団（例えば、20～89歳）において、または遺伝的リスクを有する対象の集団において、最低でも90%の特異度、例えば、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれより高い特異度を有する、アッセイを必要とし得る。一部の実施形態では、感度および特異度の標的は、標的にされる77%の感度および99.5%の特異度での両側95%信頼区間の近似下限である。

【0340】

一部の実施形態では、訓練研究は、リスクスコアアルゴリズムをプログラムするために要求される必要なデータを提供するために行われる。一部の実施形態では、そのような訓練研究は、少なくとも商業的供給者、バイオバンク、目的駆動研究、および／または医師を含む、ある範囲の供給者からの試料のコホートを含んでいてもよい。一部の実施形態では、訓練研究は、肺腺癌および／もしくは肺扁平上皮細胞癌のがん患者（例えば、ステージI、ステージII、ステージIII、および／またはステージIV）からの陽性試料、ある特定の肺がん細胞株からの陽性対照試料、良性肺腫瘍患者からの陰性試料、非肺がん患者（例えば、脳がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓がん、皮膚がんなど）からの陰性試料、炎症状態患者（例えば、クローン病、子宮内膜症、II型糖尿病、紅斑性狼瘡、肺炎、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患など）からの陰性試料、健康な患者からの陰性試料、またはその任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、訓練研究は、任意の適切な年齢範囲、例えば、<31歳、31～40歳、41～50歳、51～60歳、61～70歳、71～80歳、または>80歳の患者からの試料を含んでいてもよい。一部の実施形態では、訓練研究は、任意の人種／民族／血統（例えば、白人、アフリカ系、アジア系など）の患者からの試料を含んでいてもよい。

【0341】

一部の実施形態では、検証研究は、リスクスコアアルゴリズムの有用性を確認するために要求される必要なデータを提供するために行われる。一部の実施形態では、そのような検証研究は、少なくとも商業的供給者、バイオバンク、目的駆動研究、および／または医師を含む、ある範囲の供給者からの試料のコホートを含んでいてもよい。一部の実施形態では、検証研究は、肺腺癌および／もしくは肺扁平上皮細胞癌のがん患者（例えば、ステージI、ステージII、ステージIII、および／またはステージIV）からの陽性試料、ある特定の肺がん細胞株からの陽性対照試料、良性肺腫瘍患者からの陰性試料、非肺がん患者（例えば、脳がん、乳がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、卵巣がん、黒色腫、非ホジキンリンパ腫、膵臓がん、皮膚がんなど）からの陰性試料、炎症状態患者（例えば、クローン病、子宮内膜症、II型糖尿病、紅斑性狼瘡、肺炎、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、慢性閉塞性肺疾患など）からの陰性試料、健康な患者からの陰性試料、またはその任意の組合せを含んでいてもよい。一部の実施形態では、検証研究は、任意の適切な年齢範囲、例えば、<31歳、31～40歳、41～50歳、51～60歳、61～70歳、71～80歳、または>80歳の患者からの試料を含んでいてもよい。一部の実施形態では、検証研究は、任意の人種／民族／血統（例えば、白人、アフリカ系、アジア系など）の患者からの試料を含んでいてもよい。

【0342】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの表面バイオマーカー（例えば、細胞外小胞関連表面バイオマーカー）および少なくとも1つ（例えば、少なくとも2つ、またはそれよりも多くを含む）の標的バイオマーカー（本明細書に記載される表面バイオマーカー、本明細書に記載される小胞内バイオマーカー、および／または本明細書に記載される小胞内RNAバイオマーカーのいずれかから選択され得る）を含む少なくとも1つの標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がん検出アッセイにおいて具現化されてもよい。一部のそのような実施形態では、少なくとも1つの捕捉剤は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にし、検出プローブの少なくとも1つのセットは、本明細書に記載されるそのような標的バイオマーカーの1つまたは複数を対象にする。例えば、図5～7は、標的バイオマーカーシグネチャーのある特定の例を開示し、そのそれぞれは、肺がん検出アッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）において具現化されてもよい。

10

【0343】

ある特定の実施形態では、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーおよび少なくとも1つ（例えば、少なくとも2つ、またはそれよりも多くを含む）の標的バイオマーカー（本明細書に記載される表面バイオマーカー、本明細書に記載される小胞内バイオマーカー、および／または本明細書に記載される小胞内RNAバイオマーカーのいずれかから選択され得る）をそれぞれ含む少なくとも2つ（例えば、少なくとも3つまたはそれよりも多くを含む）の別個の標的バイオマーカーシグネチャーは、肺がん検出アッセイにおいて具現化されてもよい。一部の実施形態では、それぞれ別個の標的バイオマーカーシグネチャーは、試料が肺がんについて陽性であるかどうかを個々に決定するための異なる事前に決定されたカットオフ値を有していてもよい。一部の実施形態では、アッセイ読み取りが、多数（例えば、少なくとも2またはそれよりも多く）の標的バイオマーカーシグネチャーについてのカットオフ値のうちの少なくとも1つを上回る場合に、試料は、肺がんについて陽性であると決定される。一部の実施形態では、カットオフ値（例えば、少なくとも2、少なくとも3、またはそれよりも多い）の組合せは、結果的に改善された感度および／または特異度で、診断値を作出するために利用することができる。

20

【0344】

したがって、一部の実施形態では、試料は、異なる捕捉剤および／または検出プローブの異なるセット（例えば、別個の疾患または状態の検出をそれぞれ対象にする）を異なるアリコートに添加することができるように、アリコートに分割することができる。そのような実施形態では、提供される技術は、同時に1つのアリコートで、または同時に複数のアリコートで（例えば、スループットを増加させるために平行アッセイのために）実行することができる。

30

【0345】

一部の実施形態では、試料に添加される検出プローブの量は、検出プローブが、目的の実体（例えば、生物学的実体）への結合の非存在下で、少なくともあまり大きなまたは実質的な程度ではなく、互いと無作為に近接しないことを保証するために、混合物における検出プローブの十分に低い濃度を提供する。そのため、多くの実施形態では、検出プローブが、検出プローブの個々の標的結合部分と目的の実体（例えば、生物学的実体）の結合部分との間の結合相互作用により、同じ目的の実体（例えば、生物学的実体）に同時に結合する場合に、検出プローブは、二本鎖複合体（例えば、本明細書に記載される通り）を形成するために互いに十分に近接する状態になる。一部の実施形態では、試料との組合せ後の混合物における検出プローブの濃度は、約1 fM～1 μ M、例えば、約1 pM～約100 nMを含めて、約1 pM～約1 nMの範囲であってもよい。

40

【0346】

一部の実施形態では、試料における目的の実体（例えば、生物学的実体）の濃度は、個々の検出プローブの同じ目的の実体（例えば、生物学的実体）への結合の非存在下で、ある目的の実体（例えば、生物学的実体）に結合する検出プローブが、別の目的の実体（例えば、生物学的実体）に結合する別の検出プローブと、少なくともあまり大きなまたは実質的な程度ではなく、互いと無作為に近接しないように、十分に低い。単に例として、試

50

料における目的の実体（例えば、生物学的実体）の濃度は、目的の非標的実体（例えば、非がん性生物学的実体、例えば、第1の標的を含む細胞外小胞）に結合している第1の標的検出プローブが、目的の別の非標的実体（例えば、非がん性生物学的実体、例えば、細胞外小胞）に結合する別の異なる標的検出プローブと、少なくともあまり大きなまたは実質的な程度ではなく、無作為に近接せず、偽陽性の検出可能なシグナルを生成しないように、十分に低い。

【0347】

試料における目的の実体（例えば、生物学的実体）を検出プローブのセットと接触させた後、そのような混合物は、検出プローブが、存在する場合、目的の実体における対応する標的（例えば、分子標的）に結合して、二本鎖複合体（例えば、本明細書に記載される通り）を形成するために十分な時間にわたってインキュベートされてもよい。一部の実施形態では、そのような混合物は、約30分～約2時間を含んで、約5分～約5時間の範囲の時間、約20℃～約37℃を含んで、約10～約50℃の範囲の温度でインキュベートされる。

10

【0348】

次いで、二本鎖複合体（目的の実体、例えば、生物学的実体を検出プローブと接触させるステップから生じる）を、その後、核酸リガーゼと接触させて、検出プローブのオリゴヌクレオチド鎖の遊離3'末端ヒドロキシルおよび5'末端リン酸末端の核酸ライゲーションを行い、それによって、少なくとも2つまたはそれよりも多くの検出プローブのオリゴヌクレオチド鎖を含むライゲーションされた鑄型を作成することができる。一部の実施形態では、二本鎖複合体を含むアッセイ試料を核酸リガーゼと接触させる前に、阻害剤オリゴヌクレオチドが、そうでなければライゲーション反応の間に互いと相互作用し得る任意の残った浮遊性検出プローブを捕捉することができるよう、少なくとも1つまたは複数の阻害剤オリゴヌクレオチド（例えば、本明細書に記載される通り）をアッセイ試料に添加することができる。

20

【0349】

当技術分野において公知であるように、リガーゼは、2つのすぐ隣接する核酸が、それらが相補的である第3の核酸配列にアニールまたはハイブリダイズされる場合に、それらの並置された3'-ヒドロキシルと5'-リン酸末端との間でのホスホジエステル結合の形成を触媒する。限定されるものではないが、温度感受性および／または熱安定性リガーゼを含む、任意の公知の核酸リガーゼ（例えば、DNAリガーゼ）が用いられてもよい。温度感受性リガーゼの非限定的な例としては、バクテリオファージT4 DNAリガーゼ、バクテリオファージT7リガーゼ、およびE. coliリガーゼが挙げられる。熱安定性リガーゼの非限定的な例としては、Taqリガーゼ、Tthリガーゼ、およびPfuリガーゼが挙げられる。熱安定性リガーゼは、限定されるものではないが、原核生物、真核生物、または古細菌生物を含む、好熱性または超好熱性生物から得てもよい。一部の実施形態では、核酸リガーゼは、DNAリガーゼである。一部の実施形態では、核酸リガーゼは、RNAリガーゼであり得る。

30

【0350】

一部の実施形態では、ライゲーションステップでは、必要であり、および／または望ましい好適な核酸リガーゼ（例えば、DNAリガーゼ）および任意の試薬を反応混合物と混ぜ合わせ、ハイブリダイズされたライゲーションオリゴヌクレオチドのライゲーションが起こるのに十分な条件下で維持する。ライゲーション反応条件は、当業者に周知である。ライゲーションの間、反応混合物は、一部の実施形態では、約20℃～約45℃、例えば、約25℃～約37℃の範囲の温度で、約5分～約16時間、例えば、約1時間～約4時間の範囲の時間、維持されてもよい。さらに他の実施形態では、反応混合物は、約35℃～約45℃、例えば約37℃～約42℃の範囲の温度、例えば、38℃、39℃、40℃もしくは41℃、または約38℃、約39℃、約40℃もしくは約41℃の温度で、約5分～約16時間、例えば、約2～約8時間を含んで、約1時間～約10時間の範囲の時間、維持されてもよい。

40

50

【0351】

そのようなライゲーションされた鑄型の検出は、試料における目的の実体（例えば、生物学的実体）が、検出プローブが対象にする標的について陽性または陰性であるかどうかのような情報を提供することができる。例えば、そのようなライゲーションされた鑄型の検出可能なレベルは、目的の標的（例えば、分子標的）を含む試験された目的の実体（例えば、生物学的実体）を示す。一部の実施形態では、検出可能なレベルは、参照レベルを、例えば、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、またはそれよりも高くを含んで、例えば、少なくとも10%またはそれよりも高く上回るレベルである。一部の実施形態では、参照レベルは、陰性対照試料、例えば、そのような標的を含む目的の実体が存在しない試料において観察されるレベルであってもよい。逆に、そのようなライゲーションされた鑄型の検出不可能なレベル（例えば、検出可能なレベルの閾値を下回るレベル）は、目的の標的（例えば、分子標的）の少なくとも1つが、試験された目的の実体（例えば、生物学的実体）に存在しないことを示す。当業者は、検出可能なレベルを検出不可能なレベルから分離する閾値が、例えば、それぞれの適用および／または目的に最適であると思われる所望の感度レベル、および／または所望の特異度レベルに基づいて決定されてもよいことが認識されるであろう。例えば、一部の実施形態では、99.7%の特異度は、本明細書に提供されるシステムを使用して、例えば、参照レベル（例えば、陰性対照試料、例えば、1つまたは複数の正常で健康な個体に由来する試料などにおいて観察されるレベル）を3標準偏差上回る閾値を設定することによって達成され得る。加えて、または代替的に、当業者は、検出可能なレベル（例えば、検出シグナル強度によって反映される通り）の閾値が参照レベルを1～100倍上回り得ることを認識するであろう。

10

20

【0352】

一部の実施形態では、本明細書に提供される方法は、ライゲーション後、ライゲーションされた鑄型を、例えば、試料における目的の実体の存在および／または量の尺度として検出するステップを含む。さまざまな実施形態では、ライゲーションされた鑄型の検出は、定性的または定量的であり得る。そのため、検出が定性的である一部の実施形態では、方法は、少なくとも2つまたはそれよりも多くの標的（例えば、分子標的）を含む目的の実体（例えば、生物学的実体）が、アッセイされる試料に存在するか否かの読み取りまたは評価、例えば、査定を提供する。他の実施形態では、方法は、少なくとも2つまたはそれよりも多くの標的（例えば、分子標的）を含む目的の実体（例えば、生物学的実体）が、アッセイされる試料に存在かどうかの定量的検出、例えば、アッセイされる試料に少なくとも2つまたはそれよりも多くの標的（例えば、分子標的）を含む目的の実体（例えば、生物学的実体）の実際の量の評価または査定を提供する。一部の実施形態では、そのような定量的検出は、絶対的または相対的であり得る。

30

【0353】

本明細書に提供される技術を使用することによって形成されるライゲーションされた鑄型は、当技術分野において公知の適切な方法によって検出されてもよい。当業者は、適切な検出方法が、例えば、所望の感度レベルおよび／または方法が実行されている適用に基づいて選択され得ることを認識するであろう。一部の実施形態では、ライゲーションされた鑄型は、任意の増幅なしで、直接的に検出することができる一方で、他の実施形態では、ライゲーションされた鑄型は、ライゲーションされた鑄型のコピー数が、例えば、特定のアッセイの感度を増強するために、増加するように、増幅されてもよい。増幅なしで検出が実行可能である場合、ライゲーションされた鑄型は、いくつかの異なる方法で検出され得る。例えば、検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）のオリゴヌクレオチドドメインは、ライゲーションされた鑄型が直接的に標識されるように、直接的に標識されてもよく、例えば、蛍光または放射性同位体標識されてもよい。例えば、一部の実施形態では、検出プローブ（例えば、本明細書で記載されるおよび／または利用される通り）のオリゴヌクレオチドドメインは、検出可能な標識を含んで

40

50

いてもよい。検出可能な標識は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的または化学的手段によって検出可能な組成物であってもよい。そのような標識としては、標識されたストレプトアビジンコンジュゲートで染色するためのビオチン、磁気ビーズ（例えば、Dyna beads（登録商標））、蛍光色素（例えば、フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{34}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（例えば、E L I S Aにおいて通常使用される、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼなど）、およびコロイド金、または着色ガラスもしくはプラスチック（例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズなどの熱量標識が挙げられる。一部の実施形態では、直接的に標識された、ライゲーションされた鑄型は、ライゲーションされた鑄型を検出するために、ライゲーションされていない直接的に標識されたライゲーションオリゴヌクレオチドを含む反応混合物の残りからサイズ分離されてもよい。

10

【0354】

一部の実施形態では、ライゲーションされた鑄型の検出は、例えば、アッセイの感度を増強するために、ライゲーションされた核酸のコピー数を増加させる増幅ステップを含み得る。増幅は、所望により、線形または指数関数的であってもよく、増幅としては、限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、定量的PCR、等温増幅、NASBA、デジタルドロップレットPCRなどが挙げられ得る。

【0355】

PCR増幅を達成するためのさまざまな技術が当技術分野において公知であり、当業者は、PCR技術の各種の実施形態に十分に精通しており、本明細書に提供される技術を使用して作成されるライゲーションされた鑄型を増幅するために好適なものを容易に選択することができるであろう。例えば、一部の実施形態では、ライゲーションされた鑄型を含む反応混合物は、プライマー伸長反応において用いられる1つまたは複数のプライマー、例えば、PCRプライマー（幾何学的（または指数関数的）増幅において用いられるフォワードおよびリバースプライマー、または線形増幅において用いられる単一プライマーなど）と混ぜ合わされる。1つまたは複数のライゲーションされた鑄型と接触されるオリゴヌクレオチドプライマーは、適切なアニリング条件下で相補的鑄型DNAへのハイブリダイゼーションを提供するのに十分な長さのものでなければならない。プライマーは、典型的には、例えば、少なくとも15bpの長さ、少なくとも20bpの長さ、少なくとも25bpの長さ、少なくとも30bpの長さ、またはそれよりも長いを含んで、少なくとも10bpの長さである。一部の実施形態では、プライマーの長さは、典型的には、約15～50bpの長さ、約18～30bpの長さ、または約20～35bpの長さの範囲であり得る。ライゲーションされた鑄型は、鑄型DNAのプライマー伸長、線形、または指数関数的増幅が所望されるかどうかに応じて、単一のプライマーまたは2つのプライマーのセット（フォワードおよびリバースプライマー）と接触されてもよい。

20

30

【0356】

上記の構成要素に加えて、ライゲーションされた鑄型を含む反応混合物は、典型的には、ポリメラーゼおよびデオキシリボヌクレオシド三リン酸（dNTP）を含む。所望のポリメラーゼ活性は、1つまたは複数の別個のポリメラーゼ酵素によって提供されてもよい。反応混合物を調製する際に、例えば、ライゲーションされた鑄型の増幅のために、さまざまな構成成分は、任意の便利な順序で混ぜ合わされてもよい。例えば、適切な緩衝液が、1つもしくは複数のプライマー、1つもしくは複数のポリメラーゼ、および検出されるライゲーションされた鑄型と混ぜ合わされてもよく、またはさまざまな構成成分のすべてが、同時に混ぜ合わされて、反応混合物が生成されてもよい。

40

【0357】

VI. 使用

一部の実施形態では、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーは、例えば、本明細書に記載される検出する方法および／またはアッセイを使用して、生物学的実体（例えば、細胞、循環腫瘍細胞

50

胞、無細胞DNA、ナノ粒子などを含む)を含む試料において検出することができる。一部の実施形態では、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャーの1つまたは複数の提供されるバイオマーカーは、例えば、本明細書に記載される検出する方法および／またはアッセイを使用して、ナノ粒子を含む試料において検出することができる。

【0358】

一部の実施形態では、試料は、生体試料であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、生体試料は、対象(例えば、ヒト対象)の体液由来試料である。一部の実施形態では、生体試料は、そのようなアッセイを必要とする対象(例えば、ヒト対象)の血液試料または血液由来試料に由来し得る。一部の実施形態では、生体試料は、そのようなアッセイを必要とする対象(例えば、ヒト対象)由来の一次試料(例えば、組織試料または腫瘍試料)であり得るか、またはそれを含み得る。一部の実施形態では、生体試料は、目的の非標的実体から1つもしくは複数の目的の実体(例えば、生物学的実体)を分離するために、および／または1つもしくは複数の目的の実体(例えば、生物学的実体)を濃縮するために、処理することができる。一部の実施形態では、試料に存在する目的の実体は、生物学的実体、例えば、細胞、もしくは細胞外小胞を含むサイズ範囲を有するナノ粒子(例えば、エキソソーム)であってもよく、またはそれを含んでもよい。一部の実施形態では、そのような生物学的実体(例えば、細胞外小胞)は、例えば、生物学的実体におけるアッセイされる標的(例えば、提供される標的バイオマーカー)を安定化および／もしくは架橋するために、ならびに／または検出プローブとの非特異的結合を低減するために、処理されてもよく、または化学試薬と接触されてもよい。一部の実施形態では、生物学的実体は、細胞であるか、またはそれを含み、これは、必要に応じて、例えば、標的(例えば、分子標的)を安定化および／もしくは架橋するための、ならびに／または非特異的結合を低減するための化学試薬で処理されてもよい。一部の実施形態では、生物学的実体は、細胞外小胞(例えば、エキソソーム)であるか、またはそれを含み、これは、必要に応じて、例えば、標的(例えば、分子標的)を安定化および／もしくは架橋するための、ならびに／または非特異的結合を低減するための化学試薬で処理されてもよい。

【0359】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、例えば、1人もしくは複数人の個々の対象および／または対象の集団全体について、患者ケアを管理するために有用であり得る。単に例として、一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、周期的に、例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考えられるいくつかの他の頻度で行われ得るスクリーニングにおいて利用されてもよい。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングは、時間的に動機付けられてもよく、または偶発的に動機付けられてもよい。例えば、一部の実施形態では、提供される技術は、ある特定の年齢よりも高齢(例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80歳を超える、またはそれよりも高齢)である1人もしくは複数人の個々の対象または対象の集団(例えば、無症候性対象)全体についての時間的に動機付けられたスクリーニングにおいて利用されてもよい。当業者に認識されるであろうように、一部の実施形態では、スクリーニングの年齢および／または頻度は、例えば、限定されるものではないが、疾患、障害、または状態(例えば、がん、例えば、肺がん)の有病率に基づいて決定されてもよい。一部の実施形態では、提供される技術は、特定の疾患、障害、または状態(例えば、がん、例えば、肺がん)についてのスクリーニングを動機付ける出来事または事象を経験し得る個々の対象のための偶発的に動機付けられたスクリーニングにおいて利用されてもよい。例えば、一部の実施形態では、疾患、障害、もしくは状態(例えば、がん、例えば、肺がん)またはそれへの易罹患性の1つまたは複数の指標の決定に関する偶発的な動機付けは、例えば、それらの家族歴に基づく出来事(例えば、血族などの近親者が以前にそのような疾患、障害、または状態、例えば、肺がんと診断された)、疾患、障害、もしくは状態(例えば、肺がん)についての1つまたは複数の生活歴関連リスク因子の同定、

および／または遺伝子検査（例えば、ゲノムスクリーニング）からの以前の偶発的な知見、および／またはイメージング診断検査（例えば、胸部X線、または低線量CTスキャンニング）、特定の疾患、障害、もしくは状態に特徴的な1つもしくは複数の徴候または症状（例えば、慢性閉塞性肺疾患、ならびに／あるいは血痰、持続性の咳、息切れ、反復性および／もしくは慢性呼吸器感染症、胸部疼痛、説明できない体重減少、および／または疲労などの症状）の発生、良性肺腫瘍（例えば、胸部X線または低線量CTスキャンなどのイメージングにより肺で観察された良性腫瘍）およびその組合せを有する対象、ならびに／あるいは当業者によって認識されるであろう他の出来事または事象であってもよく、あるいはそれを含んでいてもよい。

【0360】

一部の実施形態では、患者ケアを管理するために提供される技術は、処置および／または支払い（例えば、処置についての払い戻し）の判断および／または行動に情報を与えることができる。例えば、一部の実施形態では、提供される技術は、個々の対象が、疾患、障害、または状態（例えば、がん、例えば、肺がん）のリスク、発生または再発の1つまたは複数の指標を有するかどうかの決定を提供し、それによって、そのような所見を考慮して、医師および／または患者に、いつ治療的もしくは予防的推奨を提供／受けるのか、および／またはそのような療法をいつ開始するかの情報を与えることができる。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、無症候性対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、肺がんに関連し得る1つまたは複数の症状を経験していてもよい。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、慢性炎症状態を有する対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、肺がんについて遺伝的リスクがある対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、生活歴関連リスクを有する対象であってもよい。一部の実施形態では、そのような個々の対象は、定期的な頻度（例えば、1年に1回、1年に2回、2年に1回、または当業者が適切であると考え他の頻度）で、スクリーニングするように一時的に動機付けられ得るか、または偶発的に動機付けられ得る、喫煙対象（例えば、ヘビースモーカー）であってもよい。

【0361】

加えて、または代替的に、一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、特異的応答性バイオマーカー（例えば、がん応答性バイオマーカー）の所見に基づいて、医師および／または患者に、処置の選択の情報を与えることができる。一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、疾患に関連する分子標的の1つまたは複数のレベルの変化の所見に基づいて、個々の対象が現在の処置に応答性であるかどうかの決定を提供し、それによって、そのような所見を考慮して、医師および／または患者に、そのような療法の有効性および／または療法を維持もしくは変更する判断の情報を与えることができる。一部の実施形態では、提供される技術は、個々の対象が、例えば、個々の対象に対する推奨される処置の治療効果を予測する分子標的（例えば、肺がんのための1つまたは複数の標的バイオマーカーシグネチャーの提供されるバイオマーカー）の所見に基づいて、推奨される処

10

20

30

40

50

置に応答する可能性があるかどうかの決定を提供し、それによって、そのような所見を考慮して、医師および／または患者に、そのような療法の潜在的有効性および／または療法を投与もしくは変更する判断の情報を与えることができる。

【0362】

一部の実施形態では、提供される技術は、例えば、（１）スクリーニングそれ自体のために（例えば、周期的／定期的なスクリーニングのためにのみ利用可能な、または時間的および／もしくは偶発的に動機付けられたスクリーニングのためにのみ利用可能な払い戻し）；ならびに／または（２）提供される技術による所見を考慮して、療法を開始する、維持する、および／もしくは変更するために、健康保険提供者が払い戻しを行う（または行わない）かどうかに関する判断を行うのに情報を提供することができる。例えば、一部の実施形態では、本開示は、（a）提供される技術を用いるスクリーニングの結果を受け取ること、ならびにスクリーニングおよび／または特定の治療レジメンの払い戻しの請求も受け取ること；（b）スクリーニングが適切なスケジュールまたは関連する出来事に対する応答に従って（例えば、ある特定の年齢よりも高齢であるなどのスクリーニング年齢、例えば、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80歳を超える、もしくはそれよりも高齢、および／またはスクリーニング頻度、例えば、3か月ごと、6か月ごと、毎年、2年ごと、3年ごと、もしくはいくつかの他の頻度などに基づいて）対象に対して行われた場合にスクリーニングの払い戻しを承認すること、および／または受け取ったスクリーニング結果を考慮して、適切な処置を表す場合に治療レジメンの払い戻しを承認すること；ならびに必要に応じて、（c）払い戻しを実行すること、または払い戻しが拒否された通知を提供することに関する方法を提供する。一部の実施形態では、治療レジメンは、受け取ったスクリーニング結果が関連する治療レジメンについて承認されたバイオマーカーを表すバイオマーカーを検出する場合に、受け取ったスクリーニング結果を考慮して、適切である（例えば、処方情報ラベルで、および／または承認されたコンパニオン診断を介して述べられ得る通り）。

【0363】

代替的に、または加えて、本開示は、本明細書に記載されるスクリーニング結果（例えば、本開示に従って作成される通り）および／または払い戻し判断の報告および／または処理を許可または容易にする報告システム（例えば、適切な電子デバイスおよび／または通信システムを介して実行される）を企図する。さまざまな報告システムが、当技術分野において公知であり、当業者は、各種のそのような実施形態に十分に精通しており、実施に好適なものを容易に選択することができるであろう。

【0364】

例示的な使用

A．肺がんの発生または再発の検出

本開示は、数ある中でも、単一生物学的実体（例えば、個々の細胞外小胞）の分解能においてよりもむしろ、バルク試料に基づく生物学的実体（例えば、ナノ粒子、例えば、細胞外小胞を含む）または多数のがん関連バイオマーカーにおける単一のがん関連バイオマーカーの検出が、典型的には、その生物学的実体が得られた対象が、がん（例えば、肺がん）を患っているか、またはそれに罹患しやすい可能性があるかどうかの決定において、十分な特異度および／または感度を提供しないことを認識する。本開示は、数ある中でも、例えば、検出のための実体（例えば、細胞外小胞）が少なくとも2つまたはそれよりも多くの標的（例えば、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの少なくとも2つまたはそれよりも多くの提供されるバイオマーカー）の組合せの存在によって特徴付けられることを特異的に必要とすることによることを含む、そのような課題を解決する組成物および／または方法を含む技術を提供する。特定の実施形態では、本開示は、そのような実体（例えば、細胞外小胞）が、がんに特異的である分子標的（すなわち、関連するがん、例えば、肺がんの「標的バイオマーカーシグネチャー」）の組合せの存在によって（例えば、発現によって）特徴付けられる一方で、標的化組合せ（例えば、標的バイオマーカーシグネチャー）を含まない生物学的実体（例えば、細胞外小胞を含む、例えば、ナノ粒

子)が、検出可能なシグナルを生成しないことを必要とする技術を教示する。したがって、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、対象におけるがんのリスク、発生、および／または再発の検出のために有用であり得る。一部のそのような実施形態では、本明細書に提供される技術は、対象における肺がんのリスク、発生、および／または再発の検出のために有用である。例えば、一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの提供されるバイオマーカーの組合せは、特異的ながん(例えば、肺がん)またはさまざまながん(その1つに肺がんが含まれる)の検出のために選択される。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供されるバイオマーカーの特異的な組合せは、そのような予測組合せを同定するために、肺がん患者生検および／または患者データの集団またはライブラリー(例えば、何十、何百、何千、何万、何十万、またはそれより多い)を分析することによって決定することができる。一部の実施形態では、関連するバイオマーカーの組合せは、例えば、データ解析を介して、同定されたおよび／または特徴付けられたものであってもよい。例えば、一部の実施形態では、データ解析は、例えば、実施例7~9に記載されるように、バイオインフォマティクス分析を含んでもよい。一部の実施形態では、例えば、多様な肺がん関連データのセット(例えば、一部の実施形態では、バルクRNAシーケンシング、単一細胞RNA(scRNA)シーケンシング、質量分析、組織診、翻訳後改変データ、in vitroおよび／またはin vivo実験データのうちの1つまたは複数を含む)は、肺がん非常に特異的な予測マーカーの組合せを同定するために、機械学習および／またはコンピューター計算モデルにより解析することができる。一部の実施形態では、がん(例えば、肺がん)のステージを識別するための予測マーカーの組合せは、異なるステージのがん(例えば、肺がん)に関する多様なデータ(例えば、一部の実施形態では、バルクRNAシーケンシング、scRNAシーケンシング、質量分析、組織診、翻訳後改変データ、in vitroおよび／またはin vivo実験データを含む)を比較することおよび解析することに基づいて、in silicoで決定することができる。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、肺がん対象を、例えば、健康な対象、良性腫瘍または胸部腫瘍を有すると診断された対象、ならびに非肺関連疾患、障害、および／または状態を有する対象(例えば、非肺がんを有する対象、または炎症状態、例えば、慢性閉塞性肺疾患、もしくは慢性肺感染症を有する対象)を含む非肺がん対象から識別するために使用することができる。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、肺がんの早期検出、例えば、ステージIまたはステージIIの肺がんの検出のために有用であり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、例えば、肺腺癌、小細胞肺がん、扁平上皮細胞および移行細胞肺がん、大細胞肺がん、非小細胞癌、他の既定された肺癌、肺肉腫、ならびに他の既定された種類の当技術分野において公知の肺がん(SEEK Cancer Statistics Review 1975-2017)を含む、1つまたは複数の肺がんのサブタイプを検出するために有用であり得る。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、初期肺がん(例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌)についての遺伝的リスク、生活歴関連リスク、または平均リスクがある個体をスクリーニングするために有用であり得る。

10

20

30

40

50

【0365】

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、単一アッセイにおいて、特異的ながんのリスク、発生、または再発について対象をスクリーニングするために有用であり得る。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、肺がんのリスク、発生、または再発について対象をスクリーニングするために有用である。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、単一アッセイにおいて、特異的ながんまたは多数(例えば、少なくとも2、少なくとも3、またはそれよりも多く)のがんのリスクまたは発生について対象をスクリーニングするために使用することができる。例えば、一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、単一アッセイにおいて、その1つが、肺がんを含み、スクリーニングされる他のがんが、脳がん(例えば、神経膠芽腫を含む)、乳がん、結腸直腸がん、膵臓がん、前立腺がん、肝臓がん、卵巣がん、および皮膚がんからなる群か

ら選択され得る、多数のがんについて対象をスクリーニングするために使用することができる。

【0366】

一部の実施形態では、提供される技術は、肺がん（例えば、初期肺がん）またはがんの再発について、ヒト対象（例えば、ヒト対象）をスクリーニングするために、周期的に（例えば、毎年、2年ごと、3年ごとなど）使用することができる。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングに適したヒト対象は、成人または高齢者であってもよい。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングに適したヒト対象は、既定の年齢よりも高齢、例えば、45歳およびそれよりも上、55歳およびそれよりも上、65歳およびそれよりも上、70歳およびそれよりも上、75歳およびそれよりも上、または80歳およびそれよりも上であってもよい。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングに適したヒト対象は、約50歳またはそれよりも上の年齢を有していてもよい。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングに適したヒト対象は、50歳またはそれよりも下の年齢を有していてもよい。一部の実施形態では、そのようなスクリーニングに適したヒト対象は、35歳を超える年齢を有していてもよい。一部の実施形態では、肺がんに対する遺伝的素因を有すると決定されているヒト対象は、家族歴リスクを有さないヒト対象よりも若い年齢でスクリーニングされてもよい。

10

【0367】

一部の実施形態では、肺がんの発生または再発の検出について提供される技術に適した対象は、一部の実施形態では、肺がんに関連する1つまたは複数の症状を経験し得る、喫煙歴を有する対象（例えば、ヘビースモーカー）であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの発生または再発の検出について提供される技術に適した対象は、良性肺腫瘍および／または1つもしくは複数の慢性炎症状態（例えば、COPD）を有すると決定されているヒト対象であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの発生または再発の検出について提供される技術に適した対象は、肺がんの家族歴を有する対象（例えば、肺がん歴を有する1人または複数人の第一度近親者を有する対象）、がん（例えば、肺がん）について以前に処置された対象、がん処置後に肺がん再発のリスクがある対象、肺がん処置後に寛解にある対象、および／または例えば、少なくとも1つの肺がんバイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）の存在についてのスクリーニングによって、肺がんについて以前にもしくは周期的にスクリーニングされている対象であってもよい。

20

30

【0368】

一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、本明細書に記載されるおよび／または利用される技術が、対象、例えば、肺がんを発生するより高い易罹患性の対象のある特定の集団をスクリーニングするために特に有用であり得るという洞察を提供する。一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、肺検出について本明細書に記載されるおよび／または利用される技術の得られるPPVが、肺がんの傾向があるか、または易罹患性の集団において、より高くあり得ることを認識する。一部の実施形態では、本開示は、数ある中でも、喫煙個体のスクリーニング、例えば、症状の発生前、またはそうでなければその非存在下での定期的なスクリーニングが、肺がんの有効な管理（例えば、処置の成功）のために有益であり、さらに重要であり得るという洞察を提供する。一部の実施形態では、本開示は、初期がん、一部の実施形態では、喫煙個体（例えば、肺がんにおける遺伝的および／もしくは生活歴関連リスクありもしくはなし、ならびに／または肺がんに関連する症状ありもしくはなし）における初期がんを含む、肺がんを検出するために実行され得る、肺がんのスクリーニングシステムを提供する。一部の実施形態では、提供される技術は、喫煙個体（例えば、肺がんにおける遺伝的および／もしくは生活歴関連リスクありもしくはなし、ならびに／または肺がんに関連する症状ありもしくはなし）の定期的なスクリーニングを達成するために実行することができる。一部の実施形態では、提供される技術は、提供される技術の単回および／または定期的（例えば、周期的）査定への有用な適用を可能にするのに適切な感度および／または特異度（例えば、偽陽性率および／または偽陰性率の結果）を伴う、肺がんの1つまたは複数の特色（例えば、発生率、進行、療法に対

40

50

する応答性、再発など）の検出（例えば、早期検出、例えば、症候性もしくは無症候性個体および／または集団における早期検出）を達成する。一部の実施形態では、提供される技術は、対象の周期的な身体検査（例えば、毎年、1年おき、または主治医によって承認された間隔）と併せて有用である。一部の実施形態では、提供される技術は、処置レジメンと併せて有用であり、一部の実施形態では、提供される技術は、そのような処置レジメンの1つまたは複数の特徴（例えば、許容されるパラメーターによる成功率）を改善し得る。

【0369】

一部の実施形態では、肺がんの発生または再発の検出のための提供される技術に適した対象は、無症候性ヒト対象および／または無症候性対象の集団全体であってもよい。そのような無症候性対象および／または無症候性対象の集団全体は、乳がんおよび／もしくは卵巣がん、白血病、および／もしくは肺がんなどのがんの家族歴を有する対象（例えば、遺伝的リスク因子と関連することが公知のがんの病歴を有する1人または複数人の第一度近親者を有する個体）、がん（例えば、肺がん）について以前に処置された対象、がん処置後に肺がん再発のリスクがある対象、肺がん処置後に寛解にある対象、ならびに／または例えば、少なくとも1つの肺がんバイオマーカーの存在についてのスクリーニング、もしくは胸部イメージング（例えば、X線イメージング、喀痰検査、低線量CTスキャンニング、ならびに／または無細胞核酸、血清タンパク質、例えば、CEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／もしくはSCCAに基づく分子検査）によって、肺がんについて以前にもしくは周期的にスクリーニングされている対象であってもよい。あるいは、一部の実施形態では、無症候性対象は、肺がんについて以前にスクリーニングされていない対象、肺がんについて診断されていない対象、および／または肺がん療法を以前に受けていない対象であってもよい。一部の実施形態では、無症候性対象は、良性肺腫瘍を有する対象であってもよい。一部の実施形態では、無症候性対象は、肺がん罹患しやすい（例えば、平均集団リスクの、上昇した生活歴関連リスクの、または肺がんについて遺伝的リスクを有する）対象であってもよい。

【0370】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、年齢、人種、地理的位置、遺伝歴、病歴、個人歴（例えば、喫煙、アルコール、薬物、発がん物質、食事、肥満、身体活動、日光曝露、放射線曝露、ウイルスなどの感染病原体への曝露、および／または職業上の危険）などの1つまたは複数の特徴に基づいて選択されてもよい。例えば、一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、現在、喫煙者であるか、または喫煙者であった（例えば、巻きタバコ、葉巻タバコ、パイプ、および／またはフーカー）と決定された、対象または対象の集団であってもよい。

【0371】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、限定されるものではないが、銅鉱石製錬、鉛鉱石製錬、亜鉛鉱石製錬、殺虫剤の製造、ヒ素採掘、アスベスト採掘、アスベスト繊維生産、ブレーキライニング作業、セメント生産、建設作業、断熱作業、造船作業、セラミック製造、電子機器および航空機器製造、化学製品製造、クロム酸塩生産、クロム電気めっき、革なめし、顔料生産、ニッケル採掘、ニッケル精製、ニッケル電気めっき、ステンレス鋼および耐熱鋼の生産、多環芳香族生産、アルミニウム生産、炭化水素化合物生産、コークス生産、クロム鉄合金生産、ニッケル含有鉱石製錬、屋根葺き、ラドン採掘、セラミックおよびガラス生産、花こう岩作業、金属鉱石製錬、シリカ採掘および採石を含む、吸入可能な発癌物質に対象を曝露することが公知の条件下で作業すると決定された、対象または対象の集団であってもよい。

【0372】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、肺がん関連遺伝子（例えば、ATMもしくはBRCAなどのDNA修復経路と関連する遺伝子、および／または潜在的な癌遺伝子の上皮増殖因子受容体（EGFR）にお

ける生殖細胞系列変異)、ならびにその組合せにおける1つまたは複数の生殖細胞系列変異を有すると決定された、対象または対象の集団であってもよい。

【0373】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、イメージングで確認される胸部腫瘍または肺腫瘍と診断された対象または対象の集団であってもよい。

【0374】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、生検、および／または外科的手順(例えば、肺葉切除)を受ける前の、遺伝的リスクまたは生活歴関連リスクがある対象または対象の集団であってもよい。

10

【0375】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、COPDまたは肺線維症を有すると決定された対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、慢性気管支炎、結核、および／または肺炎の病歴を有する対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、HIVおよび／またはAIDSを有すると決定された対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、現在または昔の多量のアルコール摂取を有する対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、EGFR、チトクロムp450酵素、および／またはDNA修復遺伝子に遺伝的変異を有すると決定された対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、放射線療法および／または化学療法に曝露された対象または対象の集団であってもよい。

20

【0376】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、肺がんの1つまたは複数の非特異的症状を有する対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの例示的な非特異的症状としては、慢性閉塞性肺疾患のものに類似する症状、ならびに／または血痰、持続性の咳、息切れ、反復性および／もしくは慢性呼吸器感染症、胸部疼痛、説明できない体重減少、喀血、気道閉塞、ならびに／または疲労などの症状が挙げられ得る。

30

【0377】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、アジア人、アフリカ系アメリカ人、白人、ハワイもしくは他の太平洋諸島の先住民、ヒスパニック系もしくはラテン系、アメリカ先住民もしくはアラスカ先住民、非ヒスパニック系黒人、または非ヒスパニック系白人などの多様な系統の対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、アジア太平洋諸島の住民、ヒスパニック系、アメリカ先住民／アラスカ先住民、非ヒスパニック系黒人、または非ヒスパニック系白人などの多様な血統の対象または対象の集団であってもよい。一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、任意の人種および／または任意の民族の対象または対象の集団であってもよい。

40

【0378】

一部の実施形態では、肺がんの検出のための提供される技術に適した対象または対象の集団は、正常なX線イメージング、喀痰検査、低線量CTスキャン、および／または無細胞核酸、血清タンパク質(例えば、CEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／またはSCCA)に基づく分子検査を有すると決定されていてもよい。一部の実施形態では、そのような対象は、そのような診断検査から肺がんの陰性表示を受けていてもよい。一部の実施形態では、そのような対象は、そのような診断検査から、肺

50

がんの陽性表示を受けていてもよい。一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、例えば、限定されるものではないが、(i) 身体検査、一般開業医訪問、コレステロール／脂質血液検査、糖尿病(2型)スクリーニング、大腸内視鏡検査、血圧スクリーニング、甲状腺機能検査、前立腺がんスクリーニング、マンモグラム、HPV／Papスメア、および／またはワクチン接種；(ii) 胸部X線イメージング、喀痰検査、胸部低線量CTスキニング、および／または無細胞核酸、血清タンパク質(例えば、CEA、CYFRA 21-1、NSE、ProGRP、および／またはSCCA)に基づく分子検査；(iii) 循環腫瘍DNAおよび／またはがんに関連するタンパク質バイオマーカーにおける遺伝子変異についての血漿をスクリーニングするための遺伝的アッセイ；(iv) 細胞表現型およびマーカー発現を同定するための免疫蛍光染色を含むアッセイと、それに続く次世代シーケンシングによる増幅および解析；ならびに／あるいは(v) EGFR、KRAS、ALK、ROAS1、HER2、BRAF、およびRETの生殖細胞系列変異、体細胞変異、および循環細胞変異アッセイ、または無細胞腫瘍DNA、リキッドバイオプシー、血清タンパク質および無細胞DNA、および／もしくは循環腫瘍細胞を含むアッセイを含む、他の診断アッセイと組み合わせて使用することができる。

10

20

30

40

50

【0379】

B. がん療法(例えば、肺がん療法)の選択

一部の実施形態では、提供される技術は、がん患者(例えば、肺がんを患っているか、またはそれに罹患しやすい患者)のための適切な処置を選択するために使用することができる。例えば、本明細書に提供される一部の実施形態は、がん療法(例えば、肺がんおよび／または補助処置)についての患者の分類のためのコンパニオン診断アッセイに関し、これは、本明細書に提供される技術を使用する、提供されるバイオマーカーの選択された組合せの患者試料(例えば、肺がん患者由来の生体試料、例えば、血液由来試料)における査定を含む。そのようなアッセイ結果に基づいて、がん療法(例えば、アブラキサン、アファチニブニマレイン酸塩、アレクチニブ、アテゾリズマブ、ペバシズマブ、ブリガチニブ、カプマチニブ塩酸塩、カルボプラチン、セリチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブメシル酸塩、ダコミチニブ、ドセタキセル、ドキソルビシン塩酸塩、デュルバルマブ、エヌトレクチニブ、エルロチニブ塩酸塩、エベロリムス、ゲフィチニブ、ゲムシタピン塩酸塩、イピリムマブ、ロルラチニブ、メクロレタミン塩酸塩、メトトレキサート、ネシツムマブ、ニボルマブ、オシメルチニブメシル酸塩、パクリタキセル、パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤、ペムプロリズマブ、ペメトレキセド二ナトリウム、ラムシルマブ、セルペルカチニブ、トラメチニブ、および／またはビノレルビン酒石酸塩を含む、例えば、肺がん療法および／または補助療法)に応答する可能性がより高いと決定された患者に、そのような療法を投与することができるか、または特異的なそのような療法に非応答性であると決定された患者に、異なる療法を投与することができる。

【0380】

C. 処置有効性(例えば、がん処置有効性)の評価

一部の実施形態では、本明細書に提供される技術は、がん患者(例えば、肺がん患者)に投与される抗がん療法の有効性をモニタリングするおよび／または評価するために使用することができる。例えば、生体試料(例えば、限定されるものではないが、血液由来試料などを含む、体液試料)は、第1の時点で、抗がん療法(例えば、アブラキサン、アファチニブニマレイン酸塩、アレクチニブ、アテゾリズマブ、ペバシズマブ、ブリガチニブ、カプマチニブ塩酸塩、カルボプラチン、セリチニブ、クリゾチニブ、ダブラフェニブメシル酸塩、ダコミチニブ、ドセタキセル、ドキソルビシン塩酸塩、デュルバルマブ、エヌトレクチニブ、エルロチニブ塩酸塩、エベロリムス、ゲフィチニブ、ゲムシタピン塩酸塩、イピリムマブ、ロルラチニブ、メクロレタミン塩酸塩、メトトレキサート、ネシツムマブ、ニボルマブ、オシメルチニブメシル酸塩、パクリタキセル、パクリタキセルアルブミン安定化ナノ粒子製剤、ペムプロリズマブ、ペメトレキセド二ナトリウム、ラムシルマブ、セルペルカチニブ、トラメチニブ、および／またはビノレルビン酒石酸塩)の前、またはそれを受けている肺がん患者から収集して、例えば、肺がんの検出に特異的であるバイ

オマーカーの選択された組合せを含むナノ粒子の存在または量を検出することによって、腫瘍負荷を検出または測定することができる。処置期間後、第2の生体試料（例えば、限定されるものではないが、血液試料などを含む、体液試料）は、同じ肺がん患者から収集して、例えば、肺がんの検出に特異的であるバイオマーカーの選択された組合せを含むナノ粒子の非存在またはその量の低減を検出することによって、腫瘍負荷の変化を検出することができる。処置の過程にわたる腫瘍負荷のレベルおよび／または変化をモニタリングすることによって、適切な一連の行動、例えば、治療剤の用量の増加もしくは減少、および／または異なる治療剤の投与を行うことができる。

【0381】

VII. キット

上記に記載される技術を実施する際に使用されるキットも提供される。一部の実施形態では、キットは、多数の検出プローブ（例えば、本明細書に記載されるおよび／または利用される通り）を含む。一部の実施形態では、提供されるキットは、2つまたはそれよりも多く（例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれよりも多く）の検出プローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、個々の検出プローブは、異なる標的に対するものであってもよい。一部の実施形態では、2つまたはそれよりも多くの個々の検出プローブは、同じ標的を対象にしている。一部の実施形態では、提供されるキットは、異なる標的に対する2つまたはそれよりも多くの異なる検出プローブを含み、必要に応じて、別の検出プローブが対象にする標的にも対する少なくとも1つの追加の検出プローブを含んでいてもよい。一部の実施形態では、提供されるキットは、そのそれぞれが同じ標的に対する2つまたはそれよりも多くの検出プローブを含む、検出プローブの多数のサブセットを含む。一部の実施形態では、多数の検出プローブは、容器中の混合物として提供されてもよい。一部の実施形態では、検出プローブの複数のサブセットは、別々の容器中の個々の混合物として提供されてもよい。一部の実施形態では、それぞれの検出プローブは、別々の容器で個々に提供される。

【0382】

一部の実施形態では、肺がんの検出のためのキットは、（a）細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤；ならびに（b）検出プローブのセットであって、このセットが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、検出プローブが、（i）肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに（ii）標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブのセットを含む。これらの実施形態では、肺がんのためのそのような標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、ここで、

・表面バイオマーカーは、

10

20

30

40

50

【化 6 3】

ADGRF1, ALCAM, ABCC3, ARSL,
 B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5,
 CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2,
 EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYP3, GALNT14, GJB1,
 GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B,
 LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM,
 PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2, Lewis
 X 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SLC44A4,
 SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, TACSTD2, TMC4, TMC5,
 TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1

10

およびその組合せから選択され；一部の実施形態では、本明細書に記載される表面バイオ
 マーカーは、少なくとも 1 つの改変（例えば、一部の実施形態では、グリコシル化、およ
 び／または一部の実施形態では、脂質化）を含んでいてもよく；

20

・小胞内バイオマーカーは、

【化 6 4】

AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1,
 ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14,
 SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；一部の実施形態では、本明細書に記載される小胞内バイ
 オマーカーは、少なくとも 1 つの翻訳後改変を含んでいてもよく；

30

・小胞内 RNA バイオマーカーは、

【化 6 5】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3,
 C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18,
 CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3,
 ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2,
 KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN,
 MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14,
 SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB,
 SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14,
 TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8,
 ZC3H11A,

40

およびその組合せから選択される。

【0 3 8 3】

一部の実施形態では、肺がんの検出のためのキットは、（a）細胞外小胞関連表面バイ
 オマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤；ならびに（b）検出プローブのセッ

50

トであって、このセットが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、検出プローブが、(i) 肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブのセットを含む。これらの実施形態では、肺がんのためのそのような標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）、ならびに表面バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）、小胞内バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）、および小胞内RNAバイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）からなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む。一部の実施形態では、提供されるキットにおいて利用される1つまたは複数の表面バイオマーカーは、シアリルTn（sTn）抗原、シアリル-6T抗原（6-シアリルコア1）、T抗原、

【化66】

10

20

30

40

50

【化 6 7】

PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

10

およびその組合せから選択される。一部の実施形態では、提供されるキットにおいて利用される 1 つまたは複数の小胞内バイオマーカーは、以下のヒト遺伝子：

【化 6 8】

20

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AOC1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C12orf45, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CST1, CSTA, CTSC, CTSE, CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, ETV4, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXA2, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2, GRHL2, GSTA1, HCK, HMGB3, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS3BP, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2, MDFI, MIF, MYBL2, MYH14, MZB1, NAPSA, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PPP1R14D, PRAME, PTPN6, RBP1, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SBK1, SCGB3A2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINK1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

30

40

およびその組合せによってコードされるポリペプチドである。一部の実施形態では、本明細書に記載される小胞内バイオマーカーは、少なくとも 1 つの翻訳後改変を含んでいても

50

よい。一部の実施形態では、提供されるキットにおいて利用される１つまたは複数の小胞内RNAバイオマーカーは、以下のヒト遺伝子：

【化 6 9】

ABCA3, ABCC1, ABCC3, ABRACL, ACP5, ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1,
AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1, AOC1,
AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2, ARSL, ASF1B, ATP8B1,
AURKB, B3GNT3, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C12orf45, C15orf48,
C19orf33, C1S, C8orf4, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2,
CD109, CD24, CD53, CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1,
CDH1, CDH3, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW,
CEP55, CES1, CHMP4C, CLCA2, CLDN1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6,
CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CST1, CSTA, CTSC, CTSE, CX3CL1, CXADR, CXCR4,
CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DMBT1, DPYSL3, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, DSP,
EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2, ENAH, EPCAM,
EPHA2, EPHB3, EPHX1, EPHX3, ESRP1, ETV4, EVA1A, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3,
FAM129B, FAM60A, FAM83A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G,
FERMT1, FGFR2, FGFR3, FOLR1, FOXA2, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6,
GJA1, GJB1, GJB2, GJB3, GJB5, GJB6, GNA15, GPC1, GPC3, GPC4, GPNMB, GPR87,
GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1, HAS3, HCK, HMGB3, HOXB7, HS6ST2, ID1, IGF2BP2,
IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4, ITGB6, IVL, JAG2, JUP, KCNS3,
KDEL3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16,
KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, KRTCAP3,
LAMB3, LAMP3, LAPTM5, LFNG, LGALS3BP, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR,
LYPD3, MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MANEAL, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET,
MIF, MMP14, MPZL2, MSLN, MUC1, MUC21, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NAPSA,
NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR,
PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR, PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK,
PLEK2, PLVAP, PMP22, PODXL2, POSTN, PPL, PPP1R14C, PPP1R14D, PRAME, PROM2,
PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25, RAB38, RAET1L,
RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, ROS1, RPS4Y1, RRM2, S100A10,
S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SBK1, SCGB3A2, SCNN1A, SDC1,
SERINC2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB,

10

20

30

40

【化 7 0】

SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1, SLC34A2, SLC40A1, SLC44A4, SLC6A14, SLC6A8, SLC7A7, SLC7A8, SMIM22, SMPDL3B, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINK1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, TGFA, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMC5, TMEM30B, TMEM45B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A, TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TSPAN8, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANGL2, WLS, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

およびその組合せによってコードされるRNA転写物（例えば、mRNA転写物）である。

【0384】

一部の実施形態では、少なくとも1つの標的バイオマーカーが、提供される表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、選択された表面バイオマーカーおよび少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、異なる。一部の実施形態では、少なくとも1つの標的バイオマーカーが、提供される表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、選択された表面バイオマーカーおよび少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、同じである（同じまたは異なるエピトープを有する）。

20

【0385】

一部の実施形態では、キットにおいて提供される捕捉剤は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含み、これは、

【化 7 1】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1,

30

40

50

【化 7 2】

RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMC01, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYL1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, NOTCH2, NOTCH3, TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA,

10

およびその組合せのうちの1つもしくは複数；ならびに／または（i i）以下の炭水化物依存性マーカー：シアリル Lewis A 抗原（CA19-9）、Globo H、Gb5（SSEA-3）、ラクトリアオシルセラミド、（Lc3）、フォルスマン抗原、Lewis X、Lewis Y/B 抗原、LY6E、Lewis Y/CD174、シアリル Lewis X（sLex）（シアリル SSEA-1（SLX）としても公知）、NeuGcGM3、およびその組合せであるか、あるいはそれを含む。一部の実施形態では、キットにおいて提供される捕捉剤は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含み、これは、

20

【化 7 3】

ALCAM, B3GNT3, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4, DSG2, EGFR, EPCAM, FOLR1, GJB1, GJB2, IG1FR, LAMB3, MET, MSLN, MUC1, PIGT, PODXL2, ROS1, SDC1, SLC34A2, SMPDL3B, ST14, sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMPRSS4, TSPAN8, TNFRSF10B,

およびその組合せのうちの1つもしくは複数であるか、またはそれを含む。一部の実施形態では、キットにおいて提供される捕捉剤は、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含み、これは、SLC34A2、CEACAM5、CEACAM6、EPCAM、および／もしくはその組合せから選択される1つもしくは複数のポリペプチドであるか、またはそれを含む。

30

【0386】

一部の実施形態では、キットにおいて提供される少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカーシグネチャーの同じ標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする。一部の実施形態では、そのような同じ表面バイオマーカーは、CEACAM6であるか、またはそれを含む。一部のそのような実施形態では、そのような少なくとも2つの検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、異なる。

40

【0387】

一部の実施形態では、キットにおいて提供される少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカーシグネチャーの別個の標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする。例えば、一部の実施形態では、キットは、それぞれ、CEACAM6およびEPCAMを対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、キットは、それぞれ、CEACAM6およびSLC34A2を対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。

【0388】

一部の実施形態では、検出プローブの標的結合部分は、親和性剤であってもよく、またはそれを含んでもよく、これは、一部の実施形態では、抗体（例えば、モノクローナ

50

ル抗体)であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、検出プローブの標的結合部分は、親和性剤であってもよく、またはそれを含んでいてもよく、これは、一部の実施形態では、レクチンもしくはs i g l e cであってもよく、またはそれを含んでいてもよい。

【0389】

一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載される肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャー(例えば、限定されるものではないが、表4~5に表されるものを含む)の検出を対象にする。一部の実施形態では、キットは、少なくとも本明細書に記載される表面バイオマーカー(例えば、限定されるものではないが、細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして、表3に提供されるものを含む)および少なくとも本明細書に記載される表面バイオマーカー(例えば、限定されるものではないが、標的表面バイオマーカーとして、表3に提供されるものを含む)を含む、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの検出を対象にする。

10

【0390】

一部の実施形態では、キットは、少なくともS L C 3 4 A 2ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)およびC E A C A M 6ポリペプチド(標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

【0391】

一部の実施形態では、キットは、少なくともS L C 3 4 A 2ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)およびE p C A Mポリペプチド(標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

20

【0392】

一部の実施形態では、キットは、少なくともC E A C A M 5ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)およびC E A C A M 6ポリペプチド(標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

【0393】

一部の実施形態では、キットは、少なくともC E A C A M 5ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)およびS L C 3 4 A 2ポリペプチド(標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

【0394】

一部の実施形態では、キットは、少なくともC E A C A M 5ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)、ならびにC E A C A M 6ポリペプチドおよびS L C 3 4 A 2ポリペプチド(2つの別個の標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

30

【0395】

一部の実施形態では、キットは、少なくともS L C 3 4 A 2ポリペプチド(細胞外小胞関連表面バイオマーカーとして)、ならびにC E A C A M 6ポリペプチドおよびE p C A Mポリペプチド(2つの別個の標的表面バイオマーカーとして)を含む肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする。

【0396】

一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つの酵素または化学試薬、例えば、酵素、固定剤、透過処理剤、および/またはブロック剤を含んでいてもよい。

40

【0397】

一部の実施形態では、キットは、1つまたは複数の核酸ライゲーション試薬(例えば、核酸リガーゼ、例えば、D N Aリガーゼおよび/または緩衝溶液)を含んでいてもよい。

【0398】

一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つまたは複数の増幅試薬、例えば、P C R増幅試薬を含んでいてもよい。一部の実施形態では、キットは、1つもしくは複数の核酸ポリメラーゼ(例えば、D N Aポリメラーゼ)、プライマーの1つもしくは複数の対、ヌクレオチド、および/または緩衝溶液を含んでいてもよい。

50

【0399】

一部の実施形態では、キットは、目的の実体（例えば、生物学的実体）を捕捉するための固体基材を含んでいてもよい。例えば、そのような固体基材は、ビーズ（例えば、磁気ビーズ）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのような固体基材は、表面であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、表面は、例えば、フィルター、マトリックス、膜、プレート、管、ウェル（例えば、限定されるものではないが、マイクロウェル）などのようなアッセイチャンバーの捕捉表面（例えば、実体捕捉表面）であってもよく、またはそれを含んでいてもよい。一部の実施形態では、固体基材の表面（例えば、捕捉表面）は、目的の実体（例えば、生物学的実体）のための捕捉剤（例えば、親和性剤）でコーティングすることができる。

10

【0400】

一部の実施形態では、キットにおいて提供される検出プローブのセットは、肺がんの診断のために選択されてもよい。

【0401】

一部の実施形態では、キットは、検出プローブの多数のセットを含んでいてもよく、検出プローブのそれぞれのセットは、特異的がんの検出を対象とし、少なくとも2つまたはそれよりも多くの検出プローブを含む。例えば、そのようなキットは、単一アッセイにおいて、その1つが、肺がんである一方で、他のがんが、皮膚がん、卵巣がん、乳がん、結腸直腸がん、膵臓がん、前立腺がん、脳がん、および肝臓がんから選択され得る、さまざまながんについて、対象をスクリーニングするために使用することができる。

20

【0402】

一部の実施形態では、本明細書に提供されるキットは、本明細書に記載される方法を実施するための指示を含んでいてもよい。これらの指示は、各種の形態でキット中に存在していてもよく、そのうちの1つまたは複数は、キット中に存在していてもよい。これらの指示が存在し得る1つの形態は、キットの包装、添付文書などにおいて、好適な媒体または基材上の印刷された情報、例えば、情報が印刷された1つまたは複数の紙片としてである。さらに別の手段は、指示情報が記録されたコンピューター可読媒体、例えば、ディスク、CD、USBドライブなどであってもよい。存在し得るさらに別の手段は、インターネットを介して指示情報にアクセスするために使用され得るウェブサイトアドレスである。任意の好都合な手段が、キット中に存在していてもよい。

30

【0403】

キットがコンパニオン診断としての使用のためである一部の実施形態では、そのようなキットは、治療剤に応答する可能性がある患者を同定するための指示（例えば、治療剤に対する患者応答性を示すバイオマーカーの同定）を含んでいてもよい。一部の実施形態では、そのようなキットは、コンパニオン診断検査とのタンデムでの使用のための治療剤を含んでいてもよい。

【0404】

下記の例示的な実施形態も、本開示の範囲内である。

【0405】

本明細書の開示の一態様は、

40

(a) 対象から血液由来試料を提供するまたは得るステップ；

(b) 血液由来試料において、第1の標的バイオマーカーシグネチャーを発現する細胞外小胞（「第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞」）を検出するステップであって、第1の標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに

表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、

表面バイオマーカーが、

50

【化 7 4】

ADGRF1, ABCC3, ALCAM, ARSL,
 B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5,
 CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2,
 EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXVD3, GALNT14, GJB1,
 GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, IG1FR, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LAPTM4B,
 LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM,
 PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2,
 SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, Lewis X
 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMC4,
 TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1

10

およびその組合せから選択され；

小胞内バイオマーカーが、

【化 7 5】

20

AOC1, C12orf45, CRABP2,
 CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D,
 S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA,
 ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；

小胞内 RNA バイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：

【化 7 6】

30

ABCC3, AOC1, ARSL,
 B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1,
 CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2,
 EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4,
 HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR,
 MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D,
 PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2,
 SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22,
 SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
 TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

40

およびその組合せによってコードされる RNA 転写物（例えば、mRNA 転写物）から選
 択される、ステップ；

（c）血液由来試料における第 1 の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞の
 レベルを示す試料情報を、第 1 の参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；

（d）血液由来試料が、第 1 の参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、第

50

1 の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞のレベルの上昇を示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む方法である。

【0406】

開示される方法の一部の実施形態では、少なくとも1つの標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、選択された表面バイオマーカーおよび少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、異なる。

【0407】

開示される方法の一部の実施形態では、(b) および (c) のステップは、少なくとも第2の標的バイオマーカーシグネチャーについて繰り返され、分類カットオフは、第1の参照閾値レベル、および少なくとも第2の標的バイオマーカーシグネチャーに対応する少なくとも第2の参照閾値レベルを参照する。

【0408】

開示される方法の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、
【化77】

ADGRF1, ALCAM, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1,
CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4, DSG2,

【化78】

EGFR, EPCAM, FAM241B, FOLR1, FXRD3, GALNT14, GJB1, GJB2, HAS3, IG1FR,
LAMB3, LAPTM4B, LARGE2, MAL2, MET, MSLN, MUC1, NRCAM, PIGT, PODXL2,
PRSS21, ROS1, SDC1, SLC34A2, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, UCHL1, Lewis X
抗原、シアリルLewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMPRSS4,
TSPAN8, TNFRSF10B,

もしくはその組合せであるか、またはそれを含む。

【0409】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーは、少なくとも1つの細胞外小胞関連標的バイオマーカー、ならびに表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも2つの標的バイオマーカーを含む。

【0410】

開示される方法の一部の実施形態では、少なくとも2つの標的バイオマーカーは、以下の組合せ：

- －少なくとも2つの別個の表面バイオマーカー；
- －少なくとも2つの別個の小胞内バイオマーカー；
- －少なくとも2つの別個の小胞内RNAバイオマーカー；
- －表面バイオマーカーおよび小胞内バイオマーカー；
- －表面バイオマーカーおよび小胞内RNAバイオマーカー；ならびに
- －小胞内バイオマーカーおよび小胞内RNAバイオマーカー

のうちの1つを含む。

【0411】

本明細書の開示の一態様は、

(a) 対象から血液由来試料を提供するまたは得るステップ；

(b) 血液由来試料において、第1の標的バイオマーカーシグネチャーを発現する細胞外小胞（「第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞」）を検出するステップであって、第1の標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、および

少なくとも1つの標的バイオマーカーであって、標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーであるか、またはそれを含み、標的バイオマーカーシグネチャーが、表4に列挙されるバイオマーカーの組合せを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカーを含む、ステップ；

(c) 血液由来試料における第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞のレベルを示す試料情報を、第1の参照閾値レベルを含む参照情報と比較するステップ；

(d) 血液由来試料が、第1の参照閾値レベルを参照する分類カットオフと比べて、第1の標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞のレベルの上昇を示す場合に、肺がんを有するか、またはそれに罹患しやすいとして対象を分類するステップを含む方法である。

10

【0412】

開示される方法の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドであるか、またはそれを含む。

【0413】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーは、(i) CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー；ならびに(ii) 表面バイオマーカーまたは小胞内RNAバイオマーカーであつてもよい、少なくとも1つの標的バイオマーカーCEACAM6を含む。

20

【0414】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーは、(i) CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも1つの細胞外小胞関連標的バイオマーカー；ならびに(ii) そのそれぞれが、表面バイオマーカーまたは小胞内RNAバイオマーカーであつてもよい、少なくとも2つの標的バイオマーカーCEACAM6およびEPCAMを含む。

【0415】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーは、(i) CEACAM5ポリペプチドであるか、またはそれを含む、少なくとも1つの細胞外小胞関連標的バイオマーカー；ならびに(ii) そのそれぞれが、表面バイオマーカーまたは小胞内RNAバイオマーカーであつてもよい、少なくとも2つの標的バイオマーカーCEACAM6およびSLC34A2を含む。

30

【0416】

開示される方法の一部の実施形態では、第1または第2の参照閾値レベルは、非がん対象の集団由来の比較可能な試料において観察される標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞のレベルによって決定される。

【0417】

開示される方法の一部の実施形態では、非がん対象の集団は、以下の対象集団：健康な対象、良性腫瘍と診断された対象、ならびに非肺関連疾患、障害、および／または状態を有する対象のうちの1つまたは複数を含む。

40

【0418】

開示される方法の一部の実施形態では、血液由来試料は、サイズ排除クロマトグラフィーに供されて、細胞外小胞を含む、目的のサイズ範囲を有するナノ粒子が（例えば、血液由来試料から直接的に）単離される。

【0419】

開示される方法の一部の実施形態では、検出するステップは、捕捉アッセイを含む。

【0420】

開示される方法の一部の実施形態では、捕捉アッセイは、血液由来試料を、少なくとも

50

1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーに結合する標的捕捉部分を含む捕捉剤と接触させるステップを含む。

【0421】

開示される方法の一部の実施形態では、捕捉剤は、それらにコンジュゲートされた標的捕捉部分を含む固体基材であるか、またはそれを含む。

【0422】

開示される方法の一部の実施形態では、固体基材は、磁気ビーズを含む。

【0423】

開示される方法の一部の実施形態では、標的捕捉部分は、抗体剤であるか、またはそれを含む。

【0424】

開示される方法の一部の実施形態では、検出するステップは、検出アッセイを含む。

【0425】

開示される方法の一部の実施形態では、検出するステップは、捕捉アッセイおよび検出アッセイを含み、捕捉アッセイは、検出アッセイの前に行われる。

【0426】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つの小胞内RNAバイオマーカーを含む場合に、検出アッセイは、逆転写qPCRを含む。

【0427】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つの小胞内バイオマーカーを含む場合に、標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞は、検出アッセイの前に、固定および／または透過処理を含んで、処理される。

【0428】

開示される方法の一部の実施形態では、第1および／または第2の標的バイオマーカーシグネチャーが、少なくとも1つの表面バイオマーカーおよび／または小胞内バイオマーカーを含む場合に、検出アッセイは、免疫アッセイ（例えば、免疫PCR、および／または近接ライゲーションアッセイを含む）を含む。

【0429】

開示される方法の一部の実施形態では、検出アッセイは、近接ライゲーションアッセイを含む。

【0430】

開示される方法の一部の実施形態では、近接ライゲーションアッセイは、

(a) 少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーを発現する標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞（「細胞外小胞関連表面バイオマーカー発現細胞外小胞」）を、標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする検出プローブのセットと接触させるステップであって、そのセットが、細胞外小胞および検出プローブのセットを含む組合せが作成されるように、少なくとも2つの検出プローブを含み、

検出プローブが、

(i) 標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに

(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、ステップ；

(b) 組合せを、少なくとも2つの検出プローブが、標的バイオマーカーシグネチャー

10

20

30

40

50

を発現する同じ細胞外小胞に結合して、二本鎖複合体を形成することができるように、検出プローブのセットの細胞外小胞上のそれらの個々の標的への結合を可能にする条件下で維持するステップ；

(c) 二本鎖複合体を、核酸リガーゼと接触させて、ライゲーションされた鑄型を作成するステップ；

(d) ライゲーションされた鑄型を検出するステップであって、ライゲーションされた鑄型の存在が、標的バイオマーカーシグネチャー発現細胞外小胞の血液由来試料における存在を示す、ステップ；ならびに

(e) 必要に応じて、オルソゴナルな標的バイオマーカーシグネチャーを使用して、少なくともさらに1回、ステップa～dを繰り返すステップを含む。

10

【0431】

開示される方法の一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、同じ標的バイオマーカー（例えば、CEACAM6）を対象にする。

【0432】

開示される方法の一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、異なる。

【0433】

開示される方法の一部の実施形態では、捕捉アッセイの標的捕捉部分は、少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー（例えば、CEACAM5ポリペプチド、EPCAMポリペプチド、および／またはSLC34A2ポリペプチド）を対象にする少なくとも1つの抗体剤であるか、またはそれを含む。

20

【0434】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、対象における初期肺がん、末期肺がん、または再発性肺がんについてスクリーニングするために行われる。

【0435】

開示される方法の一部の実施形態では、対象は、以下の特徴：

(i) 肺がん罹患しやすい（例えば、平均集団リスク（すなわち、遺伝的リスクなし）の、または肺がんについての遺伝的リスクを有する）無症候性対象；

(ii) 肺がんの家族歴を有する対象（例えば、肺がんの病歴を有する1人または複数人の第一度近親者を有する対象）；

30

(iii) 喫煙者であるか、または喫煙者であった、対象；

(iv) 二次喫煙、ラドンガス、アスベスト、瀝青質「煙の出る石炭」、および／または他の発癌物質（例えば、ヒ素、クロム、ニッケル、電離放射線、多環式芳香族炭化水素、一酸化窒素、高レベルの $< 2.5 \mu\text{m}$ の粒子状物質）に曝露された対象；

(v) 40歳またはそれを超える対象；

(vi) 肺がんの1つまたは複数の非特異的症状を有する対象であって、必要に応じて、非特異的症状のうちの少なくとも1つが、非がん性疾患、障害、または状態と関連する1つまたは複数の一般的な呼吸症状、例えば、咳嗽、咯血、気道閉塞、および息切れに類似する、対象；

40

(vii) 胸部イメージング、例えば、X線、CTスキャン、または低線量CTスキャンが推奨される対象；

(viii) イメージングで確認される肺腫瘍と診断された対象；

(ix) 良性肺腫瘍を有する対象；

(x) 肺がんについて以前に処置された対象；

(xi) COPDを有すると決定された対象；

(xii) 肺線維症を有すると決定された対象；

(xiii) 慢性気管支炎、結核、および／または肺炎の病歴を有する対象；

(xiv) HIVおよび／またはAIDSを有すると決定された対象；

(xv) 現在または過去の多量のアルコール摂取を有する対象；

50

(x v i) E G F R、チトクロム p 4 5 0 酵素、および／または D N A 修復遺伝子に遺伝性変異を有する対象；ならびに

(x v i i) 放射線療法および／または化学療法に曝露された対象のうちの少なくとも1つまたは複数を有する。

【0 4 3 6】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、以下の診断アッセイ：

(i) 対象の1年に1回の身体検査；

(i i) 胸部イメージング（例えば、X線、C T スキャン、または低線量 C T スキャン）；

(i i i) 喀痰細胞診；

(i v) 循環腫瘍 D N A および／またはがんに関連するタンパク質バイオマーカーにおける遺伝子変異について血漿をスクリーニングするための遺伝学的アッセイ；ならびに

(v) 細胞表現型およびマーカー発現を同定するための免疫蛍光染色と、それに続く増幅および次世代シーケンシングによる解析を含むアッセイのうちの1つまたは複数と組み合わせて使用される。

【0 4 3 7】

開示される方法の一部の実施形態では、肺がんは、小細胞肺がんまたは非小細胞肺がんである。

【0 4 3 8】

開示される方法の一部の実施形態では、肺がんは、非小細胞肺がんである。

【0 4 3 9】

開示される方法の一部の実施形態では、非小細胞肺がんは、肺腺癌である。

【0 4 4 0】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、抗肺がん療法（例えば、外科手術、放射線療法、化学療法、放射線手術、標的化薬物療法、免疫療法）の処置への応答についておよび／またはがんの再発／転移について、肺がん患者をモニタリングするために行われる。

【0 4 4 1】

がんを検出するための開示される方法の一部の実施形態では、方法は、ヒト血液試料由来のインタクト細胞外小胞の表面上で、少なくとも2つのバイオマーカーの共局在を検出するステップであって、その組み合わせられた発現レベルが、がんに関連すると決定される、ステップ；検出された共局在レベルを、決定されたレベルと比較するステップ；および検出された共局在レベルが、決定されたレベルであるか、またはそれを上回る場合に、がんを検出するステップを含む。

【0 4 4 2】

がんを検出するための開示される方法の一部の実施形態では、方法は、エキソソームを含む試料を、エキソソーム上の表面バイオマーカーに特異的に結合する検出プローブのセットと接触させて、95%～100%の範囲内の特異度および30%～100%の範囲内の感度で、試料中のがん関連エキソソームを検出するステップを含む。

【0 4 4 3】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、エキソソーム上のがん特異的表面バイオマーカーと選択的に相互作用する捕捉剤を用いて、生体試料からエキソソームを捕捉するステップ；捕捉されたエキソソームを、エキソソーム上の表面バイオマーカーとそれぞれ選択的に相互作用する少なくとも2つの検出プローブの少なくとも1つのセットと接触させるステップ；およびセットの少なくとも2つの検出プローブが、十分に近接している場合に形成される生成物を検出するステップであって、そのような検出が、表面バイオマーカーの共局在を示す、ステップを含む。

【0 4 4 4】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、エキソソームを含む試料を、エキソソーム上の表面バイオマーカーに特異的に結合するプローブのセットと接触させて、試料中

10

20

30

40

50

のがん関連エキソソームを検出するステップであって、(i) セット中のそれぞれのプローブがエキソソーム上の表面バイオマーカーを対象にする標的結合部分を含み；(ii) セットが、少なくとも1つの捕捉プローブおよび少なくとも2つの検出プローブを含み、それぞれの検出プローブが、検出部分をさらに含む、ステップを含む。

【0445】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、ヒト対象からのエキソソーム上の表面バイオマーカーシグネチャーを検出する近接アッセイを行うステップであって、行うステップが、以前のアッセイを行った後の期間に行われて、ヒト対象からのエキソソーム上の表面バイオマーカーシグネチャーを検出する、ステップ；および行われたアッセイの結果を、以前のアッセイの結果と比較するステップを含む。

10

【0446】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、エキソソームを、少なくとも2つの検出プローブと接触させるステップであって、それぞれの検出プローブが、(i) 結合部分；および(ii) オリゴヌクレオチド実体を含み、結合部分が、同じであり、オリゴヌクレオチド実体が、互いを補完する、ステップを含む。

【0447】

開示される方法の一部の実施形態では、方法は、エキソソーム表面上でのマーカー近接性を検出するステップであって、エキソソームを、結合部分および近接部分をそれぞれ含む結合剤の少なくとも一対と接触させるステップを含む改善を含み、結合部分が、同じであり、近接部分が、互いを補完する、ステップ；ならびに近接部分間の相互作用を検出するステップを含む。

20

【0448】

本明細書の開示の一態様は、肺がんの検出のためのキットであって、

(a) 細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤；ならびに

(b) 検出プローブの少なくとも1つのセットであって、そのセットが、肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、検出プローブが、

(i) 肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーに向けられた標的結合部分；ならびに

30

(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含み；

肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに

表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、

40

表面バイオマーカーが、

【化 7 9】

ADGRF1, ABCC3, ALCAM, ARSL,
 B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5,
 CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2,
 EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1,
 GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, IG1FR, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LAPTM4B,
 LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM,
 PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2,
 SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, Lewis X
 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMC4,
 TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1

10

およびその組合せから選択され；

小胞内バイオマーカーが、

【化 8 0】

AOC1, C12orf45, CRABP2,
 CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D,

20

【化 8 1】

S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA,
 ZC3H11A,

およびその組合せから選択され；

小胞内 RNA バイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：

30

【化 8 2】

ABCC3, AOC1, ARSL,
 B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1,
 CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2,
 EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4,
 HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR,
 MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D,
 PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2,
 SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22,
 SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
 TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

40

およびその組合せによってコードされる RNA 転写物（例えば、mRNA 転写物）から選
 択される、検出プローブの少なくとも 1 つのセット
 を含むキットである。

50

【0449】

開示されるキットの一部の実施形態では、少なくとも1つの標的バイオマーカが、表面バイオマーカのうちの1つまたは複数から選択される場合に、選択された表面バイオマーカおよび少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカは、異なる。

【0450】

開示されるキットの一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカは、
【化83】

ADGRF1, ALCAM, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4, DSG2, EGFR, EPCAM, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1, GJB2, HAS3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B, LARGE2, MAL2, MET, MSLN, MUC1, NRCAM, PIGT, PODXL2, PRSS21, ROS1, SDC1, SLC34A2, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, UCHL1, Lewis X 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMPRSS4, TSPAN8, TNFRSF10B,

10

もしくはその組合せであるか、またはそれを含む。

【0451】

本明細書の開示の一態様は、肺がんの検出のためのキットであって、

20

(a) 細胞外小胞関連表面バイオマーカを対象にする標的捕捉部分を含む捕捉剤；ならびに

(b) 検出プローブの少なくとも1つのセットであって、そのセットが、肺がんのための標的バイオマーカシグネチャーの標的バイオマーカをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含み、検出プローブが、

(i) 肺がんのための標的バイオマーカシグネチャーの標的バイオマーカに向けた標的結合部分；ならびに

(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

30

少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含み；

肺がんのための標的バイオマーカシグネチャーが、

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカ、ならびに

少なくとも1つの標的バイオマーカであって、標的バイオマーカが、表面バイオマーカであるか、またはそれを含み、標的バイオマーカシグネチャーが、表4に列挙されるバイオマーカの組合せを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカを含む、検出プローブの少なくとも1つのセットを含むキットである。

40

【0452】

開示されるキットの一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカは、CEACAM5 ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2 ポリペプチドであるか、またはそれを含む。

【0453】

開示されるキットの一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカシグネチャーの同じ標的バイオマーカをそれぞれ対象にする。

50

【0454】

開示されるキットの一部の実施形態では、同じ表面バイオマーカーは、CEACAM6であるか、またはそれを含む。

【0455】

開示されるキットの一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、異なる。

【0456】

開示されるキットの一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカーシグネチャーの別個の標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする。

10

【0457】

開示されるキットの一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドであるか、またはそれを含み、少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびEPCAMを対象にする。

【0458】

開示されるキットの一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドであるか、またはそれを含み、少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびSLC34A2を対象にする。

【0459】

開示されるキットの一部の実施形態では、キットは、少なくとも1つの追加試薬（例えば、リガーゼ、固定剤、および／または透過処理剤）をさらに含む。

20

【0460】

開示されるキットの一部の実施形態では、キットは、検出プローブの少なくとも2つのセット（例えば、少なくとも3つのセットを含む）を含み、そのそれぞれのセットは、肺がんのための別個の標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。

【0461】

本明細書の開示の一態様は、

(a) 標的捕捉部分を含む第1の捕捉剤；

(b) 標的捕捉部分を含む第2の捕捉剤；

(c) 検出プローブの少なくとも2つのセットであって、検出プローブが、

(i) 標的表面バイオマーカーに向けられた標的結合部分；ならびに

(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメイン

をそれぞれ含む、検出プローブの少なくとも2つのセット

を含む、請求項44～46のいずれか一項に記載のキットである。

30

40

【0462】

開示されるキットの一部の実施形態では、キットは、

(a) 標的捕捉部分を含む第1の捕捉剤；

(b) 標的捕捉部分を含む第2の捕捉剤；

(c) 標的捕捉部分を含む第3の捕捉剤；

(d) 検出プローブの少なくとも3つのセットであって、検出プローブが、

(i) 標的表面バイオマーカーに向けられた標的結合部分；ならびに

(ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方

50

の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

少なくとも2つの検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも2つの検出プローブが同じ細胞外小胞に結合する場合に、それらが互いにハイブリダイズすることができるという点で特徴づけられる、オリゴヌクレオチドドメインをそれぞれ含む、検出プローブの少なくとも3つのセットを含む。

【0463】

本明細書の開示の一態様は、

(a) 肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを発現する細胞外小胞であって、標的バイオマーカーシグネチャーが、

10

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに

表面バイオマーカー、小胞内バイオマーカー、および小胞内RNAバイオマーカーからなる群から選択される少なくとも1つの標的バイオマーカーを含み、

表面バイオマーカーが、

【化84】

ADGRF1, ABCC3, ALCAM, ARSL,

B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5,

CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2,

20

EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1,

GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, IG1FR, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LAPTM4B,

LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM,

PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2,

SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, Lewis X

抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMC4,

TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1

30

およびその組合せから選択され；

小胞内バイオマーカーが、

【化85】

AOC1, C12orf45, CRABP2,

CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D,

S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA,

ZC3H11A,

40

およびその組合せから選択され；

小胞内RNAバイオマーカーが、以下のヒト遺伝子：

【化 8 6】

ABCC3, AOC1, ARSL,
 B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1,
 CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2,
 EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4,
 HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR,
 MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D,
 PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2,
 SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22,
 SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4,
 TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

およびその組合せによってコードされるRNA転写物（例えば、mRNA転写物）から選択され；

細胞外小胞が、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む固体基材上に固定化される、細胞外小胞；

20

（b）細胞外小胞にそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、それぞれの検出プローブが、

（i）腫瘍標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーのうちの1つを対象にする標的結合部分；ならびに

（ii）標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

第1および第2の検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメイン

を含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む複合体である。

30

【0464】

開示される複合体の一部の実施形態では、少なくとも1つの標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数から選択される場合に、選択された表面バイオマーカーおよび少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、異なる。

【0465】

開示される複合体の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、ADGRF1、ALCAM、B3GNT3、B3GNT5、CDCP1、CDH1、CDH3、CD55、CD274（PD-L1）、CEACAM5、CEACAM6、CLDN3、CLDN4、DSG2、EGFR、EPCAM、FAM241B、FOLR1、FXYD3、GALNT14、GJB1、GJB2、HAS3、IG1FR、LAMB3、LAPTM4B、LARGE2、MAL2、MET、MSLN、MUC1、NRCAM、PIGT、PODXL2、PRSS21、ROS1、SDC1、SLC34A2、SLC7A11、SMIM22、SMPDL3B、ST14、UCHL1、Lewis X抗原、シアリルLewis X抗原、sTn抗原、Tn抗原、T抗原、TACSTD2、TMPRSS4、TSPAN8、TNFRSF10B、もしくはその組合せであるか、またはそれを含む。

40

【0466】

本明細書の開示の一態様は、

（a）肺がんのための標的バイオマーカーシグネチャーを発現する細胞外小胞であって

50

、標的バイオマーカーシグネチャーが、

少なくとも1つの細胞外小胞関連表面バイオマーカー、ならびに

少なくとも1つの標的バイオマーカーであって、標的バイオマーカーが、表面バイオマーカーであるか、またはそれを含み、標的バイオマーカーシグネチャーが、表4に列挙されるバイオマーカーの組合せであるか、またはそれを含む、少なくとも1つの標的バイオマーカー

を含み；

細胞外小胞が、細胞外小胞関連表面バイオマーカーを対象にする標的捕捉部分を含む固体基材上に固定化される、細胞外小胞；

(b) 細胞外小胞にそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、それぞれの検出プローブが、

(i) 腫瘍標的バイオマーカーシグネチャーの標的バイオマーカーのうちの1つを対象にする標的結合部分；ならびに

(i i) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、

第1および第2の検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメイン

を含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブ

を含む複合体である。

【0467】

開示される複合体の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドおよび／もしくはCLDN6ポリペプチドであるか、またはそれを含む。

【0468】

開示される複合体の一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカーシグネチャーの同じ標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする。

【0469】

開示される複合体の一部の実施形態では、同じ表面バイオマーカーは、CEACAM6であるか、またはそれを含む。

【0470】

開示される複合体の一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブのオリゴヌクレオチドドメインは、異なる。

【0471】

開示される複合体の一部の実施形態では、少なくとも2つの検出プローブの標的結合部分は、標的バイオマーカーシグネチャーの別個の標的バイオマーカーをそれぞれ対象にする。

【0472】

開示される複合体の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドおよび／もしくはSLC34A2ポリペプチドであるか、またはそれを含み、少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびEPCAMを対象にする。

【0473】

開示される複合体の一部の実施形態では、細胞外小胞関連表面バイオマーカーは、CEACAM5ポリペプチドであるか、またはそれを含み、少なくとも2つの検出プローブは、それぞれ、CEACAM6およびSLC34A2を対象にする。

【0474】

開示される複合体の一部の実施形態では、固体基材は、磁気ビーズを含む。

【0475】

10

20

30

40

50

開示される複合体の一部の実施形態では、標的捕捉部分は、抗体剤であるか、またはそれを含む。

【0476】

開示される複合体の一部の実施形態では、複合体は、(a) その表面上に少なくとも1つの標的バイオマーカーを有するエキソソーム；ならびに (b) エキソソームにそれぞれ結合した第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブのそれぞれが、(i) エキソソームによって発現される標的バイオマーカーを対象にする標的結合部分；ならびに (ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、第1および第2の検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、互いにハイブリダイズする、オリゴヌクレオチドドメインを含む、第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む。

10

【0477】

開示される複合体の一部の実施形態では、複合体は、少なくとも2つのプローブのセットに結合したヒト血液由来の細胞外小胞を含み、そのそれぞれは、バイオマーカー結合部分およびオリゴヌクレオチドドメインを含み、2つまたはそれよりも多くの結合したプローブが、それらのオリゴヌクレオチドドメインが互いにハイブリダイズして、ライゲーション可能なハイブリッドを形成するように、互いに近位にある。

【0478】

20

開示される複合体の一部の実施形態では、複合体は、(a) がん関連標的バイオマーカーシグネチャーを含むエキソソーム；ならびに (b) エキソソームにそれぞれ結合した少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブであって、検出プローブのそれぞれが、(i) 標的バイオマーカーシグネチャーを対象にする標的結合部分；ならびに (ii) 標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメインであって、オリゴヌクレオチドドメインが、二本鎖部分、およびオリゴヌクレオチドドメインの一方の末端から伸びた一本鎖オーバーハング部分を含み、検出プローブの一本鎖オーバーハング部分が、少なくとも部分的に相補的である、オリゴヌクレオチドドメインを含む、少なくとも第1の検出プローブおよび第2の検出プローブを含む。

【0479】

30

本明細書の開示の一態様は、プローブのそれぞれのセットが、(a) がん細胞由来の細胞外小胞上の表面バイオマーカーに特異的に結合するバイオマーカー結合部分；ならびに (b) オリゴヌクレオチドドメインであって、セット内のプローブのオリゴヌクレオチドドメインが、プローブがそれらの標的バイオマーカーに結合する場合に、それらのオリゴヌクレオチドドメインが、互いにハイブリダイズして、標的バイオマーカーが互いに近位にある場合にのみライゲーション可能なハイブリッドを形成するように、配列および構築される、オリゴヌクレオチドドメインを含む、請求項1〜71のいずれか一項に記載の方法、キット、または複合体における使用のためのプローブのセットである。

【0480】

本発明の他の特色は、例示的な実施形態の以下の記載の過程で明らかになり、これは、本発明の説明のために与えられ、それを限定することを意図するものではない。

40

【実施例】

【0481】

例示

(実施例1)

肺がんと関連する個々の細胞外小胞における例示的な標的バイオマーカーシグネチャーの検出

本実施例は、標的結合部分、およびその標的結合部分にカップリングされたオリゴヌクレオチドドメイン（二本鎖部分および一本鎖オーバーハングを含む）をそれぞれ含む、標的（例えば、標的バイオマーカー）のための検出プローブの合成を記載する。本実施例は

50

、2つまたはそれよりも多くの別個の標的を含む生物学的実体（例えば、細胞外小胞）の存在または非存在を検出するためのそのような検出プローブの使用をさらに実証する。

【0482】

一部の実施形態では、検出プローブは、一方の末端に標的がんバイオマーカーに特異的な抗体剤、および別の末端に一本鎖オーバーハングを有する二本鎖オリゴヌクレオチドを含むことができる。2つまたはそれよりも多くの検出プローブが、同じ生物学的実体（例えば、細胞外小胞）に結合する場合、検出プローブの一本鎖オーバーハングは、それらが互いにハイブリダイズして、その後にライゲーションされ、検出のために増幅され得る二本鎖複合体を形成することができるように、近接している。

【0483】

この研究は、セットにおいて少なくとも2つの検出プローブを用いた。一部の実施形態では、そのような少なくとも2つの検出プローブは、同じ標的バイオマーカーを対象にしてもよい。一部の実施形態では、同じ標的を対象にするそのような少なくとも2つの検出プローブは、同じ標的の異なるエピトープまたは同じ標的の同じエピトープを対象にする。一部の実施形態では、そのような少なくとも2つの検出プローブは、別個の標的を対象にする。本開示を読む当業者は、2つの検出プローブが、異なる標的バイオマーカーを対象にし得ること、または別個の標的タンパク質をそれぞれ対象にする3つもしくはそれよりも多くの検出プローブが使用されてもよいことを理解するであろう。さらに、この実施例に記載される組成物および方法は、異なる生体試料（例えば、細胞外小胞を含む）における適用に拡大することができる。

【0484】

本実施例は、本明細書に提供される技術が、本明細書に記載される例示的なバイオマーカーの組合せ（例えば、SLC34A2、CEACAM5、CEACAM6、およびEpCAM、例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載される二重システムアッセイを使用してPBS中でCEACAM6+CEACAM6細胞外小胞によるSLC34A2捕捉を使用する）を使用して、患者試料において肺がん（例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌）を検出することができることを実証するある特定の実験からの実験データを示す。例えば、図1および2を参照されたい。

【0485】

細胞株由来細胞外小胞（CLD-EV）を検出することができるそのような二重システムアッセイを用いて、それぞれのステージ（ステージI～IV）および／またはサブタイプの肺がんを有する患者の主要コホート（図4を参照されたい）、ならびにさまざまな対照群（例えば、健康な対照）からの患者試料を含有する研究を行った。

【0486】

例示的アッセイの概観

一部の実施形態では、本明細書に記載される標的実体検出システムは、二重システムである。一部の実施形態では、そのような二重システムは、例えば、図2に図示されるように、異なるエピトープをそれぞれ認識する2つの抗体を利用する。対形成した二本鎖鋳型DNAも、qPCRにおいて利用され、そのそれぞれは、そのパートナー上の5'オーバーハングに相補的な特異的4塩基5'オーバーハングを有する。それぞれの抗体は、2つの二本鎖DNA鋳型の一方とコンジュゲートされる。抗体がそれらの標的エピトープに結合すると、個々の鋳型の付着末端は、ハイブリダイズし得る。次いで、これらの付着末端は、PCR増幅前に、T7リガーゼによって一緒にライゲーションされる。2つのDNA鋳型間のハイブリダイゼーションが起こるために、2つの抗体は、互いに十分に近く結合する必要がある（50～60nm以内のDNAリンカーおよび抗体の長さ）。結合しているが、ライゲーションされていないままである任意の鋳型は、図2に示されるように、PCR産物を生成しない。

【0487】

健康な対照対ステージI、II、III、およびIV肺腺癌血漿：

健康な対照および肺腺癌（LUAD）患者由来の血漿試料を、処理して、精製された細

10

20

30

40

50

胞外小胞を得、これを、下記に記載される例示的なアッセイを使用して、調べた。

【0488】

精製されたEVを、抗SLC34A2または抗CEACAM5抗体と共有結合的にコンジュゲートされた磁気ビーズを使用して捕捉した。ビーズによって捕捉されたEVを、標的バイオマーカー（例えば、CEACAM6、EPCAM、またはSLC34A2）および別個のオリゴヌクレオチドドメイン（例えば、本明細書に記載されるもの）を対象にする抗体をそれぞれ含む、2つの検出プローブのセットを使用してプロファイリングした。

【0489】

バイオマーカーの組合せを、健康な組織由来細胞外小胞との交差反応性を最小化するように、注意深く選択し、これは、(i) SLC34A2およびCEACAM6、(ii) SLC34A2、CEACAM6、およびEPCAM、ならびに(iii) CEACAM5、CEACAM6、およびSLC34A2であった。そのようなバイオマーカーの組合せと健康な組織との交差反応性を、一部では、肺腺癌における差次的発現mRNAのヒートマップを使用することによって、バイオインフォマティクスで予測した。したがって、マーカーの異なる組合せは、健康な組織由来の細胞外小胞の表面上よりも肺がん細胞外小胞の表面上ではるかに多く存在すると予測され得る。一部の実施形態では、そのようなバイオマーカーの組合せは、(i) SLC34A2捕捉プローブおよびCEACAM6+CEACAM6検出プローブ、(ii) SLC34A2捕捉プローブおよびCEACAM6+EPCAM検出プローブ、ならびに(iii) CEACAM5捕捉プローブおよびCEACAM6+SLC34A2検出プローブから選択され得る。表1は、肺がん細胞株対陰性対照細胞株（例えば、非肺がん細胞株）において表される、示されたバイオマーカーの転写物発現スコアを表す。

【表1】

表1.ある特定の肺がん細胞株対陰性対照細胞株(例えば、非肺がん株)において表される、以下のバイオマーカーの組合せについての転写物発現スコア

遺伝子	肺がん細胞株1	陰性非肺がん
CEACAM6	++++	-
SLC34A2	+++	-
EPCAM	+++	+
CEACAM5	++	-

【0490】

例示的方法：

オリゴヌクレオチド

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、以下の配列構造および改変を有することができる。下記の鎖番号が、図2に示される鎖と関連する数値に対応することに留意されたい。

鎖1 v1：

【化87】

/5AzideN/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGG
CTAGACAGAGGTGT

（ここで、/5AzideN/は、NHSEステルリンカーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す）、または

【化88】

/5AmMC12/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGG
CTAGACAGAGGTGT

(ここで、／ 5 A m M C 1 2 ／は、12炭素スパーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基(例えば、第一級アミノ基)を指す)、または

【化89】

/5ThiolMC6/CAGTCTGACACAGCAGTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCCTTGACATCCGTGACT
GGCTAGACAGAGGTGT

(ここで、／ 5 T h i o l M C 6 ／は、6炭素スパーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)。

鎖2 v1:

10

【化90】

/5AzideN/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCT
CCTGGTCTCACTAG

(ここで、／ 5 A z i d e N ／は、NHSエステルリンカーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す)、または

【化91】

/5AmMC12/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCT
CCTGGTCTCACTAG

20

(ここで、／ 5 A m M C 1 ／は、12炭素スパーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基(例えば、第一級アミノ基)を指す)、または

【化92】

/5ThiolMC6/GACCTGACCTACAGTGACCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGG
CTCCTGGTCTCACTAG

(ここで、／ 5 T h i o l M C 6 ／は、6炭素スパーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)

30

鎖3 v1:

【化93】

/5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGGATGTCAAGGGTAGCAGCGACGATTAACGA
CTGCTGTGTCTCAGACTG

(ここで、／ 5 P h o s ／は、5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖4 v1:

40

【化94】

/5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAACTGGACAGTGGCTAATCAGGCAAGGCTATGGT
CACTGTAGGTCAGGTC

(ここで、／ 5 P h o s ／は、5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖5 v1:

【化95】

CAGTCTGACACAGCAGTCGT

鎖6 v1:

50

【化 9 6】

GACCTGACCTACAGTGACCA

鎖 7 (プローブ) v 1 :

【化 9 7】

/56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/

(ここで、/56-FAM/は、5'オリゴヌクレオチド末端のフルオレセイン(例えば、6-FAM)を指し、/3IABkFQ/は、3'オリゴヌクレオチド末端のフルオレセインクエンチャーを指す)

10

【0491】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、以下の配列構造および改変を有することができる。下記の鎖番号が、図2に示される鎖と関連する数値に対応することに留意されたい。

鎖 1 v 2 :

【化 9 8】

/5AzideN/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGG
CTAGACAGAGGTGT

20

(ここで、/5AzideN/は、NHSエステルリンカーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す)、または

【化 9 9】

/5AmMC12/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACTGG
CTAGACAGAGGTGT

(ここで、/5AmMC12/は、12炭素スペーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基(例えば、第一級アミノ基)を指す)、または

30

【化 100】

/5ThiolMC6/CAGTCTGACTCACCCTCGTTAATCGTCGCTGCTACCCTTGACATCCGTGACT
GGCTAGACAGAGGTGT

(ここで、/5ThiolMC6/は、6炭素スペーサーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)

鎖 2 v 2 :

【化 101】

40

/5AzideN/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCT
CCTGGTCTCACTAG

(ここで、/5AzideN/は、NHSエステルリンカーを介して5'オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す)、または

【化 1 0 2】

/5AmMC12/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGGCT
CCTGGTCTCACTAG

(ここで、／ 5 A m M C 1 ／ は、1 2 炭素スパーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基 (例えば、第一級アミノ基) を指す)、または

【化 1 0 3】

/5ThiolMC6/CACCAGACCTACGAAGTCCATAGCCTTGCCTGATTAGCCACTGTCCAGTTTGG
CTCCTGGTCTCACTAG

10

(ここで、／ 5 T h i o l M C 6 ／ は、6 炭素スパーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)

鎖 3 v 2 :

【化 1 0 4】

/5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGGATGTCAAGGGTAGCAGCGACGATTAACGA
GTGGTGAGTCAGACTG

20

(ここで、／ 5 P h o s ／ は、5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖 4 v 2 :

【化 1 0 5】

/5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAACTGGACAGTGGCTAATCAGGCAAGGCTATGGA
CTTCGTAGGTCTGGTG

(ここで、／ 5 P h o s ／ は、5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖 5 v 2 :

【化 1 0 6】

CAGTCTGACTCACCCTCGT

30

鎖 6 v 2 :

【化 1 0 7】

CACCAGACCTACGAAGTCCA

鎖 7 (プローブ) v 2 :

【化 1 0 8】

/56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/

40

(ここで、／ 5 6 - F A M ／ は、5 ' オリゴヌクレオチド末端のフルオレセイン (例えば、6 - F A M) を指し、／ 3 I A B k F Q ／ は、3 ' オリゴヌクレオチド末端のフルオレセインクエンチャーを指す)

【0 4 9 2】

一部の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、以下の配列構造および改変を有することができる。下記の鎖番号が、図 2 に示される鎖と関連する数値に対応することに留意されたい。

鎖 1 v 1 - m e d :

50

【化 1 0 9】

/5AzideN/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT

(ここで、/ 5 A z i d e N / は、N H S エステルリンカーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す)、または

【化 1 1 0】

/5AmMC12/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT

(ここで、/ 5 A m M C 1 2 / は、1 2 炭素スペーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基 (例えば、第一級アミノ基) を指す)、または

【化 1 1 1】

/5ThiolMC6/CAGTCTGACACAGCAGTCGTGACTGGCTAGACAGAGGTGT

(ここで、/ 5 T h i o l M C 6 / は、6 炭素スペーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)。

鎖 2 v l - m e d :

【化 1 1 2】

/5AzideN/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG

(ここで、/ 5 A z i d e N / は、N H S エステルリンカーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたアジド基を指す)、または

【化 1 1 3】

/5AmMC12/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG

(ここで、/ 5 A m M C 1 / は、1 2 炭素スペーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたアミン基 (例えば、第一級アミノ基) を指す)、または

【化 1 1 4】

/5ThiolMC6/GACCTGACCTACAGTGACCATTGGCTCCTGGTCTCACTAG

(ここで、/ 5 T h i o l M C 6 / は、6 炭素スペーサーを介して 5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたチオールを指す)

鎖 3 v l - m e d :

【化 1 1 5】

/5Phos/GAGTACACCTCTGTCTAGCCAGTCACGACTGCTGTGTCAGACTG

(ここで、/ 5 P h o s / は、5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖 4 v l - m e d :

【化 1 1 6】

/5Phos/ACTCCTAGTGAGACCAGGAGCCAATGGTCACTGTAGGTCAGGTC

(ここで、/ 5 P h o s / は、5 ' オリゴヌクレオチド末端に連結されたリン酸基を指す)

鎖 5 v l :

【化 1 1 7】

CAGTCTGACACAGCAGTCGT

鎖 6 v l :

【化 1 1 8】

GACCTGACCTACAGTGACCA

鎖 7 (プローブ) v 1 :

【化 1 1 9】

/56-FAM/TGGCTAGAC/ZEN/AGAGGTGTACTCCTAGTGAGA/3IABkFQ/

(ここで、/56-FAM/は、5'オリゴヌクレオチド末端のフルオレセイン(例えば、6-FAM)を指し、/3IABkFQ/は、3'オリゴヌクレオチド末端のフルオレセインクエンチャーを指す)。

抗体-オリゴヌクレオチド(例えば、抗体-DNA)コンジュゲーション:

【0493】

25~100 μgの範囲の抗体アリコート、オリゴヌクレオチド鎖とコンジュゲートした。例えば、60 μgの抗体のアリコートを、例えば、銅不含クリックケミストリーを使用して、ハイブリダイズされた鎖1+3および2+4とコンジュゲートした。第1のステップは、アジド改変オリゴヌクレオチドドメイン(例えば、DNAドメイン)とのコンジュゲーション反応に参与するDBCO官能化抗体を調製することであった。これは、抗体をDBCO-PEG5-NHSヘテロ二官能性架橋剤と反応させることにより開始した。NHSエステルと利用可能なリシン基との間の反応を、室温で2時間行い、その後、未反応の架橋剤を、遠心限外濾過を使用して除去した。コンジュゲーションを完了するために、アジド改変オリゴヌクレオチドドメイン(例えば、DNAドメイン)およびDBCO官能化抗体を、室温で終夜反応させた。コンジュゲートされた抗体の濃度を、例えば、Qubitタンパク質アッセイを使用して測定した。

【0494】

細胞培養

陰性対照細胞(例えば、非肺がん細胞、例えば、黒色腫細胞または健康な細胞)を、10%のエキソソーム不含FBSおよび1 mLあたり50単位のペニシリン/ストレプトマイシンを有するイーグル最小必須培地(EMEM)中で成長させた。肺腺癌細胞を、10%のエキソソーム不含FBSおよび1 mLあたり50単位のペニシリン/ストレプトマイシンを有するRoswell Park Memorial Institute(RPMI 1640)中で成長させた。肺がんの検出のためのアッセイ(例えば、本明細書に記載されるもの)を開発するために有用であり得る例示的な肺がん細胞株としては、限定されるものではないが、HCC4006、PC9、LO68、LUDLU-1、CORL105、SKLU1、SKMES1、NCI-H727、LC-2/AD、NCIH358、Chago-K-1、MOR/CPR、MOR/0.4R、MOR/0.2R、NCIH-322、ならびに本明細書に記載される目的のために参照により本明細書に組み込まれるGazdar et al., "Lung Cancer Cell Lines as Tools for Biomedical Discovery and Research" Journal of the National Cancer Institute: 2010 September 8; 102(17): 1310-1321に記載され、論じられた細胞株が挙げられる。すべての細胞株を、5%のCO₂および37°Cで維持し、継代数は、20を下回った。

【0495】

細胞培養培地からの細胞外小胞の精製

一部の実施形態では、肺がん細胞および陰性対照細胞を、それらが約80%のコンフルエンスに達するまで、それらの個々の培地中で成長させ得る。細胞培養培地を、収集し、300RCFで5分間、室温(RT)でスピンさせて、細胞およびデブリを除去し得る。次いで、上清を、収集し、本明細書に記載されるようにしてアッセイにおいて使用し得るか、または-80°Cで凍結し得る。

10

20

30

40

50

解凍

【0496】

使用前に、試料が -80°C で貯蔵されていた場合、それらを解凍する。簡潔には、凍結条件付け培地を含有する50 mLの管を、プラスチックラックに置き、ラックを空のアイスバケットに置く。室温(RT)の水を添加し、試料を、解凍を促進するために周期的に反転／振とうして、解凍させる。管を、それぞれの細胞株についてのすべての管が同じ体積であるように、固定する。典型的な精製体積は、細胞株あたりおよそ200 mLの使用済み培地である。より大きなバッチが所望される場合、この体積は増加させることができる。

【0497】

清澄化

一部の実施形態では、試料を、使用前に清澄化する。培地の清澄化は、細胞およびデブリを除去する役割を果たす。簡潔には、1) 1300 RCFで10分間スピンし；ピペットを使用して、上清を新しい50 mLのコニカル管に移し、約1 cmの培地を残し（ペレットを乱すのを回避するため）、残った培地をデカンテーションしない；2) 2000 RCFで30分間スピンし；ピペットを使用して、上清を新しい50 mLのコニカル管に移し、約1 cmの培地を残し（ペレットを乱すのを回避するため）、残った培地をデカンテーションしない。

【0498】

培地を濃縮する

一部の実施形態では、試料は濃縮される。簡潔には、1) 単一の15 mLの10 kDa MWCOフィルターを、およそ100 mLの培地のために使用する（例えば、200 mLのバッチのために、2つの10 kDa MWCO限外濾過管が必要である）。一部の実施形態では、同じ限外濾過カラムを、連続して加え、再スピンして、大体積の培地の濃縮を可能にし得る。一般に、カラムは、製造業者のプロトコールに従って利用した。カラムを、最大スピード（2500～4,300 RCF）で、各回10～12分間スピンする。2) 同じ使用済み培地を含有する2つの管のそれぞれが約1500 μL に達したら、2つの管を1つに合わせ、すぐに、空になった管をバランスとして利用してもよい。3) 濃縮された培地を除去する場合、濃縮チャンバーの側面を流して、捕捉されたEVを可能な限り多く放出させ、起泡を回避しながら、強化培地を、1 mL残るまで濃縮することができる。4) 培地を、1.5 mLのprotein LoBind管に移し、1 mLの線をマークし、必要な場合、体積を、20 nmで濾過された1×PBSで1 mLに補正する。

【0499】

最終清澄化スピン

任意の残ったデブリを除去するために、濃縮された培地を、卓上エッペンドルフ遠心分離機において、10,000 RCFで10分間、 21°C で遠心分離することができる。

【0500】

濃縮された培地を調製されたIZONカラムに流す

Izonカラムを、製造業者によって記載されたようにして洗浄し、20 nmで濾過された1×PBSを使用して、カラムを洗浄し試料を回収することができる。1 mLの濃縮された使用済み培地をカラムに流すことができ、画分を、製造業者のプロトコールに従って、5 mLのエッペンドルフフリップキャップ管に収集することができる（例えば、画分7、8、および9）。

【0501】

粒子カウント：

粒子カウントは、65～1000 nmのナノ粒子範囲を測定するために、例えば、TS400チップを使用するSpectraDyne粒子計数器を使用して、得た。一部の実施形態では、65 nmよりも小さいか、または1000 nmよりも大きい粒子径が望ましくあり得る。

【0502】

10

20

30

40

50

患者血漿プールの作成：

一部の実施形態では、プールされた患者血漿プールを利用した。簡潔には、1 mLの患者血漿のアリコート、室温で少なくとも30分間解凍した。管を、短時間、ボルテックスし、スピンドウンして、血漿をそれぞれの管の底部に固定した。所与の患者コホートからの血漿試料を、適切にサイジングされた容器中で合わせ、転倒混合によって完全に混合した。それぞれの血漿プールを、Protein Lo-bindの1.5 mLのエッペンドルフ管中、1 mLのアリコートに分け、 -80°C で再凍結した。

【0503】

全血漿清澄化（必要に応じた）：

一部の実施形態では、EV精製の前に、試料は、試料の取り扱いに関与しないであろう人によって盲検化された。患者同定情報は、実験が完了して、データ解析が可能になった後にのみ、明らかにされた。全血漿の1 mLのアリコートを、 -80°C での貯蔵から取り出し、3回の清澄化スピンの付して、細胞、血小板、およびデブリを除去した。

【0504】

清澄化された血漿からのEVのサイズ排除クロマトグラフィー精製：

それぞれの清澄化された血漿試料（個々の試料またはプールされた試料）を、使い捨てのサイズ排除精製カラムに流して、EVを単離した。約65 nm～約1000 nmのサイズ範囲を有するナノ粒子を、それぞれの試料について収集した。一部の実施形態では、65 nmよりも小さいか、または1000 nmよりも大きい粒子径が望ましくあり得る。

【0505】

磁気捕捉ビーズへの捕捉－抗体コンジュゲーション：

抗体を、磁気ビーズ（例えば、エポキシ官能化Dynabeads（商標））にコンジュゲートした。簡潔には、ビーズを、無菌環境下で秤量し、緩衝液に再懸濁した。抗体を、ビーズ1 mgあたりおよそ8 μg のAbで官能化ビーズと混合し、コンジュゲーション反応を、転倒混合で、 37°C で終夜、行った。ビーズを、コンジュゲーションキットによって提供された洗浄緩衝液を使用して数回洗浄し、提供された貯蔵緩衝液中 4°C で、またはグリセロールベースの貯蔵緩衝液中 -20°C で、貯蔵した。

【0506】

抗体－コンジュゲート化磁気ビーズを使用する精製された血漿EVの直接捕捉：

ある特定の実施形態では、精製された血漿EVを、清澄化血漿試料から直接捕捉した。例えば、SLC34A2またはCEACAM5捕捉のために、精製された血漿EVの希釈試料を、個々の抗体とコンジュゲートされた磁気ビーズとともに、適切な時間、適切な温度、例えば、室温でインキュベートした。

【0507】

磁気捕捉ビーズ上に結合したEVへの抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートの結合：

抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート（例えば、抗SLC34A2、CEACAM6、またはEPCAM抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲート；「抗体プローブ」）を、適切な緩衝液中、それらの最適な濃度で希釈した。抗体プローブを、磁気捕捉ビーズ上に結合したEVを含む試料と相互作用させた。

【0508】

結合後洗浄：

一部の実施形態では、試料を、適切な緩衝液中で、例えば、複数回洗浄した。

【0509】

ライゲーション：

洗浄して未結合抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを除去した後、結合した細胞外小胞および結合した抗体－オリゴヌクレオチドコンジュゲートを有するビーズを、ライゲーションミックスと接触させた。混合物を、室温で20分間、インキュベートした。

【0510】

PCR：

ライゲーション後、結合した細胞外小胞および結合した抗体－オリゴヌクレオチドコン

10

20

30

40

50

ジュゲートを有するビーズを、PCRミックスと接触させた。PCRを、96ウェルプレートにおいて、例えば、Quant Studio 3において、以下の例示的なPCRプロトコルを用いて行った：95℃で1分間保持し、95℃で5秒間および62℃で15秒間の50サイクルを行った。温度変化の速度を、標準（例えば、1秒あたり2℃）であるように選択した。単一qPCR反応を、それぞれの実験反復について行い、ROXを、qPCRシグナルを正規化するためのパッシブ参照として使用した。次いで、データを、Quant Studio 3 machineからダウンロードし、Python 3.7において解析し、プロットした。

【0511】

データ解析：

一部の実施形態では、2項分類システムを、データ解析のために使用することができる。一部の実施形態では、検出アッセイからのシグナルを、参照シグナルに基づいて正規化し得る。例えば、一部の実施形態では、単一抗体二重鎖についての正規化シグナルを、参照試料を選択することによって計算した。一部の実施形態では、任意の試料*i*についての正規化シグナルを計算するために使用された式を下記に示し、ここで、シグナル_{max}は、最高濃度の細胞株EV標準からのシグナルである。

【数1】

$$\Delta Ct_i = Ct_{ref} - Ct_i$$

$$\text{シグナル}_i = 2^{\Delta Ct_i}$$

$$\text{正規化シグナル}_i = \frac{\text{シグナル}_i}{\text{シグナル}_{max}}$$

【0512】

代表的な結果：

L U A D細胞株の実験

精製された細胞株EVを、適切な緩衝液に、最適な濃度まで希釈し、適切な捕捉プローブ（例えば、抗SLC34A2官能化ビーズまたは抗CEACAM5官能化ビーズ（1mL反復））を使用して捕捉した。捕捉されたEVを、抗体プローブ（例えば、本明細書に記載される通り）を使用して分析した。2つのマーカーの発現と十分に相関するシグナル強度で、本明細書に記載されるバイオマーカーの組合せ（例えば、本実施例に記載されるおよび図1～2に示されるような、例えば、例示的なアッセイとの組合せ）が、陰性対照細胞株からL U A D由来EVを識別することができることが観察された（表1を参照されたい）。

【0513】

L U A Dパイロット患者血漿研究

L U A D患者血漿試料のパイロット研究に含まれる患者の人口統計を、図4に提供する。異なる試料コホート間で可能な限り近く、年齢および性別がマッチするように注意した。

【0514】

1ミリリットルまたはそれ未満（例えば、500μlもしくはそれ未満、400μlもしくはそれ未満、300μlもしくはそれ未満、200μlもしくはそれ未満、または100μlもしくはそれ未満）の患者試料血漿の反復を、上記に記載されたようにして清澄化し、EVを、サイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。EVを、抗SLC34A2磁気ビーズまたは抗CEACAM5磁気ビーズを使用して捕捉した。抗SLC34A2磁気ビーズによって捕捉されたEVを、CEACAM6+CEACAM6検出プローブまたはCEACAM6+EPCAM検出プローブを使用してプロファイリングした（図5および6を参照されたい）。抗CEACAM5磁気ビーズによって捕捉されたEVを、

10

20

30

40

50

C E A C A M 6 + S L C 3 4 A 2 検出プローブを使用してプロファイリングした（図 7 を参照されたい）。

【0515】

議論：

本実施例は、>99%の特異度で、肺腺癌を検出することが可能であり得る、本明細書に記載されるアッセイにおけるバイオマーカーの組合せ（例えば、S L C 3 4 A 2 + C E A C A M 6、またはS L C 3 4 A 2 + C E A C A M 6 + E P C A M、またはC E A C A M 5 + C E A C A M 6 + S L C 3 4 A 2の組合せ）（例えば、本実施例に記載されるおよび図 1～2 に示される二重アッセイと組み合わせで）の使用を記載する。一部の実施形態では、バイオマーカーの組合せは、S L C 3 4 A 2 捕捉およびC E A C A M 6 + C E A C A M 6 検出プローブを含む。一部のそのような実施形態では、バイオマーカーの組合せは、S L C 3 4 A 2 捕捉およびC E A C A M 6 + E p C A M 検出プローブを含む。一部のそのような実施形態では、バイオマーカーの組合せは、C E A C A M 5 捕捉およびC E A C A M 6 + S L C 3 4 A 2 検出プローブを含む。一部の実施形態では、アッセイにおける2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの組合せの使用は、アッセイの特異度および／または感度を増加させ得る。

10

【0516】

一部の実施形態では、抗体あたり合計で16の鎖のオリゴヌクレオチドドメイン（例えば、DNA）になり得るデンドロンを、例えば、シグナル対ノイズを増強するために、抗体あたり1つまたは2つの鎖のDNAの代わりに使用することができる。

20

【0517】

（実施例2）

肺がん検出のためのバイオマーカーシグネチャーの実施形態

一部の実施形態では、S L C 3 4 A 2、C E A C A M 5、C E A C A M 6、および／またはE P C A Mを含むバイオマーカーの組合せ（例えば、一部の実施形態では、S L C 3 4 A 2 捕捉およびC E A C A M 6 + C E A C A M 6 検出プローブ、またはS L C 3 4 A 2 捕捉およびC E A C A M 6 + E P C A M 検出プローブ、またはC E A C A M 5 捕捉およびC E A C A M 6 + S L C 3 4 A 2 検出プローブ）を、例えば、健康な対照、ステージ I L U A D；ステージ II L U A D；ステージ III L U A D；およびステージ IV L U A Dを含む、さまざまな対象集団における肺がんの検出（例えば、実施例1に記載されるアッセイに従う）のために使用した。

30

【0518】

一部の実施形態では、本明細書に記載される2つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの組合せを、例えば、アッセイの感度を増加させるために、肺がんの検出のために一緒に使用してもよい。例えば、一部の実施形態では、肺がん検出のためのアッセイは、少なくとも2つのバイオマーカーの組合せを含んでいてもよく、ここで、そのような少なくとも2つのバイオマーカーの組合せは、本明細書に記載される異なるバイオマーカーの組合せ（例えば、限定されるものではないが、表4～5に含まれるもの）をそれぞれ含んでいてもよい。

【0519】

一部の実施形態では、本明細書に記載される3つまたはそれよりも多くのバイオマーカーの組合せを、例えば、アッセイの感度を増加させるために、肺がんの検出のために一緒に使用してもよい。例えば、一部の実施形態では、肺がん検出のためのアッセイは、少なくとも3つのバイオマーカーの組合せを含んでいてもよく、ここで、そのような少なくとも3つのバイオマーカーの組合せは、本明細書に記載される異なるバイオマーカーの組合せ（例えば、限定されるものではないが、表4～5に含まれるもの）をそれぞれ含んでいてもよい。

40

【0520】

（実施例3）

細胞外小胞（EV）表面バイオマーカーの肺がんバイオマーカーとしての査定

50

一部の実施形態では、肺がん検出は、細胞外小胞の免疫親和性捕捉後の少なくとも E V 表面バイオマーカの検出を含む。

【0521】

一部の実施形態では、細胞外小胞上に存在する 1 つまたは複数の表面バイオマーカまたは細胞外膜バイオマーカ（「捕捉バイオマーカ」）を、肺がん関連細胞外小胞の免疫親和性捕捉のために使用することができる。そのような捕捉バイオマーカの例としては、限定されるものではないが、

【化120】

ALCAM, B3GNT3, CDCP1, CDH1,

10

【化121】

CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CLDN3, CLDN4, DSG2, EGFR, EPCAM, FOLR1, IG1FR, GJB1, GJB2, LAMB3, MET, MSLN, MUC1, PIGT, PODXL2, ROS1, SDC1, SLC34A2, SMPDL3B, ST14, sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、TACSTD2, TMPRSS4, TSPAN8, TNFRSF10B,

および／またはその組合せが挙げられ得る。そのような捕捉バイオマーカの追加例としては、限定されるものではないが、シアリル T n (s T n) 抗原、シアリル - 6 T 抗原 (6 - シアリルコア 1) 、 T 抗原、

20

30

40

50

【化 1 2 2】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン 抗原、ADGRF1, ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAT2, FAM241B, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYP3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYLT1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174 抗原、シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知) 抗原、NeuGcGM3,

10

20

30

40

50

およびその組合せが挙げられ得る。

【0 5 2 2】

一部の実施形態では、EV イムノアッセイ方法論（例えば、本明細書、例えば、実施例 1 に記載されるもの）およびバイオマーカー検証プロセス（例えば、本明細書、例えば、実施例 1 に記載されるもの）を使用して、肺がんのための追加の表面バイオマーカーを査定することができる。一部の実施形態では、捕捉バイオマーカー（例えば、肺がん関連 EV に存在する表面バイオマーカー）を対象にする抗体を、磁気ビーズにコンジュゲートし、必要に応じて、最初に細胞株 EV、次いで、患者試料で、特異的標的タンパク質に結合するその能力について評価する。抗体コーティングビーズを、肺がん関連 EV を捕捉するその能力について査定し、抗体コーティングビーズによって捕捉された EV を、標的実体検出システム（例えば、標的マーカーをそれぞれ対象にする 2 つの検出プローブのセット（例えば、本明細書に記載される通り）を含む本明細書に記載される二重システム）を使

用して読み取る。

【 0 5 2 3 】

一部の実施形態では、捕捉された E V は、以下の表面バイオマーカー：

【 化 1 2 3 】

ADGRF1, ALCAM, ABCC3, ARSL, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2, EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1, GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B, LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM, PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2, Lewis X 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, TACSTD2, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1,

10

およびその組合せのうちの少なくとも 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、捕捉された E V は、その少なくとも 2 つが、以下の表面バイオマーカー：

20

【 化 1 2 4 】

ADGRF1, ALCAM, ABCC3, ARSL, B3GNT3, B3GNT5, CDCP1, CDH1, CDH3, CD55, CD274 (PD-L1), CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, DMBT1, DSG2, EGFR, EPCAM, EPHX3, EVA1A, FAM241B, FOLR1, FXYD3, GALNT14, GJB1, GJB2, GPC4, HAS3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, IG1FR, LAMB3, LAPTM4B, LARGE2, LFNG, LSR, MAL2, MANEAL, MET, MSLN, MUC1, MUC21, NRCAM, PIGT, PODXL2, PRRG4, PRSS21, ROS1, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SLC34A2, Lewis X 抗原、シアリル Lewis X 抗原、sTn 抗原、Tn 抗原、T 抗原、SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SLC7A11, SMIM22, SMPDL3B, ST14, TACSTD2, TMC4,

30

【 化 1 2 5 】

TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TNFRSF10B, TSPAN1, TSPAN8, UCHL1,

およびその組合せのうちの 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、同じ表面をそれぞれ対象にする 2 つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、別個の表面バイオマーカーをそれぞれ対象にする 2 つの検出プローブを含む。

40

【 0 5 2 4 】

一部の実施形態では、捕捉された E V は、以下の表面バイオマーカー：シアリル T n （s T n）抗原、シアリル-6 T 抗原（6-シアリルコア 1）、T 抗原、

50

【化 1 2 6】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOV, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン抗原、ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APL1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYD3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYL1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

10

20

30

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、捕捉されたEVは、その少なくとも2つが、以下の表面バイオマーカー：シアリル T n (s T n) 抗原、シアリル - 6 T 抗原 (6 - シアリルコア1)、T 抗原、

40

【化 1 2 7】

PTK7, TSPAN8, CELSR2, GPC1, ST14, PTPRZ1, GPR87, GJB5, GJB2, RHOF, LYPD3, CLDN7, DSP, SERINC2, ABHD17C, PERP, MPZL2, ITGB4, MEST, GPNMB, SLC35A2, Gb3 (CD77), ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, TMPRSS11D, シアリル Lewis A 抗原 (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), ラクトリアオシルセラミド、(Lc3), フォルスマン抗原、ABCA3, ABCC1, ABCC3, ACBD3, ACSL5, ADGRF1, AGER, ALCAM, AP1M2, APH1A, APOO, ATP11A, ATP11B, ATP1B1, ATP6AP2, B3GNT5, B4GALT4, BCAP31, BSPRY, CD109, CD55, CD9, CDC42, CDH1, CDH3, CDKAL1, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CIP2A, CISD2, CKAP4, CLCA2, CLDN1, CLIC6, CLPTM1L, CLSTN1, CNTN1, CPD, CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, DPY19L1, DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, EGFR, EPCAM, EPHB3, FAM241B, FAT2, FBXO45, FERMT1, FOLR1, FXYP3, FZD6, GALNT1, GALNT3, GALNT5, GALNT6, GALNT14, GGCX, GOLM1, GOLPH3L, GRHL2, HACD3, HAS3, IER3IP1, IGSF3, IL1RAP, ITGA2, ITGB6, KLRG2, KPNA2, KRTCAP3, LAD1, LAMB3, LAMC2, LAMP3, LAMTOR2, LAPTM4B, LARGE2, LCLAT1, LPCAT1, LSR, MAGT1, MAL2, MARCKSL1, MET, MGAT1, MSLN, MUC1, MUC4, NCSTN, NECTIN1, NECTIN4, NRAS, NRCAM, NT5E, NUP210, PARL, PEX13, PIGN, PIGT, PLA2G4A, PLCH1, PLEC, PRSS21, PSMD2, PTDSS1, PTGFRN, PTPRF, QSOX1, RAB25, RAB38, RAB6B, RAP2B, RCC2, RIT1, SCAMP3, SDC1, SEL1L3, SHROOM2, SLC7A11, SLC2A1, SLC34A2, SLC35B2, SLC39A11, SMIM22, SMPDL3B, SOAT1, SPAST, SSR1, SSR4, SURF4, SYNGR2, TACSTD2, TESC, TFRC, TMC5, TMCO1, TMED2, TMED3, TMEM132A, TMEM33, TMPRSS4, TMTC3, TOMM22, TOR1AIP2, TRAM1, TRPV4, TTC33, UGT1A6, UPK1B, VAMP8, VMA21, VRK2, VWA1, XPR1, XXYL1, ADAM28, AXL, BSG, CD274, CD47, CLU, DKK1, ERBB3, FLT4, GM3, HGF, IGF1R, IL6, KDR, LAG3, UCHL1, Lewis X 抗原、Lewis Y/B 抗原、LY6E, NOTCH2, NOTCH3, ホスファチジルセリン、TIGIT, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFSF18, TPBG, VEGFA, Tn 抗原、Lewis Y/CD174, シアリル Lewis X (sLex) (シアリル SSEA-1 (SLX) としても公知), NeuGcGM3,

10

20

30

40

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、同じ表面バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、別個の表面バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。

【0 5 2 5】

（実施例 4）

肺がんバイオマーカーとしての細胞外小胞における mRNA（小胞内 mRNA）の査定
 一部の実施形態では、肺がんの検出は、細胞外小胞の免疫親和性捕捉後の少なくとも小胞内 mRNA の検出を含む。

50

【0526】

一部の実施形態では、細胞外小胞上に存在する1つまたは複数の表面バイオマーカーまたは細胞外膜バイオマーカー（「捕捉バイオマーカー」）、例えば、実施例3に記載される捕捉バイオマーカーを、肺がん関連細胞外小胞の免疫親和性捕捉のために使用することができる。

【0527】

一部の実施形態では、EV核酸検出アッセイ（例えば、プライマー-プローブセットを使用する逆転写PCR）およびバイオマーカー検証プロセス（例えば、本明細書、例えば、実施例1に記載されるもの）を使用して、肺がんについてのmRNAバイオマーカー候補を査定することができる。一部の実施形態では、捕捉バイオマーカー（例えば、肺がん関連EVに存在する表面バイオマーカー）を対象にする抗体を、磁気ビーズにコンジュゲートし、必要に応じて、最初に細胞株EV、次いで、患者試料において、特異的標的バイオマーカーに結合するその能力について評価する。抗体コーティングビーズを、肺がん関連EVを捕捉するその能力について査定し、抗体コーティングビーズによって捕捉されたEVを、それらのmRNA内容物について、例えば、1ステップ定量的逆転写PCR（RT-qPCR）マスターミックスを使用してプロファイリングする。

【0528】

一部の実施形態では、捕捉されたEVは、以下のmRNA：

【化128】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3,
C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3,
CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A,
FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3,
LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,
PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2,
SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7,
SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2,
TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって読み取ることができる。一部の実施形態では、捕捉されたEVは、RT-qPCRを使用する、以下のmRNA：

【化129】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5, ADAM23, ADH7,

10

20

30

40

50

【化 1 3 0】

AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L,
 ANTXR1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2, ASF1B, ATP8B1,
 AURKB, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4,
 CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24, CD53,
 CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3, CDK1,
 CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C,
 CLCA2, CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE,
 CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3, DSC2, DSC3,
 DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2,
 ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3, FAM129B,
 FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G, FERMT1, FGFR2,
 FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3, GJB5, GJB6,
 GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1, HAS3, HCK,
 HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4, ITGB6, IVL,
 JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14,
 KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8,
 KRTCAP3, LAMP3, LAPTM5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3, MAGEA4,
 MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2, MUC1,
 MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2,
 NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR,
 PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C,
 PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25,
 RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2,
 S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2,
 SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1,
 SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A,
 SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1,
 TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4,
 TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A,
 TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6,

10

20

30

40

【化 1 3 1】

TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANG2, WLS, YAP1, ZC3H11A,
 ZNF217, ZNF750,

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれ
 よりも多く）の検出によって読み取ることができる。

【0 5 2 9】

一部の実施形態では、捕捉されたEVは、以下のmRNA：

50

【化 1 3 2】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3,
 C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3,
 CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A,
 FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3,
 LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,
 PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2,
 SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7,
 SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2,
 TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって読み取ることができる。一部の実施形態では、捕捉されたEVは、RT-qPCRを使用する、以下のmRNA：

20

【化 1 3 3】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5, ADAM23, ADH7,
 AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L,
 ANTXR1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2, ASF1B, ATP8B1,
 AURKB, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4,
 CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24, CD53,
 CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3, CDK1,
 CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C,
 CLCA2, CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE,
 CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3, DSC2, DSC3,
 DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2,
 ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3, FAM129B,
 FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G, FERMT1, FGFR2,
 FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3, GJB5, GJB6,
 GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1, HAS3, HCK,
 HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4, ITGB6, IVL,
 JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14,
 KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8,

30

40

50

【化 1 3 4】

KRTCAP3, LAMP3, LAPTM5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3, MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2, MUC1, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR, PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C, PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25, RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1, SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A, TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANGL2, WLS, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

20

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって読み取ることができる。

30

【0 5 3 0】

一部のそのような実施形態では、捕捉されたEVは、(i) RT-qPCRを使用する、以下のmRNA：

【化 1 3 5】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

40

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって；および(ii)検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、その少なくとも1つが、実施例3に記載さ

50

れる E V 表面バイオマーカーのうちの 1 つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする、検出プローブのセットを使用することによって、読み取ることができる。一部のそのような実施形態では、捕捉された E V は、（i）RT-qPCR を使用する、以下の mRNA：

【化 1 3 6】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5,

【化 1 3 7】

ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1,
 ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2,
 ASF1B, ATP8B1, AURKB, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33,
 C1S, C8orf4, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24,
 CD53, CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3,
 CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1,
 CHMP4C, CLCA2, CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA,
 CTSC, CTSE, CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3,
 DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4,
 EMP1, EMP2, ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1,
 F3, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G,
 FERMT1, FGFR2, FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3,
 GJB5, GJB6, GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1,
 HAS3, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4,
 ITGB6, IVL, JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13,
 KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7,
 KRT8, KRTCAP3, LAMP3, LAPTM5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3,
 MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2,
 MUC1, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2,
 NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR,
 PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C,
 PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25,
 RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2,
 S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2,
 SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1,
 SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A,
 SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1,
 TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4,
 TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A,
 TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6,
 TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANG2, WLS, YAP1, ZC3H11A,

10

20

30

40

50

【化 1 3 8】

ZNF217, ZNF750,

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって；および（i i）検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、その少なくとも1つが、実施例3に記載されるEV表面バイオマーカのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする、検出プローブのセットを使用することによって、読み取ることができる。

10

【0 5 3 1】

一部のそのような実施形態では、検出プローブのセットは、EV表面バイオマーカを対象にする少なくとも1つの検出プローブを含む。一部のそのような実施形態では、検出プローブのセットは、同じEV表面バイオマーカ（同じまたは異なるエピトープを有する）を対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。一部のそのような実施形態では、検出プローブのセットは、別個のEV表面バイオマーカを対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、EV表面バイオマーカおよび小胞内mRNAを含む試料を、抗EV表面バイオマーカ抗体が、EV表面バイオマーカに結合する一方で、コンジュゲートされた一本鎖オリゴヌクレオチドが、同じ試料に存在する小胞内mRNAバイオマーカとハイブリダイズするように、小胞内mRNAバイオマーカ（例えば、実施例4に記載される通り）に対する対の2つのプライマーの1つとして機能する一本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、DNA）にコンジュゲートされた抗EV表面バイオマーカ親和性剤（例えば、実施例3に記載されるEV表面バイオマーカを対象にする抗体）と接触させることができる。次いで、対の第2のプライマーおよびRT-qPCRプローブを添加して単一試料中の小胞内mRNAおよびEV表面バイオマーカの存在の検出のためにRT-qPCRを行う。

20

【0 5 3 2】

一部の実施形態では、捕捉されたEVは、以下のmRNA：

【化 1 3 9】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3,

30

C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3,

CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A,

FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3,

LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,

PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2,

SEZ6L2, SFTA2, SFTP1A1, SFTP1A2, SFTP1B, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7,

SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2,

40

TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および実施例5に記載されるEV小胞内バイオマーカのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって読み取ることができる。一部のそのような実施形態では、捕捉されたEVは、（i）RT-qPCRを使用する、以下のmRNA：

50

【化 1 4 0】

ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3, C12orf45,
CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4,

【化 1 4 1】

CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A,
FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3,
LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT,
PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2,
SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7,
SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2,
TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A,

10

20

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって；および（i i）検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、その少なくとも1つが、実施例5に記載される小胞内バイオマーカーのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする、検出プローブのセットを使用することによって、読み取ることができる。

【0 5 3 3】

一部の実施形態では、捕捉されたEVは、以下のmRNA：

30

40

50

【化 1 4 2】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5,
 ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1,
 ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2,
 ASF1B, ATP8B1, AURKB, B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33,
 C1S, C8orf4, CA12, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24,
 CD53, CD74, CD9, CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3,
 CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1,
 CHMP4C, CLCA2, CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA,
 CTSC, CTSE, CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3,
 DSC2, DSC3, DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4,
 EMP1, EMP2, ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1,
 F3, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G,
 FERMT1, FGFR2, FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYP3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3,
 GJB5, GJB6, GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1,
 HAS3, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4,
 ITGB6, IVL, JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13,
 KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7,
 KRT8, KRTCAP3, LAMP3, LAPTM5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3,
 MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2,
 MUC1, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2,
 NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR,

10

20

30

【化 1 4 3】

PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C,
 PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25,
 RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2,
 S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2,
 SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1,
 SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A,
 SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1,
 TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4,
 TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A,
 TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6,
 TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANG2, WLS, YAP1, ZC3H11A,
 ZNF217, ZNF750,

40

50

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および実施例5に記載されるEV小胞内バイオマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって読み取ることができる。一部のそのような実施形態では、捕捉されたEVは、(i) RT-qPCRを使用する、以下のmRNA：

【化144】

ABCA3, ABCC1, ABRACL, ACP5, ADAM23, ADH7, AGR2, AIF1,
 AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, ANTXR1,
 AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, AQP3, AREG, ARNTL2, ASF1B, ATP8B1, AURKB, 10
 B3GNT5, BAIAP2L1, BCAM, BIK, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA12, CA9,
 CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCL5, CCNB2, CD109, CD24, CD53, CD74, CD9,
 CDC20, CDC42EP1, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDCP1, CDH1, CDH3, CDK1, CDKN2A,
 CDKN2B, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CLCA2,
 CLDN1, CLDN4, CLDN7, CNN2, COL17A1, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE,
 CX3CL1, CXADR, CXCR4, CYBB, CYP2S1, CYP4F11, DAPL1, DPYSL3, DSC2, DSC3,
 DSG2, DSG3, DSP, EFNA1, EFS, EGFR, EGLN3, EHD2, EHF, ELF3, ELF4, EMP1, EMP2, 20
 ENAH, EPCAM, EPHA2, EPHB3, EPHX1, ESRP1, EVPL, F11R, F2R, F2RL1, F3, FAM129B,
 FAM60A, FAM83D, FAM83H, FAT1, FAT2, FBLIM1, FBP1, FCER1G, FERMT1, FGFR2,
 FGFR3, FOXE1, FOXM1, FXYD3, GALNT3, GBP6, GJA1, GJB2, GJB3, GJB5, GJB6,
 GNA15, GPC1, GPC3, GPNMB, GPR87, GPRC5A, GPX2, GRHL2, GSTA1, HAS3, HCK,
 HOXB7, ID1, IGF2BP2, IGSF9, IL2RG, IMPA2, IRF6, ITGA2, ITGA6, ITGB4, ITGB6, IVL,
 JAG2, JUP, KCNS3, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KITLG, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14,
 KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, 30

40

50

【化 1 4 5】

KRTCAP3, LAMP3, LAPT5, LGALS7B, LRP11, LRRC4, LSP1, LSR, LYPD3, MAGEA4, MAGEA6, MAL2, MAOA, MARCO, MCM2, MDFI, MET, MMP14, MPZL2, MUC1, MYBL2, MYH14, MYOF, MZB1, NCF2, NKG7, NNMT, NOTCH3, NRARP, NTRK2, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, OSMR, PALLD, PDPN, PDZK1IP1, PECAM1, PERP, PIGR, PIGT, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, PLVAP, PMP22, POSTN, PPL, PPP1R14C, PRAME, PROM2, PRRG4, PRSS8, PTGES, PTGFRN, PTPN6, PTPRF, PTPRZ1, RAB25, RAB38, RAET1L, RARRES1, RBP1, RGS1, RHCG, RHOV, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A10, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SCNN1A, SDC1, SERINC2, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SEZ6L2, SH3BP4, SHISA2, SLC1A5, SLC2A1, SLC34A2, SLC40A1, SLC6A8, SLC7A8, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPINT2, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, ST14, STEAP1, SULF1, SYK, SYTL1, TACSTD2, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBD, THBS2, TK1, TM4SF1, TMC4, TMEM30B, TMEM54, TMPRSS11D, TMPRSS11E, TMPRSS4, TNFRSF18, TNS4, TOP2A, TP53I11, TP63, TPD52, TPX2, TREM2, TRIM29, TRIP13, TSPAN1, TSPAN13, TSPAN6, TSPAN7, TUSC3, TYROBP, UBE2C, UPK1B, VAMP8, VANG2, WLS, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

20

30

40

50

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の検出によって；および（i i）検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、その少なくとも1つが、実施例5に記載される小胞内バイオマーカーのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする、検出プローブのセットを使用することによって、読み取ることができる。

【0 5 3 4】

一部の実施形態では、捕捉されたEVは、上記に記載される少なくとも1つ（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）のmRNAバイオマーカー；および実施例5に記載される少なくとも1つ（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）のEV小胞内バイオマーカーの検出によって読み取ることができる。一部のそのような実施形態では、捕捉されたEVは、（i）1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）のmRNAの検出によって；および（i i）検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、その少なくとも1つが、実施例5に記載される1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の小胞内バイオマーカーを対象にする、検出プローブのセットを使用することによって、読み取ることができる。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、小胞内バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）を対象にする少なくとも1つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、同じ小胞内バイオマーカー（例えば、同じエピトープまたは異なるエピトープを有する）をそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、別個の小胞内バイオマーカー（例えば、本明細書に記載される通り）をそれぞれ対象にする少なくとも2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、EV小胞内バイオマーカーおよび小胞内mRNAを含む試料を、抗EV小胞内バイオマーカー親和性剤が、EV小胞内バイオマーカーに結合する一方で、コンジュゲートされた一本鎖オリゴヌクレオチドが、同じ試料に存在

する小胞内mRNAバイオマーカーとハイブリダイズするように、小胞内mRNAバイオマーカー（例えば、実施例4に記載される通り）に対する対の2つのプライマーの1つとして機能する一本鎖オリゴヌクレオチド（例えば、DNA）にコンジュゲートされた抗EV小胞内バイオマーカー親和性剤（例えば、実施例5に記載されるEV小胞内バイオマーカーを対象にする抗体）と接触させることができる。次いで、対の第2のプライマーおよびRT-qPCRプローブを添加して単一試料中の小胞内mRNAおよび小胞内バイオマーカーの存在の検出のためにRT-qPCRを行う。

【0535】

（実施例5）

肺がんバイオマーカーとしての小胞内バイオマーカーの査定

10

一部の実施形態では、肺がん検出は、細胞外小胞の免疫親和性捕捉後の少なくとも小胞内バイオマーカーの検出を含む。

【0536】

一部の実施形態では、細胞外小胞上に存在する1つまたは複数の表面バイオマーカーまたは細胞外膜バイオマーカー（「捕捉バイオマーカー」）、例えば、実施例3に記載される捕捉バイオマーカーを、肺がん関連細胞外小胞の免疫親和性捕捉のために使用することができる。

【0537】

一部の実施形態では、EVイムノアッセイ方法論（例えば、本明細書、例えば、実施例1に記載されるもの）およびバイオマーカー検証プロセス（例えば、本明細書、例えば、実施例1に記載されるもの）を使用して、肺がんについて、小胞内バイオマーカーを査定することができる。一部の実施形態では、捕捉バイオマーカー（例えば、肺がん関連EVに存在する表面バイオマーカー）を対象にする抗体を、磁気ビーズにコンジュゲートし、最初に細胞株EV、次いで、患者試料において、特異的標的バイオマーカーに結合するその能力について評価する。抗体コーティングビーズを、肺がん関連EVを捕捉するその能力について査定し、抗体コーティングビーズによって捕捉されたEVを、標的実体検出システム（例えば、捕捉タンパク質とは別個の標的マーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブのセットを含む本明細書に記載される二重システム）を使用して、それらの小胞内バイオマーカーについてプロファイリングする前に、固定および／または透過処理する。

20

【0538】

一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、以下の小胞内バイオマーカー：AOC1、C12orf45、CRABP2、CST1、ETV4、FAM83A、FOXA2、HMGB3、LGALS3BP、MIF、NAPSA、PPP1R14D、S100A14、SBK1、SCGB3A2、SFTA2、SFTPA1、SFTPA2、SFTPB、SPINK1、TGFA、ZC3H11A、およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、その少なくとも2つが、以下の小胞内バイオマーカー：AOC1、C12orf45、CRABP2、CST1、ETV4、FAM83A、FOXA2、HMGB3、LGALS3BP、MIF、NAPSA、PPP1R14D、S100A14、SBK1、SCGB3A2、SFTA2、SFTPA1、SFTPA2、SFTPB、SPINK1、TGFA、ZC3H11A、およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、同じ小胞内バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、別個の小胞内バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。

30

40

【0539】

一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、以下の小胞

50

内バイオマーカー：

【化 1 4 6】

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3,
ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2,
ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3,
CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A,
CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE,
CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, EVPL, FAM129B,
FAM60A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2,
GRHL2, GSTA1, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C,
KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5,
KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2,
MDFI, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1,
PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PRAME, PTPN6, RBP1,
RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SERPINB13,
SERPINB3, SERPINB5, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A,
SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C,
THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A,
ZNF217, ZNF750,

10

20

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、その少なくとも2つが、以下の小胞内バイオマーカー

30

【化 1 4 7】

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1,

40

50

【化 1 4 8】

AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE, CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2, GRHL2, GSTA1, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2, MDFI, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PRAME, PTPN6, RBP1, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

10

20

30

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、同じ小胞内バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。一部の実施形態では、検出プローブのセットは、別個の小胞内バイオマーカーをそれぞれ対象にする2つの検出プローブを含む。

【0 5 4 0】

一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、(i)以下の小胞内バイオマーカー：

【化 1 4 9】

AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

40

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および(ii)実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、(i)以下の小胞内バイオマーカー：

50

【化 1 5 0】

AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB,

【化 1 5 1】

SPINK1, TGFA, ZC3H11A,

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする第1の検出プローブ；および（ii）実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする第2の検出プローブを含む、検出プローブのセットを使用して読み取ることができる。

【0 5 4 1】

一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、（i）以下の小胞内バイオマーカー：

【化 1 5 2】

ABRACL, ACP5, ADH7, AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, 20
ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L, AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2,
ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5, C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3,
CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20, CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A,
CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C, CNN2, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE,
CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3, ELF4, ENAH, ESRP1, EVPL, FAM129B,
FAM60A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1, FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2,
GRHL2, GSTA1, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2, IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, 30
KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15, KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5,
KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS7B, LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2,
MDFI, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT, NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1,
PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN, PPP1R14C, PRAME, PTPN6, RBP1,
RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14, S100A16, S100A2, S100P, SERPINB13,
SERPINB3, SERPINB5, SH3BP4, SNAI2, SOX2, SPI1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A,
SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK, SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, 40
THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2, TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A,
ZNF217, ZNF750,

およびその組合せのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）；および（ii）実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの少なくとも1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を使用して読み取ることができる。一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、検出プローブのセット（例えば、本明細書で利用されるおよび／または記載される通り）であって、（i）以下の小胞内バイオマーカー：

【化 1 5 3】

ABRACL, ACP5, ADH7,
 AGR2, AIF1, AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, ALDH1A1, ALDH3A1, ALDH3B2, ALG1L,
 AP1M2, APOBEC3B, APOBEC3C, ARNTL2, ASF1B, AURKB, BAIAP2L1, BIRC5,
 C15orf48, C19orf33, C1S, C8orf4, CA9, CALML3, CAPNS2, CBLC, CCL19, CCNB2, CDC20,
 CDC45, CDCA4, CDCA5, CDK1, CDKN2A, CDKN2B, CENPW, CEP55, CES1, CHMP4C,
 CNN2, CPA3, CRABP2, CSTA, CTSC, CTSE, CYP2S1, DPYSL3, EFS, EGLN3, EHF, ELF3,
 ELF4, ENAH, ESRP1, EVPL, FAM129B, FAM60A, FAM83D, FAM83H, FBP1, FERMT1,

10

【化 1 5 4】

FOXE1, FOXM1, GBP6, GNA15, GPX2, GRHL2, GSTA1, HCK, HOXB7, ID1, IGF2BP2,
 IMPA2, IRF6, IVL, JUP, KIAA1522, KIF2C, KIFC1, KLF4, KLF5, KRT13, KRT14, KRT15,
 KRT16, KRT17, KRT18, KRT19, KRT5, KRT6A, KRT6B, KRT6C, KRT7, KRT8, LGALS7B,
 LSP1, MAGEA4, MAGEA6, MCM2, MDFI, MYBL2, MYH14, MZB1, NCF2, NNMT,
 NRARP, NUP210, NUSAP1, OSGIN1, PALLD, PITX1, PKP1, PKP3, PLEK, PLEK2, POSTN,
 PPP1R14C, PRAME, PTPN6, RBP1, RIN2, RIPK4, RPS4Y1, RRM2, S100A11, S100A14,
 S100A16, S100A2, S100P, SERPINB13, SERPINB3, SERPINB5, SH3BP4, SNAI2, SOX2,
 SPI1, SPINT1, SPRR1A, SPRR1B, SPRR2A, SPRR2D, SPRR2E, SPRR3, SULF1, SYK,
 SYTL1, TBC1D2, TEAD2, TEAD3, TFAP2C, THBS2, TK1, TOP2A, TP63, TPD52, TPX2,
 TRIM29, TRIP13, UBE2C, YAP1, ZC3H11A, ZNF217, ZNF750,

20

およびその組合せのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする第1の検出プローブ；および（i i）実施例3に記載されるEV表面バイオマーカーのうちの1つまたは複数（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）を対象にする第2の検出プローブを含む、検出プローブのセットを使用して読み取ることができる。

30

【0 5 4 2】

一部の実施形態では、固定および／または透過処理後の捕捉されたEVは、上記の実施例4に記載されるように、単一試料中で一緒にEV小胞内バイオマーカーおよびEV小胞内mRNAを検出することによって、読み取ることができる。

【0 5 4 3】

本実施例は、がん細胞株に由来する細胞外小胞における少なくとも1つ（例えば、1、2、3、またはそれよりも多く）の小胞内RNAバイオマーカーの検出のための例示的な方法をさらに実証する。一部の実施形態では、そのような方法は、本明細書に記載される細胞外小胞の免疫親和性捕捉（例えば、表面結合タンパク質、例えば、本明細書に記載される表面バイオマーカーを介した）と、それに続く例えば、逆転写qPCR（RT-qPCR）による小胞内RNAの検出を含む。一部の実施形態では、細胞外小胞は、例えば、一部の実施形態では、抗体官能化固体基材（例えば、磁気ビーズ）を使用する、がん関連表面バイオマーカーによって捕捉される。一部の実施形態では、捕捉された細胞外小胞を、小胞内RNAの検出の前に、溶解して、それらの核酸カートを放出させる。一部の実施形態では、小胞内RNAは、mRNAであるか、またはそれを含む。

40

【0 5 4 4】

一部の実施形態では、がん（例えば、特定のがん型）が起源の、またはそれと関連する

50

細胞株を選択した。一部の実施形態では、結腸／結腸直腸がん、白血病、黒色腫、卵巣がん、もしくは肉腫（例えば、ラブドイド腫瘍）が起源の、またはそれと関連するそのような細胞株を選択した。一部の実施形態では、G-401、K562、NIH:OVCAR-3、SK-MEL-1、またはT84細胞株を選択した。

【0545】

一部の実施形態では、細胞外小胞を、本明細書に記載される（例えば、実施例1に記載される）方法を介して、条件付け細胞培養培地から精製し、カウントし、免疫親和性捕捉し、洗浄した。

【0546】

それぞれのRT-qPCR反応混合物は、PCR反応混合物（例えば、50%（体積）のLuna One-Step反応ミックス、5%（体積）のLuna WarmStart RT酵素ミックス、5%（体積）のプライマー-TaqManプローブミックス）、ならびに水、捕捉された細胞外小胞、および溶解剤の可変の組合せを含んでいた。RT-qPCRを、例えば、Quant Studio 3において、例えば、55℃で10分間保持、95℃で1分間保持、95℃で5秒間および62℃で15秒間の50サイクル、ならびに標準的な融解曲線を行う、好適なPCRプロトコールで行った。温度変化の速度を、標準（1秒あたり2℃）であるように選択した。すべてのqPCRを、二反復または三反復で行い、ROXを、qPCRシグナルを正規化するためのパッシブ参照として使用した。次いで、データを、Quant Studio 3 machineからダウンロードし、Python 3.7において解析し、プロットした。それぞれの遺伝子について、プライマーおよびTaqManプローブは、20倍濃度として、Integrated DNA Technologies (IDT) から購入した。

【0547】

最初の実験として、MIF mRNAは、1%のIGEPALで溶解した5e7のバルク細胞外小胞において検出されることを見出した。表Iは、異なる細胞株からの100万あたりの転写物（TPM）でのMIF発現を示す。

【0548】

【表I】

表I: がん細胞株についてのMIF mRNA発現の要約。種々の遺伝子発現を用いるバルク細胞株EVのパネルについてのMIF RT-PCRシグナル(45-Ct)。試料を単一検体において試験し、反応あたり5e7のEVを使用した。

細胞株	MIF 発現 (TPM)
SK-MEL-1	1302.5
NIH:OVCAR-3	1175.3
T84	196.8
G-401	0.8

【0549】

類似の実験を行って、異なる小胞内RNAバイオマーカーにわたりこのアプローチをさらに実証した。表IIは、異なる細胞株由来の5e7のバルク細胞外小胞におけるmRNA転写物の発現レベルを示し、mRNAが、細胞遺伝子発現に依存するレベルで、細胞株EVにおいて検出可能であることを示す。

【0550】

10

20

30

40

50

【表 I I - 1】

表II: がん細胞株についての4つの異なる mRNA 転写物の発現の要約

mRNA 転写物	細胞株	発現 (TPM)	5e7の溶解EVのRT-PCRシグナル	
			反復 1	反復 2
CLDN6	OVCAR-3	203.4	34.0	33.9
	SK-MEL-1	0.1	40.5	未検出
	鋳型対照なし	-	未検出	未検出

【表 I I - 2】

mRNA 転写物	細胞株	発現 (TPM)	5e7の溶解EVのRT-PCRシグナル	
			反復 1	反復 2
FAM83A	K-562	220.1	29.9	29.7
	G-401	0.1	未検出	未検出
	鋳型対照なし	-	未検出	未検出
HMGB3	NCI-H1781	759.5	27.4	27.3
	OVCAR-3	293.6	37.4	37.5
	鋳型対照なし	-	未検出	未検出
B3GNT3	NCI-H1781	134.9	33.6	33.9
	G-401	0	未検出	未検出
	鋳型対照なし	-	未検出	未検出

【0551】

加えて、実験を行って、少なくとも1つの小胞内RNAバイオマーカーと少なくとも1つの表面バイオマーカー（例えば、細胞外小胞と関連する表面マーカー）との共局在を検出した。一部の実施形態では、細胞外小胞を、細胞外小胞の表面上に存在する表面バイオマーカーを対象にする抗体官能化ビーズを使用して捕捉する。例えば、本実施例では、EPCAM標的化ビーズを使用して、細胞外小胞を捕捉した。結合した細胞外小胞を溶解し、MIF mRNA含有量を、RT-qPCRを介して定量化した。一部の実施形態では、捕捉のための表面バイオマーカーおよび／または検出のための小胞内RNAバイオマーカーを発現する陽性対照細胞株が選択される（例えば、EPCAM+、MIF+）一方で、捕捉および／または検出のための標的バイオマーカーを発現しない陰性対照発現系が選択される（例えば、EPCAM-、MIF+）。NIH:OVCAR-3を、陽性対照細胞株として選択し、SK-MEL-1を、陰性対照細胞株として選択した。複数の界面活性剤条件も、この実験において査定して、アッセイ性能に対する界面活性剤（例えば、Tween（登録商標）-20）の濃度の効果を査定した。これらのデータは、界面活性剤（例えば、Tween（登録商標）-20）濃度を低減することで、アッセイ性能を改善することができることを示す。特定の理論に縛られることを望まないが、この効果は、Tween（登録商標）-20が膜を透過性にし得るので、細胞外小胞捕捉の間に膜の完全性の保存に起因する可能性があり得る。

【0552】

本実施例は、小胞内RNAをRT-qPCRを介して検出することができることを実証する。特に、本実施例は、細胞外小胞における表面バイオマーカーおよび小胞内RNAの共局在が、表面バイオマーカーを介した免疫親和性捕捉と、それに続く小胞内RNAのRT-qPCR分析によって検出することができることを実証する。

【0553】

（実施例6）

肺がんリキッドバイオプシーアッセイの開発

本実施例は、例えば、遺伝的、環境および平均リスクの個体をスクリーニングするための、肺がんリキッドバイオプシーアッセイの開発を記載する。すべてのがんの中で男性お

よび女性の主要な死亡要因であるにもかかわらず (Barta et al., 2019; 本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)、低線量胸部断層撮影法 (LDCT) は、United States Preventative Services Task Force (USPSTF) によって承認されているが、現在、低コストで、推奨される、非常に利用しやすい肺がんスクリーニングツールは存在しない (Lung Cancer Screening, PDQ (登録商標)、2020)。これは、一部では、X線および／または喀痰分析などの提案された肺がんスクリーニング技術の不十分な性能に起因する (Oken et al., 2011; 本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。肺がんの発生率を考慮すると、不適切な検査の特異度 (<99.5%) は、偽陽性の結果をもたらし、低悪性度の一部の肺がんの同定をもたらす。これは、医療制度、および偽陽性結果とスクリーニングされた個体に、かなりの負担をかけ、追加検査、不必要な外科手術、および感情的／身体的苦痛をもたらす。結果として、臨床的有用性を提供する2つの特色：(1) 偽陽性の数を最小化する非常に高い特異度 (>99.5%)、および(2) 予後が最も好ましいステージⅠおよびⅡ肺がんについて高い感度 (>40%) を示し得る、肺がんスクリーニング検査を開発することが望ましくあり得る。そのような検査の開発は、毎年、何万人のものを命を救う可能性を有する。

10

【0554】

循環腫瘍DNA (ctDNA)、循環腫瘍細胞 (CTC)、バルクタンパク質、および細胞外小胞 (EV) を含むいくつかの異なるバイオマーカークラスが、肺がんリキッドバイオプシーアッセイのために研究されている。EVは、ctDNAおよびCTCと比べて、血流におけるそれらの存在量および安定性に起因して特に有望であり、初期がんについての改善された感度を示唆する。また、EVは、同じ細胞が起源のカーゴ (例えば、タンパク質、RNA、代謝産物) を含有し、バルクタンパク質の測定を上回る優れた特異度を提供する。診断有用性EVが研究されているが、この作業の多くは、バルクEV測定またはロースルーブット単一EV分析に関している。

20

【0555】

この本実施例は、ヒト血漿における個々の細胞外小胞 (EV) のプロファイリングにより、初期肺がん検出のための例示的なアプローチの一態様を記載する。エキソソームおよび微小小胞体を含むEVは、それらの起源の細胞を表す共局在タンパク質、RNA、代謝産物、および他の化合物を含有する (Kosaka et al., 2019; 本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。単一EV内での戦略的に選択された共局在マーカーの検出は、がん細胞を正常な組織から識別する能力を含む、非常に高い特異度で、細胞型の同定を可能にし得る。血液に入るバイオマーカー (すなわち、cfDNA) に対する細胞死に依拠する他のがん診断アプローチとは逆に、EVは、細胞を機能させることによって、高率で放出される。単一細胞は、in vitroで1日あたり10,000程度の多くのEVを放出することが示されている (Balaj et al., 2011; 本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。加えて、がん細胞が、健康な細胞よりも高率でEVを放出することが広く認められている (Bebelmann et al., 2018; 本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。

30

40

【0556】

一態様では、本開示は、出願人の独占所有権があるバイオインフォマティクスバイオマーカー発見プロセスを使用して、健康な組織に対して肺がんにおいて上方調節される遺伝子の同定を含む洞察および技術を提供する。上方調節されるバイオマーカーのリストから、肺がんに対して高い感度および特異度を示すと予測されるバイオマーカーの組合せを設計する。例示的な個々のEVアッセイ (例えば、図1もしくは2に例示されるおよび／または本明細書に記載されるものを参照されたい) を使用して、個々の小胞におけるそのようなバイオマーカーの共局在が検出され、バイオマーカーのグルーピングが、同じ細胞が起源であったことを示す。これは、多くの上方調節されたがんバイオマーカーが1つまた

50

は複数の健康な組織によって発現されることを考慮すると、バルクEVアッセイを含むバルクバイオマーカー測定よりも優れた特異度を提供する。バイオマーカーの組合せの注意深い設計により、肺がんに関連するものを含む競合する組織からのシグナルを、低減または排除することができる。一部の実施形態では、本開示は、高リスク喫煙者のスクリーニングのためのゴールドスタンダードである胸部CTと少なくとも同等の陽性予測値が求められる肺がんスクリーニング検査として特に役立つ、高または超高度特異度を有する技術を提供する。例えば、National Lung Screening Trial Research Team (2013) "Results of initial low-dose computed tomographic screening for lung cancer" New England Journal of Medicine, 368(21):1980-1991を参照されたい。一部の実施形態では、本開示は、高リスク集団における少

10

【0557】

バイオマーカー発見

一部の実施形態では、バイオマーカー発見プロセスは、大きなデータベースのバイオインフォマティクス分析ならびに肺がんおよび細胞外小胞の生態の理解を活用する。

【0558】

個々の細胞外小胞分析

20

血液における腫瘍由来EVの検出は、多様な範囲の健康な組織からの10億のEVのバックグラウンドにおいて血漿1ミリリットルあたり比較的少ない腫瘍由来EVを検出するために、十分な選択性および感度を有するアッセイを必要とする。本開示は、数ある中でも、この課題に対処する技術を提供する。例えば、一部の実施形態では、個々の細胞外小胞分析のためのアッセイは、図1に図示され、これは、下記に概要を述べる3つの重要なステップで行われる：

1. EVを、可溶性タンパク質および他の干渉性化合物の99%超を除去するサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を使用して、患者血漿から精製する。
2. 腫瘍特異的EVを、膜関連表面バイオマーカーに特異的な抗体官能化磁気ビーズを使用して捕捉する。
3. 近接ライゲーション-免疫定量的ポリメラーゼ連鎖反応（pliq-PCR）の改変バージョンを行って、捕捉されたEV上またはその内に含有される追加のタンパク質バイオマーカーの共局在を決定する。

30

【0559】

pliq-PCRアッセイの改変バージョンの多くの実施形態では、2つまたはそれよりも多くの異なる抗体-オリゴヌクレオチドコンジュゲートを、抗体官能化磁気ビーズによって捕捉されたEVに添加し、抗体は、その後、それらのバイオマーカー標的に結合する。オリゴヌクレオチドは、相補的である一本鎖オーバーハングを有するdsDNAから構成され、そのため、近接した場合に（すなわち、対応するバイオマーカー標的が同じEV上に位置する場合に）、ハイブリダイズすることができる。未結合抗体-オリゴヌクレオチド種を洗い流した後、隣接して結合した抗体-オリゴヌクレオチド種を、標準的なDNAリガーゼ反応を使用してライゲーションする。ライゲーションされた鑄型鎖のその後のqPCRは、共局在バイオマーカー種の検出および相対的定量化を可能にする。一部の実施形態では、2〜20の別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを、例えば、両方とも任意の目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる、両方とも2020年2月28日に出願され、「標的実体の検出のためのシステム、組成物、および方法」という名称の米国特許出願第16/805,637号（US11,085,089号として発行）、および国際出願PCT/US2020/020529号（WO2020180741号として公開）に記載されるように、そのようなアッセイに組み込むことができる。

40

50

【0560】

p l i q - P C R は、E V をプロファイリングするための他の技術を上回る多数の利点を有する。例えば、p l i q - P C R は、他の標準的なイムノアッセイ、例えば、E L I S A よりも3桁高い感度を有する (Darmanis et al., 2010; これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)。十分に最適化された p l i q - P C R 反応の非常に低い L O D は、1 m L あたり 1 0 0 0 の E V まで下がる痕跡レベルの腫瘍由来 E V の検出を可能にする。これは、それぞれ、約 10^3 および約 10^4 E V の L O D が報告されている (Shao et al., 2018; これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる)、N a n o p l a s m i c E x o s o m e (n P L E X) センサー (Im et al., 2014; これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる) および I n t e g r a t e d M a g n e t i c - E l e c t r o c h e m i c a l E x o s o m e (i M E X) センサー (Jeong et al., 2016; これは、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる) を含む、他の新たに出現した E V 分析技術とも有利に匹敵する。また、一部の実施形態では、p l i q - P C R アプローチの改変バージョンは、煩雑な設備を必要とせず、個々の E V 上の複数のバイオマーカーの共局在を固有に検出することができる。

10

【0561】

一部の実施形態では、個々の E V プロファイリングアッセイの感度および特異度をさらに改善するために、他のクラスの E V バイオマーカーは、m R N A および小胞内バイオマーカー (E V 表面バイオマーカーに加えて) を含み、それをアッセイで同定することができる、アッセイに含めることができる。

20

【0562】

予備的作業

予備的研究により、バイオマーカー候補が E V に存在し、市販の抗体または m R N A プライマー-プローブセットによって検出することができることを検証するワークフローを開発した。目的の所与のバイオマーカーについて、目的のバイオマーカーを発現する (陽性対照) および発現しない (陰性対照) 1 つまたは複数の細胞株を培養して、それらの細胞培養培地を濃縮し、目的のサイズ範囲を有するナノ粒子を単離するための精製 (例えば、S E C を使用する) を行うことにより、それらの E V を回収することができる。典型的には、細胞外小胞は、3 0 n m ~ 数マイクロメートルの直径の範囲であってもよい。例えば、本明細書に記載される目的のために、参照により本明細書に組み込まれる Chuo et al., "Imaging extracellular vesicles: current and emerging methods" Journal of Biomedical Sciences 25: 91 (2018) を参照されたく、これは、異なる細胞外小胞 (E V) サブタイプについてのサイズの情報: ミグラソーム (0.5 ~ 3 μ m)、微小小胞体 (0.1 ~ 1 μ m)、オンコソーム (1 ~ 1 0 μ m)、エキソマー (< 5 0 n m)、小エキソソーム (6 0 ~ 8 0 n m)、および大エキソソーム (9 0 ~ 1 2 0 n m) を提供する。一部の実施形態では、約 3 0 n m ~ 1 0 0 0 n m のサイズ範囲を有するナノ粒子を、検出アッセイのために単離し得る。一部の実施形態では、特異的 E V サブタイプを、検出アッセイのために単離し得る。

30

40

【0563】

独占所有権のあるバイオマーカー開発プロセスにより、健康な組織に対して L U A D において上方調節される4つの膜結合バイオマーカー (S L C 3 4 A 2、C E A C A M 5、C E A C A M 6、および E P C A M) を同定し、細胞株 E V および肺がん患者試料における概念実証実験において使用した。

【0564】

共局在化した S L C 3 4 A 2、C E A C A M 5、C E A C A M 6、および / または E P C A M マーカーを含有する E V からのアッセイシグナルを検出するために、一部の実施形態では、S L C 3 4 A 2 免疫親和性捕捉、および C E A C A M 6 に特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成を開発した。一部の実施形態では

50

、SLC34A2免疫親和性捕捉、ならびにCEACAM6およびEPCAMに特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成を開発した。一部の実施形態では、CEACAM5免疫親和性捕捉、ならびにCEACAM6およびSLC34A2に特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成を開発した。

【0565】

精製された細胞株EVを、抗SLC34A2官能化、または抗EPCAM官能化磁気ビーズを使用して捕捉した。より高く発現する細胞株が、より低く発現する細胞株と比べて、シグナルの著しい増加を示したことが観察された。この観察は、一部の実施形態では、単一EVプロファイリングアッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）が、非常に高い感度で、単一EV上の共局在化膜結合バイオマーカーを検出することができることを実証する。

10

【0566】

肺がん細胞株EVにおけるSLC34A2、CEACAM5、CEACAM6、およびEPCAMの検証後、パイロットコホート研究および拡大コホート研究を、最適化された、オペレーター盲検アッセイプロトコルを使用して、肺がん患者血漿試料において行った。すべての血漿試料は、同じ供給源から購入し、同じ採血プロトコルに従って処理し、患者試料を、任意の処置の開始前に収集した（すなわち、処置ナティブ）。この実施例の研究に含まれた患者コホートを、図4および11に記載する。臨床パイロット研究の結果を、図5～10に提供する一方で、拡大コホート研究についての結果を、図12に提供する。

20

【0567】

臨床パイロット研究の間に、特異度を、すべての健康な対照（ $n=20$ ）の周囲に対数正規分布を仮定することによって決定した。カットオフを決定するために、健康な対照の分布の平均を決定し、実質的に100%の値が、カットオフを下回ると予想されるように、適切な数の標準偏差を加えた。SLC34A2免疫親和性捕捉、およびCEACAM6に特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成の一部の実施形態では、ステージI LUADについて16.7%、ステージII LUADについて60%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて100%の感度が達成された。SLC34A2免疫親和性捕捉、ならびにCEACAM6およびEPCAMに特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成の一部の実施形態では、ステージII LUADについて20%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて75%の感度が達成された。CEACAM5免疫親和性捕捉、ならびにCEACAM6およびSLC34A2に特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成の一部の実施形態では、ステージI LUADについて16.7%、ステージII LUADについて20%、ステージIII LUADについて50%、およびステージIV LUADについて75%の感度が達成された。

30

【0568】

これら3つの例示的LUAD診断アッセイの予測能力を、互いと比較し、相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD試料について観察された（図8～10）。

40

【0569】

図8は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+CEACAM6検出プローブからのシグナルを、x軸に沿って表す一方で、SLC34A2抗体に基づく捕捉とCEACAM6+EPCAM検出プローブからのシグナルを、y軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD試料について観察された。

【0570】

50

図 9 は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2 抗体に基づく捕捉とCEACAM6+CEACAM6 検出プローブからのシグナルを、x 軸に沿って表す一方で、CEACAM5 抗体に基づく捕捉とCEACAM6+SLC34A2 検出プローブからのシグナルを、y 軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD 試料について観察された。

【0571】

図 10 は、本明細書に記載される例示的な肺腺癌診断アッセイ間の相関のグラフ表示である。SLC34A2 抗体に基づく捕捉とCEACAM6+EPCAM 検出プローブからのシグナルを、x 軸に沿って表す一方で、CEACAM5 抗体に基づく捕捉とCEACAM6+SLC34A2 検出プローブからのシグナルを、y 軸に沿って表す。相関を、ピアソンの積率相関係数を使用して決定した。強い相関が、特に、ステージIIIおよびステージIV LUAD 試料について観察された。

10

【0572】

臨床拡大コホート研究の間に、特異度を、すべての健康な対照 (n=90) の周囲に対数正規分布を仮定することによって決定した。カットオフを決定するために、健康な対照の分布の平均を決定し、99.9%の値が、カットオフを下回ると予想されるように、適切な数の標準偏差を加えた。SLC34A2 免疫親和性捕捉、およびCEACAM6 に特異的な2つの別個の抗体-オリゴヌクレオチドプローブを含むアッセイ構成の一部の実施形態では、ステージIII LUAD について50%、ステージIII LUAD について55.5%、およびステージIV LUAD について71.4%の感度が達成された。

20

【0573】

98%、98.5%、99%、99.5%、99.9%、または100%の特異度を使用して、リスク集団の異なるLUADをスクリーニングするためのPPVを評価することができ、例えば、ここで、有病率は、喫煙者について約100,000人あたり、または非喫煙者について約100,000人あたりである。

【0574】

肺がんの検出のための例示的な単一EVプロファイルアッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）の性能をさらに改善するために、一部の実施形態では、表面バイオマーカーおよび小胞内mRNA / バイオマーカーを含む追加のバイオマーカー候補を同定することができる。

30

【0575】

一部の実施形態では、バルク中の精製された細胞株EVを使用するEV-mRNA検出の実行可能性が本出願人によって既の実証された。膜結合タンパク質マーカーの免疫親和性捕捉により、このアプローチは、2つの共局在バイオマーカーの検出を可能にする。また、免疫親和性捕捉の直後に、RT-qPCRを行うことができるので、EV-mRNA検出はより簡単なプロトコルを必要とする。一部の実施形態では、EVを使用するmRNA検出は、捕捉プローブ（例えば、本明細書に記載される通り）を使用してEVを捕捉すること、および特定の肺がんmRNAバイオマーカーを検出することによって行うことができる。捕捉プローブマーカーおよび肺がんmRNAバイオマーカーの両方を発現するEVが選択的に検出される。

40

【0576】

（実施例7）

バイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せ

本実施例は、肺がん診断に有用であり得るある特定のバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せの同定のための例示的なバイオインフォマティクス駆動アプローチを示す。

【0577】

バイオインフォマティクスのフィルタリング

Genotype-Tissue Expression (GTEx) データベース（例えば、正常な組織遺伝子発現についての一次データ源）およびCancer Geno

50

me Atlas (TCGA) データベース (例えば、がん組織遺伝子発現についての一次データ源) に集められた 55,000 よりも多くの転写物がある。肺がんの検出に有用であるバイオマーカーを同定するために、2つのフィルタリングステップをデータに適用した。

【0578】

一部の実施形態では、UniProt フィルターを使用した。バイオマーカータンパク質が膜と会合していることが見出された証拠を含む、有効な UniProt エントリーを有するバイオマーカーを、分析において考慮した (例えば、膜と会合している証拠がないタンパク質を、必要に応じて、フィルタリングで除いた)。そのようなフィルタリングステップは、必要に応じて、目的の異なる膜または提供される証拠の信頼度のレベルの間を識別し得る。

10

【0579】

一部の実施形態では、Vesiclepedia フィルターを使用した。Vesiclepedia (細胞外小胞刊行物のリポジトリ) を、結果をフィルタリングするために使用した。Vesiclepedia は、それぞれの遺伝子について公開された EV の数の関連参考文献をリストしている (例えば、Entrez)。これらの参考文献を、EV 中または EV 上の所与のバイオマーカーの存在についての代理として使用した。EV 関連刊行物が所与のバイオマーカーについて存在しない場合には、実際の EV バイオマーカーである可能性が低く、そのため、さらなる考慮のためのバイオマーカーのリストからフィルタリングした。

20

【0580】

最小発現および差別化フィルタリング

一部の実施形態では、バイオマーカーの最小発現レベルを考慮する。低いバイオマーカー発現は、確率的ノイズを生じ、強固なシグナル検出を、困難かつ信頼不可能なものにし得る。この課題を克服するために、以下の発現フィルターのうちの1つまたは複数 (そのすべてを含む) を適用した。特定の実施形態では、4つの発現フィルターを適用した。

【0581】

目的のがんにおける最小発現

一部の実施形態では、差次的遺伝子発現プロファイルを有する可能性があるサブタイプの発見についての余地を残しながら、最小数の試料を使用して、目的のがんからの試料 (例えば、がん患者からの血漿試料) において検出可能であった発現レベルを示した。このフィルターを達成するために、一部の実施形態では、目的の TCGA が (例えば、肺がん) における遺伝子発現の 80 パーセンタイルを計算し、一部の実施形態では、80 パーセンタイルで > 15 の 100 万あたりの転写物 (TPM) 値を有するバイオマーカーを考慮した。

30

【0582】

最小発現関連細胞株

一部の実施形態では、バイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカーに対する抗体を試験するために、陽性対照細胞株を利用した。一部の実施形態では、 > 1000 の細胞株プロファイルを含む Cancer Cell Line Encyclopedia (CCLE) 遺伝子発現セットを利用して、バイオマーカーリストを、目的のバイオマーカーを発現する細胞株が存在するものに低減した。一部の実施形態では、がん特異的細胞株にわたるそれぞれのバイオマーカーについての発現の 90 パーセンタイルを計算し、一部の実施形態では、90 パーセンタイルで > 15 の TPM を有するバイオマーカーを考慮した。

40

【0583】

タンパク質レベルでの目的のがんにおける最小発現

発現されるすべての遺伝子が、最終的にタンパク質に翻訳されるわけではないことを当業者は理解するであろう。したがって、一部の実施形態では、Clinical Proteomic Tumor Analysis Consortium (CPTAC) か

50

らの質量分析データを利用して、タンパク質発現遺伝子をフィルタリングした。一部の実施形態では、10超のスペクトルカウントを有するバイオマーカーを、発現されていると考慮した。

【0584】

正常な組織に対する最小差別化

一部の実施形態では、本明細書に記載されるアッセイは、同じ細胞外小胞上に、少なくとも2つのバイオマーカー、一部の実施形態では、少なくとも3つのバイオマーカーの共発現を必要とすることによって、優れた特異度を達成した。正常な組織の単純な示差的遺伝子発現は、多すぎる偽陰性値を生じた。代わりに、一部の実施形態では、バイオマーカーシグネチャーは、それらが追加の識別力（例えば、高度に組織特異的および／または高度にがん特異的）を提供する他のバイオマーカーと対形成した場合にのみ、複数の組織型において高度に発現されたバイオマーカーを含み得るバイオマーカーの組合せを含む。しかしながら、そのような分析は、遍在発現され、したがって、識別バイオマーカーとして必ずしも有用ではなかったGAPDHなどのハウスキーピング遺伝子を捕捉することができた。そのようなマーカーを除去するために、一部の実施形態では、所与のバイオマーカーについてGTEXにおけるがん性組織（例えば、肺がん）およびあらゆる組織型を比較するzスコアを計算した。一部の実施形態では、少なくとも1つの正常組織型において、80パーセンタイルで5のzスコアを有するバイオマーカーを選択した（例えば、少なくとも1つの正常な組織をバイオマーカー候補によって明確に除外した）。

【0585】

シミュレーションおよび確率的サンプリング

少なくとも2つまたはそれよりも多く（例えば、少なくとも3つまたはそれよりも多くを含む）のバイオマーカーを含むバイオマーカーシグネチャー候補またはバイオマーカーの組合せ候補の識別力は、正常な対象（例えば、肺がんを有しないと決定された対象）におけるそのようなバイオマーカーシグネチャー候補の発現をシミュレーションすること、およびそれをがん対象のものと比較することによって決定することができる。少なくとも2つおよび少なくとも3つのバイオマーカーの組合せを、フィルタリングされたバイオマーカーセットに基づいて作成した。プロファイリングされた組織によって生じたEVの数を推定するEVスコアを、所与の組合せにおいてすべてのマーカーのTPM値を掛けることによって、所与の組合せについて計算した。

【0586】

正常な対象の集団をシミュレーションするために、5000人の「健康な個体」からの5000の血漿試料のコホートを作出した。個々の試料を、GTEXデータベースにおける54の組織のそれぞれから組織試料を無作為に選択すること、および健康な個体に基づくそれぞれの器官のグラムでの推定重量を用いて、発現された遺伝子のTPM値を掛けることによって作出した。次いで、EVスコアを、全組織で、個体について合計して、個体をシミュレーションした。次いで、EVスコアを、シミュレーションされた個体について全組織で合計した。健康なコホートに加えて、「がん個体」からの5000試料を、TCGAから無作為に選択された肺がん（例えば、LUADおよび／またはLUSC）試料のEVスコアを加える追加のステップを伴うが、「健康な」プール作成技術を繰り返すこと、1g、10g、または100gの腫瘍に対応して試料に1、10、または100を掛けることによって作出した。「健康」および「がん」個体のこれら2つの試料プールを使用して、99%の特異度で、それぞれのバイオマーカーの組合せ候補の感度を計算した。次いで、この測定基準を使用して、バイオマーカーの組合せ候補をランク付けした。

【0587】

最初のバイオマーカーシグネチャー選択のために、一部の実施形態では、3つのバイオマーカーの100万の組合せを無作為にサンプリングし、一部の実施形態では、100gの腫瘍、ならびにがんおよび健康プールのそれぞれにおいて1000人の個体を使用してシミュレーションを実施した。一部の実施形態では、次いで、バイオマーカーの組合せを、99%の特異度で、それらの感度値に基づいてランク付けした。一部の実施形態では、

次いで、単一バイオマーカーを、組合せリストにおけるそれらのランクのトップ 0.5 パーセンタイルに基づいてランク付けした。

【0588】

(実施例 8)

バイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せと当技術分野において公知の経路との相関

本実施例は、ある特定のバイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカーと公開された遺伝子経路との間の重複の決定のための遺伝子セットエンリッチメント解析を記載する。当業者は、ある特定のケースでは、単一遺伝子のリストを適切に解釈することが困難であり得ることを認識するであろう。幸いにも、例えば、同じ生化学経路または現象の構成要素であるタンパク質をコードする遺伝子のリストなどの遺伝子の機能性リストを提供するリソースがある。バイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーのリストを公知の遺伝子セットおよび生化学経路と比較することで、構造をバイオマーカーのリストに与えることができる。

10

【0589】

表 2 は、Broad Institute 製の Molecular Signature Database Category 2 – Canonical pathways (v. 7.4.) においてすべての遺伝子セットと比較した場合の、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーのエンリッチメント解析を示す。このデータベースは、リソースのなかでも、KEGG、BioCarta、および Reactome のデータを含む。それぞれの p 値は、カイ二乗検定の結果であり、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーのリストを有する特定の遺伝子セットを、MSigDB C2-CP データベース中のすべての遺伝子のバックグラウンドに対して比較する。バイオマーカーを、最大の重複で 1 位にランク付けし、一部の実施形態では、0.05 の名目上の p 値との重複を考慮した。

20

【0590】

表 2 は、バイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーのリストにおいてエンリッチされたある特定の分子経路を示し、複数の検定についての補正後、いくつかの分子経路が、0.05 未満の偽発見率 (FDR) を示した。そのような分子経路は、生物学的主題を、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーに提供する。

30

40

50

【表 2 - 1】

表2 - ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーのエンリッチメント解析

遺伝子オントロジー経路、起源および説明	生P値	FDR	経路遺伝子 番号	含まれる例示的なバイオマーカー
REACTOME_APOPTOTIC_CLEAVAGE_OF_CELL_ADHESION_PROTEINS	0.0E+00	0.0E+00	11	CDH1, DSG2, DSG3
REACTOME_MISCELLANEOUS_SUBSTRATES	0.0E+00	0.0E+00	12	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3
REACTOME_CELL_JUNCTION_ORGANIZATION	0.0E+00	0.0E+00	92	CDH1, CDH3, LAMB3, LAMC2, NECTIN1, SDK1, SDK2
REACTOME_SYNTHESIS_OF_LEUKOTRIENES_LT_AND_EOXINS_EX	0.0E+00	0.0E+00	21	ABCC1, CYP4F11, CYP4F3
REACTOME_CELL_CELL_JUNCTION_ORGANIZATION	0.0E+00	0.0E+00	65	CDH1, CDH3, NECTIN1, SDK1, SDK2
REACTOME_CELL_CELL_COMMUNICATION	0.0E+00	0.0E+00	130	CDH1, CDH3, LAMB3, LAMC2, NECTIN1, SDK1, SDK2
PID_A6B1_A6B4_INTEGRIN_PATHWAY	0.0E+00	4.0E-07	46	CD9, CDH1, LAMB3, LAMC2
KEGG_ECM_RECEPTOR_INTERACTION	0.0E+00	1.1E-05	84	ITGA2, ITGB6, LAMB3, LAMC2, SDC1
PID_INTEGRIN4_PATHWAY	0.0E+00	1.9E-05	11	LAMB3, LAMC2
REACTOME_TYPE_I_HEMIDESMOSOME_ASSEMBLY	0.0E+00	1.9E-05	11	LAMB3, LAMC2
REACTOME_LAMININ_INTERACTIONS	0.0E+00	3.5E-05	30	ITGA2, LAMB3, LAMC2
REACTOME_MET_ACTIVATES_PTK2_SIGNALING	0.0E+00	3.5E-05	30	ITGA2, LAMB3, LAMC2
REACTOME_EICOSANOIDS	0.0E+00	9.0E-05	12	CYP4F11, CYP4F3

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

遺伝子オントロジー経路、起源および説明	生P値	FDR	経路遺伝子番号	含まれる例示的なバイオマーカー
REACTOME_NON_INTEGRIN_MEMBRANE_ECM_INTERACTIONS	0.0E+00	9.2E-05	59	ITGA2, LAMB3, LAMC2, SDC1
REACTOME_ADHERENS_JUNCTIONS_INTERACTIONS	1.0E-07	2.0E-04	33	CDH1, CDH3, NECTIN1
REACTOME_APOPTOTIC_CLEAVAGE_OF_CELLULAR_PROTEINS	7.0E-07	1.9E-03	38	CDH1, DSG2, DSG3
REACTOME_FATTY_ACIDS	1.0E-06	2.9E-03	15	CYP4F11, CYP4F3
REACTOME_ANCHORING_FIBRIL_FORMATION	1.0E-06	2.9E-03	15	LAMB3, LAMC2
REACTOME_MET_PROMOTES_CELL_MOTILITY	2.0E-06	5.9E-03	41	ITGA2, LAMB3, LAMC2
PID_INTEGRIN5_PATHWAY	5.1E-06	1.5E-02	17	ITGB6, SDC1
KEGG_CELL_ADHESION_MOLECULES_CAMS	1.2E-05	3.5E-02	133	CDH1, CDH3, NECTIN1, NRCAM, SDC1
REACTOME_APOPTOTIC_EXECUTION_PHASE	4.1E-05	1.2E-01	52	CDH1, DSG2, DSG3
REACTOME_ARACHIDONIC_ACID_METABOLISM	1.5E-04	4.4E-01	59	ABCC1, CYP4F11, CYP4F3
REACTOME_OTHER_INTERLEUKIN_SIGNALING	1.9E-04	5.5E-01	24	PTPRZ1, SDC1
REACTOME_O_LINKED_GLYCOSYLATION	2.4E-04	7.1E-01	111	B3GNT5, GALNT14, GALNT3, LARGE2
REACTOME_O_LINKED_GLYCOSYLATION_OF_MUCINS	2.5E-04	7.2E-01	62	B3GNT5, GALNT14, GALNT3
WP_OXIDATION_BY_CYTOCHROME_P450	2.9E-04	8.3E-01	63	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3
PID_INTEGRIN_CS_PATHWAY	3.8E-04	1.0E+00	26	ITGA2, ITGB6
PID_INTEGRIN1_PATHWAY	4.4E-04	1.0E+00	66	ITGA2, LAMB3, LAMC2
REACTOME_CYTOCHROME_P450_ARRANGED_BY_SUBSTRATE_TYPE	4.4E-04	1.0E+00	66	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3
REACTOME_SYNDECAN_INTERACTIONS	5.1E-04	1.0E+00	27	ITGA2, SDC1
WP_METAPATHWAY_BIOTRANSFORMATION_PHASE_I_AND_II	6.1E-04	1.0E+00	185	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, HS6ST2, UGT1A6
WP_HIPPOMERLIN_SIGNALING_DYSREGULATION	6.6E-04	1.0E+00	123	CDH1, CDH3, ITGA2, ITGB6
KEGG_O_GLYCAN_BIOSYNTHESIS	1.1E-03	1.0E+00	30	GALNT14, GALNT3
PID_NECTIN_PATHWAY	1.1E-03	1.0E+00	30	CDH1, NECTIN1
KEGG_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY_ARRVC	1.2E-03	1.0E+00	74	DSG2, ITGA2, ITGB6
WP_ARRHYTHMOGENIC_RIGHT_VENTRICULAR_CARDIOMYOPATHY	1.4E-03	1.0E+00	76	DSG2, ITGA2, ITGB6
REACTOME_HS_GAG_BIOSYNTHESIS	1.4E-03	1.0E+00	31	HS6ST2, SDC1
REACTOME_SIGNALING_BY_MET	1.9E-03	1.0E+00	79	ITGA2, LAMB3, LAMC2
REACTOME_EXTRACELLULAR_MATRIX_ORGANIZATION	3.0E-03	1.0E+00	301	CDH1, ITGA2, ITGB6, LAMB3, LAMC2, SDC1
KEGG_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	3.0E-03	1.0E+00	84	ITGA2, LAMB3, LAMC2
WP_ALPHA_6_BETA_4_SIGNALING_PATHWAY	3.2E-03	1.0E+00	35	LAMB3, LAMC2

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

遺伝子オントロジー経路、起源および説明	生P値	FDR	経路遺伝子番号	含まれる例示的なバイオマーカー
REACTOME_INTEGRIN_CELL_SURFACE_INTERACTIONS	3.2E-03	1.0E+00	85	CDH1, ITGA2, ITGB6
KEGG_HEMATOPOIETIC_CELL_LINEAGE	3.8E-03	1.0E+00	87	CD9, ITGA2, TFRC
REACTOME_RAC2_GTPASE_CYCLE	4.1E-03	1.0E+00	88	DSG2, RACGAP1, TFRC
REACTOME_ELECTRIC_TRANSMISSION_ACROSS_GAP_JUNCTIONS	4.7E-03	1.0E+00	5	PANX2
REACTOME_HYALURONAN_BIOSYNTHESIS_AND_EXPORT	4.7E-03	1.0E+00	5	HAS3
REACTOME_RNA_POLYMERASE_II_TRANSCRIPTION	5.9E-03	1.0E+00	1374	
REACTOME_POST_TRANSLATIONAL_MODIFICATION_SYNTHESIS_OF_GPI_ANCHORED_PROTEINS	6.3E-03	1.0E+00	94	PIGT, PRSS21, ULBP2
REACTOME_RAC3_GTPASE_CYCLE	6.3E-03	1.0E+00	94	DSG2, RACGAP1, TFRC
NABA_BASEMENT_MEMBRANES	6.9E-03	1.0E+00	40	LAMB3, LAMC2
WP_FERROPTOSIS	6.9E-03	1.0E+00	40	SLC7A11, TFRC
WP_SMALL_CELL_LUNG_CANCER	8.2E-03	1.0E+00	98	ITGA2, LAMB3, LAMC2
BIOCARTA_MRP_PATHWAY	1.1E-02	1.0E+00	6	ABCC1
REACTOME_ACROSOME_REACTION_AND_SPERM_OOCYTE_MEMBRANE_BINDING	1.1E-02	1.0E+00	6	CD9
REACTOME_UPTAKE_AND_FUNCTION_OF_DIPHTHERIA_TOXIN	1.1E-02	1.0E+00	6	CD9
REACTOME_SENSING_OF_DNA_DOUBLE_STRAND_BREAKS	1.1E-02	1.0E+00	6	KPNA2
REACTOME_VLDL_CLEARANCE	1.1E-02	1.0E+00	6	LSR
KEGG_ABC_TRANSPORTERS	1.1E-02	1.0E+00	44	ABCA13, ABCC1
REACTOME_PHASE_I_FUNCTIONALIZATION_OF_COMPOUNDS	1.3E-02	1.0E+00	106	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3
WP_MECHANOREGULATION_AND_PATHOLOGY_OF_YAPTAZ_VIA_HIPPO_AND_NONHIPPO_MECHANISMS	1.7E-02	1.0E+00	48	CDH1, ITGB6
PID_ARF6_TRAFFICKING_PATHWAY	1.9E-02	1.0E+00	49	CDH1, ITGA2
BIOCARTA_EEA1_PATHWAY	2.0E-02	1.0E+00	7	TFRC
REACTOME_ATTACHMENT_OF_GPI_ANCHOR_TO_UPAR	2.0E-02	1.0E+00	7	PIGT
REACTOME_NECTIN_NECL_TRANS_HETERODIMERIZATION	2.0E-02	1.0E+00	7	NECTIN1
REACTOME_NRCAM_INTERACTIONS	2.0E-02	1.0E+00	7	NRCAM
REACTOME_NEUROFASCIN_INTERACTIONS	2.0E-02	1.0E+00	7	NRCAM
KEGG_FOCAL_ADHESION	2.3E-02	1.0E+00	199	ITGA2, ITGB6, LAMB3, LAMC2
REACTOME_TRANSPORT_OF_SMALL_MOLECULES	2.4E-02	1.0E+00	728	ABCC1, CLCA2, FXRD3, GNG4, LSR, PARL, SLC15A2, SLC7A11, TFRC
WP_FOCAL_ADHESION	2.5E-02	1.0E+00	202	ITGA2, ITGB6, LAMB3, LAMC2
PID_RAC1_PATHWAY	2.9E-02	1.0E+00	54	CDH1, RACGAP1

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

遺伝子オントロジー経路、起源および説明	生P値	FDR	経路遺伝子番号	含まれる例示的なバイオマーカー
REACTOME_GLYCOSAMINOGLYCAN_METABOLISM	2.9E-02	1.0E+00	124	HAS3, HS6ST2, SDC1
BIOCARTA_CTBP1_PATHWAY	3.1E-02	1.0E+00	8	CDH1
REACTOME_CREB1_PHOSPHORYLATION_THROUGH_THE_ACTIVATION_OF_CAMKII_CAMKK_CAMKIV_CASCADE	3.1E-02	1.0E+00	8	KPNA2
REACTOME_PHOSPHATE_BOND_HYDROLYSIS_BY_NTPDASE_PROTEINS	3.1E-02	1.0E+00	8	ENTPD3
REACTOME_HEPARAN_SULFATE_HEPARIN_HS_GAG_METABOLISM	3.1E-02	1.0E+00	55	HS6ST2, SDC1
WP_FOCAL_ADHESION_PI3K_AKT_MTOR_SIGNALING_PATHWAY	3.3E-02	1.0E+00	309	GNG4, ITGA2, ITGB6, LAMB3, LAMC2
REACTOME_BIOLOGICAL_OXIDATION	4.1E-02	1.0E+00	222	CYP2S1, CYP4F11, CYP4F3, UGT1A6
REACTOME_CHL1_INTERACTIONS	4.5E-02	1.0E+00	9	ITGA2
REACTOME_INLA_MEDIATED_ENTRY_OF_LISTERIA_MONOCYTOGENES INTO_HOST_CELLS	4.5E-02	1.0E+00	9	CDH1
REACTOME_ASSEMBLY_OF_COLLAGEN_FIBRILS_AND_OTHER_MULTIMERIC_STRUCTURES	4.7E-02	1.0E+00	61	LAMB3, LAMC2

10

20

【0591】

(実施例9)

バイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーおよびバイオマーカーの組合せと臨床共変量および公知の変異ドライバーとの相関。

本実施例は、公知の肺がん臨床共変量とある特定のバイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカーとの間の潜在的な関連、および公知の肺がん変異ドライバー（例えば、体細胞変異ドライバー）とある特定のバイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカーとの間の潜在的な関連を示す。

30

【0592】

一部の実施形態では、ヒートマップは、そのような分析のために有用であり得る。例えば、The Cancer Genome Atlas (TCGA) LUSC 試料を使用するある特定の同定されたバイオマーカー遺伝子の横列スケールの遺伝子発現を示すヒートマップを作成し、ここで、それぞれの横列は、バイオマーカー候補を表し、それぞれの縦列は、LUSC 試料における遺伝子発現を表した。ピアソン相関行列を使用して、横列をクラスター化し、ユークリッド距離を使用して、縦列をクラスター化した。両方の寸法を、ウォードアルゴリズムを使用してクラスター化し、最適な葉の順序付けアルゴリズムを用いた。

40

【0593】

一部の実施形態では、1つまたは複数の臨床共変量を、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーの遺伝子発現に加えて考慮した。そのような解析は、病期分類、リンパ節転移、マイクロサテライト不安定性などを含む潜在的なサブグループに対する指標を提供するのに有用であり得る。

【0594】

一部の実施形態では、臨床共変量は、リンパ節転移（例えば、n0、n1、n2、n3、またはn4）、がんステージ、腫瘍グレード、組織型、線維症、血管腫瘍細胞型および／または喫煙量（例えば、パック年）を含んでいた。一部の実施形態では、がんステージは、ステージI、ステージII、ステージIII、またはステージIVがんを含んでいた

50

。一部の実施形態では、喫煙量を、パック年（例えば、本明細書に記載される通り、例えば、1 パック年は、1 年間、1 日あたり 1 パックの喫煙に等しい）を単位として定量化した。

【0595】

この臨床共変量解析は、TCGA 試料内で任意の強いエンリッチメントを同定せず、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーの組合せが、特定の臨床共変量にかかわらず、肺がん試料（例えば、LUSC 試料）を同定するために特に有用であり得ることを実証した（データは示さない）。

【0596】

一部の実施形態では、ある特定のバイオインフォマティクスで同定されたバイオマーカーの遺伝子発現に加えて、1 つまたは複数の変異ドライバー（例えば、変異および変化プロファイルのコピー数を含む）を考慮した。例えば、肺がんのある特定の主要な公知の変異ドライバーとしては、限定されるものではないが、TP53、RB1、PTEN、PIK3CA、NOTCH1、NFE2L2、KMT2D、KEAP1 における変異、またはその組合せが挙げられる。これらのドライバーのそれぞれについては、がん関連変異としては、コピー数変化（CNA；例えば、限定されるものではないが、増幅および／または欠失を含む）、および／または変異（例えば、限定されるものではないが、インフレーション変異、ミスセンス変異、スプライス、および／または短縮変異を含む）が挙げられ得る。クラスタリング解析を、肺がんのバイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカー、バイオマーカーの組合せ、およびある特定の主要な変異ドライバーの間の関連を同定するために行った。

【0597】

この変異ドライバー解析は、TCGA 試料内で任意の強いエンリッチメントを同定せず、ある特定のバイオインフォマティクスで予測されたバイオマーカーおよび／またはバイオマーカーの組合せが、特定の变異ドライバーにかかわらず、肺がん試料（例えば、LUSC 試料）を同定するために特に有用であり得ることを実証した（データは示さない）。

【0598】

（実施例 10）

例示的な肺がんリキッドバイオブシーアッセイの開発

本実施例は、例えば、平均リスク、遺伝的リスク、および／または生活歴関連リスクを有する症状ありまたはなしの対象をスクリーニングするための、例示的な肺がんリキッドバイオブシーアッセイの開発を記載する。バイオマーカー開発に至るステップを、本開示の実施例 7～9 に記載されるようにして行った。試料調製およびアッセイを、実施例 1 および実施例 2 に記載されるようにして行った。

【0599】

肺がんバイオマーカーを、本明細書に記載されるバイオインフォマティクス経路を使用して同定し；ある特定のバイオマーカー（表 3 に提供される）を、市販のモノクローナル抗体標的化細胞株 EV を使用して試験して、例示的なアッセイにおいて高いアビディティおよび選択性を示す抗体クローンを同定した（データは示さない）。少なくとも 1 つの好適な抗体クローンを、表 3 に列挙されるそれぞれのバイオマーカーについて同定した。

10

20

30

40

【表 3】

表3-本明細書に記載される例示的な二重アッセイで試験された肺がんバイオマーカー

番号	バイオマーカー	番号	バイオマーカー
1	ALCAM	12	IG1FR
2	CD55	13	MET
3	CDH1	14	MSLN
4	CDH3	15	MUC1
5	CD274 (PD-L1)	16	SLC34A2
6	CEACAM5	17	sTn 抗原
7	CEACAM6	18	Tn 抗原
8	DSG2	19	T 抗原
9	EGFR	20	TACSTD2
10	EPCAM	21	TNFRSF10B
11	FOLR1		

10

【0600】

下記の表4A、4B、および4Cは、評価されたある特定の二重バイオマーカーの組合せおよびその知見を示す。ある特定の実施形態では、二重バイオマーカーの組合せは、上記の表3に列挙される別個のバイオマーカーのうちの2つを含む。一部の実施形態では、二重バイオマーカーの組合せは、表4Aまたは4Bに記載されるバイオマーカーの組合せのうちの少なくとも1つを含む。

20

【表4A-1】

表4A-例示的な二重アッセイのためのある特定のバイオマーカーの組合せ

試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的	試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的
1	ALCAM	CD274	104	FOLR1	MSLN
2	ALCAM	CD55	105	FOLR1	MUC1
3	ALCAM	CDH1	106	FOLR1	SLC34A2
4	ALCAM	CDH3	107	FOLR1	sTn 抗原
5	ALCAM	CEACAM5	108	FOLR1	T 抗原

30

40

50

【表 4 A - 2】

試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的	試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的
6	ALCAM	CEACAM6	109	FOLR1	TACSTD2
7	ALCAM	EGFR	110	FOLR1	Tn 抗原
8	ALCAM	EPCAM	111	IGF1R	CDH1
9	ALCAM	FOLR1	112	IGF1R	T 抗原
10	ALCAM	IGF1R	113	MET	CDH1
11	ALCAM	MET	114	MET	CDH3
12	ALCAM	MSLN	115	MET	IGF1R
13	ALCAM	MUC1	116	MET	MSLN
14	ALCAM	SLC34A2	117	MET	MUC1
15	ALCAM	sTn 抗原	118	MET	sTn 抗原
16	ALCAM	T 抗原	119	MET	T 抗原
17	ALCAM	TACSTD2	120	MET	TACSTD2
18	ALCAM	Tn 抗原	121	MET	Tn 抗原
19	CDH3	CDH1	122	MSLN	CDH1
20	CDH3	IGF1R	123	MSLN	IGF1R
21	CDH3	MSLN	124	MSLN	sTn 抗原
22	CDH3	sTn 抗原	125	MSLN	T 抗原
23	CDH3	T 抗原	126	MUC1	CDH1
24	CDH3	TACSTD2	127	MUC1	CDH3
25	CEACAM5	CDH1	128	MUC1	IGF1R
26	CEACAM5	CDH3	129	MUC1	MSLN
27	CEACAM5	IGF1R	130	MUC1	sTn 抗原
28	CEACAM5	MET	131	MUC1	T 抗原
29	CEACAM5	MSLN	132	MUC1	TACSTD2
30	CEACAM5	MUC1	133	MUC1	Tn 抗原
31	CEACAM5	sTn 抗原	134	SLC34A2	CD274
32	CEACAM5	T 抗原	135	SLC34A2	CDH1
33	CEACAM5	TACSTD2	136	SLC34A2	CDH3
34	CEACAM5	Tn 抗原	137	SLC34A2	CEACAM5
35	CEACAM6	CD274	138	SLC34A2	EGFR
36	CEACAM6	CDH1	139	SLC34A2	IGF1R
37	CEACAM6	CDH3	140	SLC34A2	MET
38	CEACAM6	CEACAM5	141	SLC34A2	MSLN
39	CEACAM6	EGFR	142	SLC34A2	MUC1
40	CEACAM6	EPCAM	143	SLC34A2	sTn 抗原
41	CEACAM6	FOLR1	144	SLC34A2	T 抗原
42	CEACAM6	IGF1R	145	SLC34A2	TACSTD2

10

20

30

40

50

【表 4 A - 3】

試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的	試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的
43	CEACAM6	MET	146	SLC34A2	Tn 抗原
44	CEACAM6	MSLN	147	sTn 抗原	CDH1
45	CEACAM6	MUC1	148	sTn 抗原	IGF1R
46	CEACAM6	SLC34A2	149	T 抗原	CDH1
47	CEACAM6	sTn 抗原	150	TACSTD2	CDH1
48	CEACAM6	T 抗原	151	TACSTD2	IGF1R
49	CEACAM6	TACSTD2	152	TACSTD2	MSLN
50	CEACAM6	Tn 抗原	153	TACSTD2	sTn 抗原
51	DSG2	ALCAM	154	TACSTD2	T 抗原
52	DSG2	CD274	155	Tn 抗原	CDH1
53	DSG2	CD55	156	Tn 抗原	CDH3
54	DSG2	CDH1	157	Tn 抗原	IGF1R
55	DSG2	CDH3	158	Tn 抗原	MSLN
56	DSG2	CEACAM5	159	Tn 抗原	TACSTD2
57	DSG2	CEACAM6	160	TNFRSF10B	ALCAM
58	DSG2	EGFR	161	TNFRSF10B	CD274
59	DSG2	EPCAM	162	TNFRSF10B	CD55
60	DSG2	FOLR1	163	TNFRSF10B	CDH1
61	DSG2	IGF1R	164	TNFRSF10B	CDH3
62	DSG2	MET	165	TNFRSF10B	CEACAM5
63	DSG2	MSLN	166	TNFRSF10B	CEACAM6
64	DSG2	MUC1	167	TNFRSF10B	EGFR
65	DSG2	SLC34A2	168	TNFRSF10B	EPCAM
66	DSG2	sTn 抗原	169	TNFRSF10B	FOLR1
67	DSG2	T 抗原	170	TNFRSF10B	IGF1R
68	DSG2	TACSTD2	171	TNFRSF10B	MET
69	DSG2	Tn 抗原	172	TNFRSF10B	MSLN
70	EGFR	CD274	173	TNFRSF10B	MUC1
71	EGFR	CDH1	174	TNFRSF10B	SLC34A2
72	EGFR	CDH3	175	TNFRSF10B	sTn 抗原
73	EGFR	CEACAM5	176	TNFRSF10B	T 抗原
74	EGFR	IGF1R	177	TNFRSF10B	TACSTD2
75	EGFR	MET	178	TNFRSF10B	Tn 抗原
76	EGFR	MSLN	179	CD274	CDH1
77	EGFR	MUC1	180	CD274	CDH3
78	EGFR	sTn 抗原	181	CD274	CEACAM5
79	EGFR	T 抗原	182	CD274	IGF1R

10

20

30

40

50

【表 4 A - 4】

試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的	試験	捕捉プローブ標的	検出プローブ標的
80	EGFR	TACSTD2	183	CD274	MET
81	EGFR	Tn 抗原	184	CD274	MSLN
82	EPCAM	CD274	185	CD274	MUC1
83	EPCAM	CDH1	186	CD274	sTn 抗原
84	EPCAM	CDH3	187	CD274	T 抗原
85	EPCAM	CEACAM5	188	CD274	TACSTD2
86	EPCAM	EGFR	189	CD274	Tn 抗原
87	EPCAM	FOLR1	190	CD55	CD274
88	EPCAM	IGF1R	191	CD55	CDH1
89	EPCAM	MET	192	CD55	CDH3
90	EPCAM	MSLN	193	CD55	CEACAM5
91	EPCAM	MUC1	194	CD55	CEACAM6
92	EPCAM	SLC34A2	195	CD55	EGFR
93	EPCAM	sTn 抗原	196	CD55	EPCAM
94	EPCAM	T 抗原	197	CD55	FOLR1
95	EPCAM	TACSTD2	198	CD55	IGF1R
96	EPCAM	Tn 抗原	199	CD55	MET
97	FOLR1	CD274	200	CD55	MSLN
98	FOLR1	CDH1	201	CD55	MUC1
99	FOLR1	CDH3	202	CD55	SLC34A2
100	FOLR1	CEACAM5	203	CD55	sTn 抗原
101	FOLR1	EGFR	204	CD55	T 抗原
102	FOLR1	IGF1R	205	CD55	TACSTD2
103	FOLR1	MET	206	CD55	Tn 抗原

【 0 6 0 1 】

ある特定のバイオマーカーの組合せの追加査定

ある特定のバイオマーカーの組合せを、肺腺癌、肺扁平上皮細胞癌、または健康な未喫煙者プールからの対象の試料においてアッセイした。ある特定のバイオマーカーの組合せ、例えば、表 4 B に提供されるものは、下記に記載される例示的なカットオフ基準に基づく、例えば、肺腺癌および肺扁平上皮細胞癌（L U N G）を含む肺がんの検出のため、または肺腺癌（L U A D）の検出のため、または肺扁平上皮細胞癌（L U S q C）の検出のために特に有用であることが観察された。アッセイ反復の中央値を、この分析のために使用した。

・肺

○ L U A D プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t > 2$

○ L U S q C プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t > 2$

・ L U A D

○ L U A D プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t > 2$

○ L U S q C プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t < 2$

・ L U S q C

○ L U S q C プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t > 2$

○ L U A D プールと健康な未喫煙者プールとの間で $\Delta C t < 2$

【表 4 B - 1】

表 4B - 例示的な二重アッセイのためのある特定のバイオマーカーの組合せ。下記に開示されるそれぞれのバイオマーカーの組合せについて、一部の実施形態では、捕捉バイオマーカーが検出バイオマーカーとして使用されることがあり、検出バイオマーカーが捕捉バイオマーカーとして使用されることがあることに留意されたい。

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
1	STn, MUC1 + CEACAM6	LUNG
2	STn, FOLR1 + FOLR1	LUAD
3	STn, CD9 + CD9	
4	STn, TSPAN8 + TSPAN8	
5	STn, TFRC + TFRC	
6	STn, MUC1 + MUC1	LUNG
7	STn, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
8	STn, sLeX + sLeX	LUNG
9	STn, CD55 + CD55	
10	STn, EPCAM + EPCAM	LUNG
11	STn, MSLN + MSLN	LUAD
12	STn, LeX + LeX	
13	STn, BCAP31 + BCAP31	
14	STn, ITGA2 + ITGA2	
15	STn, NT5E + NT5E	LUAD
16	STn, MUC1 + MUC1	LUAD
17	STn, TACSTD2 + TACSTD2	LUNG
18	STn, ALCAM + ALCAM	
19	STn, MARCKSL1 + MARCKSL1	LUNG
20	STn, MET + MET	
21	STn, VWA1 + VWA1	
22	STn, PS + PS	
23	STn, CD274 + CD274	
24	STn, T + T	LUNG
25	STn, MUC4 + MUC4	LUNG
26	STn, CEACAM6 + CEACAM6	LUNG

10

20

30

40

50

【表 4 B - 2】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
27	STn, IL1RAP + IL1RAP	
28	STn, PTGFRN + PTGFRN	
29	STn, LEY + LEY	LUAD
30	STn, SDC1 + SDC1	LUSqC
31	MUC1, CEACAM6 + STn	LUNG
32	MUC1, LeX + LeX	LUAD
33	MUC1, FOLR1 + FOLR1	LUAD
34	MUC1, CD9 + CD9	
35	MUC1, sLeX + sLeX	LUAD
36	MUC1, CD55 + CD55	LUAD
37	MUC1, NT5E + NT5E	LUAD
38	MUC1, TFRC + TFRC	
39	MUC1, PTGFRN + PTGFRN	
40	MUC1, CEACAM6 + CEACAM6	LUNG
41	MUC1, TACSTD2 + TACSTD2	LUNG
42	MUC1, STn + STn	LUNG
43	MUC1, LEY + LEY	LUNG
44	MUC1, ALCAM + ALCAM	LUAD
45	MUC1, BCAP31 + BCAP31	
46	MUC1, CD274 + CD274	
47	MUC1, EPCAM + EPCAM	LUNG
48	MUC1, MUC1 + MUC1	
49	MUC1, MUC1 + MUC1	LUAD
50	MUC1, PS + PS	
51	MUC1, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
52	MUC1, MSLN + MSLN	
53	MUC1, MUC4 + MUC4	LUNG
54	MUC1, Tn + Tn	
55	MUC1, MARCKSL1 + MARCKSL1	
56	MUC1, ITGA2 + ITGA2	
57	MUC1, T + T	
58	MUC1, DSC2 + DSC2	
59	MUC1, VWA1 + VWA1	LUSqC
60	MUC1, SLC34A2 + SLC34A2	LUAD
61	EPCAM, LeX + LeX	
62	EPCAM, FOLR1 + FOLR1	
63	EPCAM, ALCAM + ALCAM	
64	EPCAM, TACSTD2 + TACSTD2	
65	EPCAM, LEY + LEY	
66	EPCAM, BCAP31 + BCAP31	
67	EPCAM, CD55 + CD55	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 3】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
68	EPCAM, T + T	
69	EPCAM, NT5E + NT5E	
70	EPCAM, sLeX + sLeX	LUAD
71	EPCAM, STn + STn	LUSqC
72	EPCAM, CD9 + CD9	
73	EPCAM, CD274 + CD274	
74	EPCAM, MUC1 + MUC1	
75	EPCAM, CEACAM6 + CEACAM6	
76	EPCAM, MUC1 + MUC1	
77	EPCAM, PTGFRN + PTGFRN	
78	EPCAM, MUC4 + MUC4	
79	EPCAM, MARCKSL1 + MARCKSL1	
80	EPCAM, TFRC + TFRC	
81	EPCAM, MET + MET	
82	EPCAM, PS + PS	
83	EPCAM, TSPAN8 + TSPAN8	
84	EPCAM, EGFR + EGFR	LUNG
85	FOLR1, TACSTD2 + TACSTD2	
86	FOLR1, MUC1 + MUC1	
87	FOLR1, LeX + LeX	
88	FOLR1, CD9 + CD9	
89	FOLR1, MUC1 + MUC1	
90	FOLR1, MUC1 + MUC1	
91	FOLR1, Tn + Tn	
92	FOLR1, STn + STn	LUNG
93	FOLR1, BCAP31 + BCAP31	
94	FOLR1, PS + PS	
95	FOLR1, sLeX + sLeX	
96	FOLR1, TFRC + TFRC	
97	FOLR1, LEY + LEY	
98	FOLR1, ITGA2 + ITGA2	
99	FOLR1, NT5E + NT5E	
100	FOLR1, EGFR + EGFR	LUSqC
101	FOLR1, MARCKSL1 + MARCKSL1	LUSqC
102	FOLR1, T + T	
103	MSLN, CD55 + CD55	
104	MSLN, CD9 + CD9	
105	MSLN, TACSTD2 + TACSTD2	
106	MSLN, TSPAN8 + TSPAN8	
107	MSLN, BCAP31 + BCAP31	
108	MSLN, EPCAM + EPCAM	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 4】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
109	MSLN, LeX + LeX	
110	MSLN, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
111	MSLN, FOLR1 + FOLR1	
112	MSLN, TFRC + TFRC	
113	MSLN, MUC1 + MUC1	
114	MSLN, NT5E + NT5E	
115	SLC34A2, LeX + LeX	
116	SLC34A2, FOLR1 + FOLR1	
117	SLC34A2, CD55 + CD55	
118	SLC34A2, CEACAM6 + CEACAM6	
119	SLC34A2, sLeX + sLeX	
120	SLC34A2, NT5E + NT5E	
121	SLC34A2, TACSTD2 + TACSTD2	
122	SLC34A2, BCAP31 + BCAP31	
123	SLC34A2, CD274 + CD274	
124	SLC34A2, LEY + LEY	
125	SLC34A2, ITGA2 + ITGA2	
126	SLC34A2, PTGFRN + PTGFRN	LUSqC
127	TACSTD2, FOLR1 + FOLR1	
128	TACSTD2, LeX + LeX	
129	TACSTD2, CD9 + CD9	
130	TACSTD2, EPCAM + EPCAM	LUNG
131	TACSTD2, MUC1 + MUC1	
132	TACSTD2, LEY + LEY	
133	TACSTD2, MUC1 + MUC1	
134	TACSTD2, sLeX + sLeX	LUAD
135	TACSTD2, CEACAM6 + CEACAM6	
136	TACSTD2, MUC1 + MUC1	
137	TACSTD2, CD55 + CD55	
138	TACSTD2, TSPAN8 + TSPAN8	
139	TACSTD2, NT5E + NT5E	
140	TACSTD2, MSLN + MSLN	
141	TACSTD2, Tn + Tn	
142	TACSTD2, TFRC + TFRC	
143	TACSTD2, CEACAM5 + CEACAM5	
144	TACSTD2, ALCAM + ALCAM	
145	TACSTD2, PS + PS	
146	TACSTD2, BCAP31 + BCAP31	
147	TACSTD2, MUC4 + MUC4	
148	TACSTD2, CD274 + CD274	
149	TACSTD2, T + T	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 5】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
150	TACSTD2, MARCKSL1 + MARCKSL1	LUAD
151	T, EPCAM + EPCAM	LUNG
152	T, CEACAM6 + CEACAM6	LUNG
153	T, ITGA2 + ITGA2	LUAD
154	T, CD55 + CD55	
155	T, Tn + Tn	LUAD
156	T, NT5E + NT5E	
157	T, CD9 + CD9	
158	T, PTGFRN + PTGFRN	LUSqC
159	T, EGFR + EGFR	
160	T, TFRC + TFRC	
161	T, FOLR1 + FOLR1	
162	T, MUC1 + MUC1	LUAD
163	T, PS + PS	
164	T, BCAP31 + BCAP31	LUAD
165	T, LeX + LeX	LUAD
166	T, TSPAN8 + TSPAN8	LUAD
167	T, ALCAM + ALCAM	
168	T, MUC1 + MUC1	
169	T, MUC1 + MUC1	LUAD
170	T, MSLN + MSLN	
171	T, MET + MET	LUAD
172	T, TACSTD2 + TACSTD2	LUAD
173	T, CD274 + CD274	
174	T, MUC4 + MUC4	
175	LEY, CD9 + CD9	
176	LEY, TACSTD2 + TACSTD2	
177	LEY, ITGA2 + ITGA2	
178	LEY, MUC1 + MUC1	LUAD
179	LEY, CD55 + CD55	
180	LEY, NT5E + NT5E	
181	LEY, ALCAM + ALCAM	
182	LEY, BCAP31 + BCAP31	
183	LEY, MUC1 + MUC1	LUAD
184	LEY, MUC1 + MUC1	LUAD
185	LEY, EPCAM + EPCAM	
186	LEY, LeX + LeX	
187	LEY, TFRC + TFRC	
188	LEY, PS + PS	
189	LEY, FOLR1 + FOLR1	
190	LEY, EGFR + EGFR	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 6】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
191	LEY, TSPAN8 + TSPAN8	
192	LEY, LEY + LEY	
193	LEY, MARCKSL1 + MARCKSL1	LUNG
194	LEY, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
195	LEY, MSLN + MSLN	
196	LEY, CD274 + CD274	
197	LEY, MUC4 + MUC4	LUNG
198	LEY, IL1RAP + IL1RAP	
199	PS, ALCAM + ALCAM	
200	PS, BCAP31 + BCAP31	
201	PS, EPCAM + EPCAM	
202	PS, T + T	
203	PS, CEACAM5 + CEACAM5	
204	PS, CD9 + CD9	
205	PS, FOLR1 + FOLR1	
206	PS, LeX + LeX	LUAD
207	PS, MARCKSL1 + MARCKSL1	
208	PS, LEY + LEY	
209	PS, MUC1 + MUC1	
210	PS, CD274 + CD274	LUNG
211	LeX, FOLR1 + FOLR1	LUAD
212	LeX, EPCAM + EPCAM	LUAD
213	LeX, CD55 + CD55	
214	LeX, TACSTD2 + TACSTD2	LUAD
215	LeX, TSPAN8 + TSPAN8	
216	LeX, BCAP31 + BCAP31	
217	LeX, PS + PS	LUAD
218	LeX, NT5E + NT5E	LUAD
219	LeX, MUC1 + MUC1	LUNG
220	LeX, CD9 + CD9	
221	LeX, MUC1 + MUC1	LUAD
222	LeX, TFRC + TFRC	
223	LeX, SLC34A2 + SLC34A2	
224	LeX, MSLN + MSLN	
225	LeX, ALCAM + ALCAM	
226	LeX, STn + STn	LUAD
227	LeX, VWA1 + VWA1	
228	LeX, MUC1 + MUC1	LUAD
229	LeX, CEACAM5 + CEACAM5	LUAD
230	LeX, LEY + LEY	LUAD
231	LeX, IL1RAP + IL1RAP	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 7】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
232	LeX, ITGA2 + ITGA2	
233	LeX, MET + MET	
234	LeX, PTGFRN + PTGFRN	
235	LeX, CD274 + CD274	
236	LeX, CEACAM6 + CEACAM6	
237	LeX, MARCKSL1 + MARCKSL1	
238	LeX, T + T	
239	LeX, EGFR + EGFR	LUAD
240	LeX, SDC1 + SDC1	
241	sLeX, CD9 + CD9	
242	sLeX, TACSTD2 + TACSTD2	LUNG
243	sLeX, TSPAN8 + TSPAN8	
244	sLeX, NT5E + NT5E	LUAD
245	sLeX, BCAP31 + BCAP31	
246	sLeX, EPCAM + EPCAM	LUAD
247	sLeX, FOLR1 + FOLR1	LUAD
248	sLeX, CD55 + CD55	
249	sLeX, MUC1 + MUC1	LUAD
250	sLeX, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
251	sLeX, TFRC + TFRC	
252	sLeX, ALCAM + ALCAM	
253	sLeX, MUC1 + MUC1	LUAD
254	sLeX, MET + MET	
255	sLeX, VWA1 + VWA1	
256	sLeX, T + T	LUAD
257	sLeX, CD274 + CD274	
258	sLeX, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
259	sLeX, STn + STn	LUAD
260	sLeX, MUC1 + MUC1	LUAD
261	sLeX, LeX + LeX	
262	sLeX, IL1RAP + IL1RAP	
263	sLeX, MUC4 + MUC4	LUNG
264	sLeX, SDC1 + SDC1	
265	MUC1, FOLR1 + FOLR1	LUAD
266	MUC1, LeX + LeX	LUAD
267	MUC1, MUC1 + MUC1	
268	MUC1, TACSTD2 + TACSTD2	
269	MUC1, MUC1 + MUC1	
270	MUC1, NT5E + NT5E	
271	MUC1, STn + STn	LUNG
272	MUC1, sLeX + sLeX	LUAD

10

20

30

40

50

【表 4 B - 8】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
273	MUC1, CD55 + CD55	
274	MUC1, CD9 + CD9	
275	MUC1, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
276	MUC1, TFRC + TFRC	
277	MUC1, CD9 + CD9	
278	MUC1, TACSTD2 + TACSTD2	LUNG
279	MUC1, FOLR1 + FOLR1	LUAD
280	MUC1, MUC1 + MUC1	LUAD
281	MUC1, CEACAM6 + CEACAM6	LUNG
282	MUC1, LeX + LeX	
283	MUC1, sLeX + sLeX	LUAD
284	MUC1, CD55 + CD55	
285	MUC1, TFRC + TFRC	
286	MUC1, NT5E + NT5E	
287	MUC1, EPCAM + EPCAM	LUNG
288	MUC1, MUC1 + MUC1	LUAD
289	MUC1, BCAP31 + BCAP31	
290	MUC1, Tn + Tn	
291	MUC1, STn + STn	LUAD
292	MUC1, ALCAM + ALCAM	
293	MUC1, LEY + LEY	
294	MUC1, ITGA2 + ITGA2	
295	MUC1, PTGFRN + PTGFRN	
296	MUC1, PS + PS	
297	MUC1, EGFR + EGFR	
298	MUC1, MSLN + MSLN	
299	MUC1, MARCKSL1 + MARCKSL1	
300	MUC1, TSPAN8 + TSPAN8	
301	CEACAM5, LeX + LeX	LUAD
302	CEACAM5, sLeX + sLeX	LUAD
303	CEACAM5, TACSTD2 + TACSTD2	
304	CEACAM5, CD55 + CD55	
305	CEACAM5, MUC4 + MUC4	
306	CEACAM5, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
307	CEACAM5, LEY + LEY	
308	CEACAM5, PTGFRN + PTGFRN	
309	CEACAM5, NT5E + NT5E	
310	CEACAM5, CD9 + CD9	
311	CEACAM5, ALCAM + ALCAM	
312	CEACAM5, STn + STn	LUNG
313	CEACAM5, PS + PS	LUSqC

10

20

30

40

50

【表 4 B - 9】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
314	CEACAM5, Tn + Tn	
315	CEACAM5, EGFR + EGFR	LUNG
316	CEACAM5, T + T	
317	CEACAM5, FOLR1 + FOLR1	
318	CEACAM5, IL1RAP + IL1RAP	
319	CEACAM6, CD55 + CD55	
320	CEACAM6, CD9 + CD9	
321	CEACAM6, TACSTD2 + TACSTD2	LUSqC
322	CEACAM6, TSPAN8 + TSPAN8	
323	CEACAM6, LeX + LeX	
324	CEACAM6, NT5E + NT5E	
325	CEACAM6, PTGFRN + PTGFRN	LUSqC
326	CEACAM6, EGFR + EGFR	
327	CEACAM6, FOLR1 + FOLR1	LUAD
328	CEACAM6, CD274 + CD274	
329	CEACAM6, EPCAM + EPCAM	
330	CEACAM6, MUC1 + MUC1	LUNG
331	CEACAM6, BCAP31 + BCAP31	
332	CEACAM6, MUC1 + MUC1	LUNG
333	CEACAM6, sLeX + sLeX	
334	CEACAM6, ITGA2 + ITGA2	
335	CEACAM6, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
336	CEACAM6, T + T	
337	CEACAM6, LEY + LEY	
338	CEACAM6, PS + PS	
339	CEACAM6, TFRC + TFRC	
340	CEACAM6, MSLN + MSLN	
341	CEACAM6, SLC34A2 + SLC34A2	
342	CEACAM6, STn + STn	LUNG
343	CEACAM6, ALCAM + ALCAM	
344	CEACAM6, MET + MET	
345	CEACAM6, Tn + Tn	
346	CEACAM6, MUC4 + MUC4	
347	CEACAM6, IL1RAP + IL1RAP	LUSqC
348	CEACAM6, SDC1 + SDC1	
349	TRPV4, CEACAM6 + CEACAM6	LUSqC
350	TRPV4, TFRC + TFRC	
351	TRPV4, ITGA2 + ITGA2	
352	TRPV4, CD9 + CD9	
353	TRPV4, CEACAM5 + CEACAM5	
354	TRPV4, MUC4 + MUC4	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 0】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
355	TRPV4, VWA1 + VWA1	
356	TRPV4, BCAP31 + BCAP31	
357	TRPV4, PTGFRN + PTGFRN	
358	TRPV4, CD55 + CD55	
359	TRPV4, LEY + LEY	LUSqC
360	TRPV4, IL1RAP + IL1RAP	
361	TRPV4, MUC1 + MUC1	LUAD
362	TRPV4, EGFR + EGFR	
363	TRPV4, TSPAN8 + TSPAN8	
364	TRPV4, MET + MET	LUNG
365	TRPV4, STn + STn	LUAD
366	TRPV4, EPCAM + EPCAM	
367	TRPV4, NT5E + NT5E	
368	TRPV4, TACSTD2 + TACSTD2	LUSqC
369	TRPV4, CD274 + CD274	
370	TRPV4, Tn + Tn	
371	TRPV4, SLC34A2 + SLC34A2	
372	TRPV4, FOLR1 + FOLR1	
373	ALCAM, EPCAM + EPCAM	
374	ALCAM, ALCAM + ALCAM	
375	ALCAM, CD9 + CD9	
376	ALCAM, LEY + LEY	
377	ALCAM, PS + PS	LUAD
378	ALCAM, T + T	
379	ALCAM, TACSTD2 + TACSTD2	
380	ALCAM, LeX + LeX	
381	ALCAM, ITGA2 + ITGA2	
382	ALCAM, sLeX + sLeX	LUSqC
383	ALCAM, CD55 + CD55	
384	ALCAM, NT5E + NT5E	
385	ITGA2, NT5E + NT5E	
386	ITGA2, T + T	
387	ITGA2, CD55 + CD55	
388	ITGA2, CD9 + CD9	
389	ITGA2, PTGFRN + PTGFRN	
390	ITGA2, LEY + LEY	
391	ITGA2, MUC4 + MUC4	
392	ITGA2, MUC1 + MUC1	
393	ITGA2, EGFR + EGFR	
394	ITGA2, ALCAM + ALCAM	
395	ITGA2, TFRC + TFRC	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 1】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
396	ITGA2, FOLR1 + FOLR1	
397	ITGA2, CD274 + CD274	
398	ITGA2, BCAP31 + BCAP31	
399	ITGA2, PS + PS	
400	ITGA2, MUC1 + MUC1	
401	ITGA2, MUC1 + MUC1	
402	ITGA2, LeX + LeX	
403	PTGFRN, LeX + LeX	
404	PTGFRN, CEACAM6 + CEACAM6	
405	PTGFRN, ITGA2 + ITGA2	
406	PTGFRN, NT5E + NT5E	
407	PTGFRN, CD9 + CD9	
408	PTGFRN, CEACAM5 + CEACAM5	
409	PTGFRN, CD55 + CD55	
410	PTGFRN, TACSTD2 + TACSTD2	
411	PTGFRN, MUC4 + MUC4	
412	PTGFRN, T + T	
413	PTGFRN, CD274 + CD274	
414	PTGFRN, MUC1 + MUC1	
415	IL1RAP, TFRC + TFRC	
416	IL1RAP, PS + PS	
417	IL1RAP, CD9 + CD9	
418	IL1RAP, LeX + LeX	
419	IL1RAP, CD274 + CD274	
420	IL1RAP, MSLN + MSLN	
421	IL1RAP, FOLR1 + FOLR1	
422	IL1RAP, ALCAM + ALCAM	
423	IL1RAP, TACSTD2 + TACSTD2	
424	IL1RAP, BCAP31 + BCAP31	
425	IL1RAP, PTGFRN + PTGFRN	
426	IL1RAP, Tn + Tn	
427	IL1RAP, TSPAN8 + TSPAN8	
428	IL1RAP, VWA1 + VWA1	
429	IL1RAP, MUC4 + MUC4	
430	IL1RAP, SDC1 + SDC1	
431	IL1RAP, CEACAM5 + CEACAM5	
432	IL1RAP, NT5E + NT5E	
433	NT5E, CD9 + CD9	
434	NT5E, ITGA2 + ITGA2	
435	NT5E, CEACAM6 + CEACAM6	LUSqC
436	NT5E, TSPAN8 + TSPAN8	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 2】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
437	NT5E, CD55 + CD55	
438	NT5E, LeX + LeX	
439	NT5E, TACSTD2 + TACSTD2	LUSqC
440	NT5E, CD274 + CD274	
441	NT5E, T + T	
442	NT5E, TFRC + TFRC	
443	NT5E, EGFR + EGFR	
444	NT5E, sLeX + sLeX	
445	NT5E, PTGFRN + PTGFRN	
446	NT5E, MUC1 + MUC1	
447	NT5E, EPCAM + EPCAM	
448	NT5E, FOLR1 + FOLR1	
449	NT5E, MUC1 + MUC1	LUAD
450	NT5E, LEY + LEY	
451	NT5E, ALCAM + ALCAM	
452	NT5E, PS + PS	
453	NT5E, MET + MET	LUAD
454	NT5E, MUC1 + MUC1	LUAD
455	NT5E, SLC34A2 + SLC34A2	
456	NT5E, IL1RAP + IL1RAP	
457	CD9, EPCAM + EPCAM	
458	CD9, FOLR1 + FOLR1	
459	CD9, TSPAN8 + TSPAN8	
460	CD9, LeX + LeX	
461	CD9, TFRC + TFRC	
462	CD9, TACSTD2 + TACSTD2	
463	CD9, CD55 + CD55	
464	CD9, PS + PS	
465	CD9, CEACAM6 + CEACAM6	
466	CD9, NT5E + NT5E	
467	CD9, MSLN + MSLN	
468	CD9, MUC1 + MUC1	
469	CD9, STn + STn	
470	CD9, MUC1 + MUC1	
471	CD9, MUC1 + MUC1	
472	CD9, ITGA2 + ITGA2	
473	CD9, LEY + LEY	
474	CD9, ALCAM + ALCAM	
475	CD9, sLeX + sLeX	LUAD
476	CD9, CD274 + CD274	
477	CD9, BCAP31 + BCAP31	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 3】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
478	CD9, PTGFRN + PTGFRN	
479	CD9, IL1RAP + IL1RAP	
480	CD9, MET + MET	
481	CD9, MUC4 + MUC4	
482	CD9, T + T	
483	CD9, MARCKSL1 + MARCKSL1	
484	CD9, EGFR + EGFR	
485	CD9, CEACAM5 + CEACAM5	
486	CD9, VWA1 + VWA1	
487	EGFR, CD55 + CD55	
488	EGFR, NT5E + NT5E	
489	EGFR, CEACAM6 + CEACAM6	
490	EGFR, T + T	LUSqC
491	EGFR, ITGA2 + ITGA2	
492	EGFR, PTGFRN + PTGFRN	LUSqC
493	EGFR, FOLR1 + FOLR1	LUSqC
494	EGFR, PS + PS	LUSqC
495	EGFR, MUC4 + MUC4	
496	EGFR, TSPAN8 + TSPAN8	
497	EGFR, CD9 + CD9	
498	EGFR, MET + MET	LUSqC
499	TSPAN8, EPCAM + EPCAM	
500	TSPAN8, CD9 + CD9	
501	TSPAN8, LeX + LeX	
502	TSPAN8, CD55 + CD55	
503	TSPAN8, BCAP31 + BCAP31	
504	TSPAN8, CEACAM6 + CEACAM6	
505	TSPAN8, NT5E + NT5E	
506	TSPAN8, sLeX + sLeX	
507	TSPAN8, TACSTD2 + TACSTD2	
508	TSPAN8, EGFR + EGFR	LUNG
509	TSPAN8, MSLN + MSLN	
510	TSPAN8, PS + PS	
511	TSPAN8, STn + STn	LUAD
512	TSPAN8, LEY + LEY	
513	TSPAN8, ITGA2 + ITGA2	
514	TSPAN8, T + T	
515	TSPAN8, VWA1 + VWA1	
516	TSPAN8, MUC1 + MUC1	
517	TSPAN8, PTGFRN + PTGFRN	
518	TSPAN8, CD274 + CD274	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 4】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
519	TSPAN8, TFRC + TFRC	
520	TSPAN8, MUC4 + MUC4	
521	TSPAN8, MUC1 + MUC1	
522	TSPAN8, MUC1 + MUC1	
523	MUC4, TACSTD2 + TACSTD2	
524	MUC4, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
525	MUC4, EGFR + EGFR	LUSqC
526	MUC4, sLeX + sLeX	LUNG
527	MUC4, CD9 + CD9	
528	MUC4, NT5E + NT5E	LUAD
529	MUC4, FOLR1 + FOLR1	LUAD
530	MUC4, PTGFRN + PTGFRN	
531	MUC4, CD55 + CD55	LUAD
532	MUC4, MUC1 + MUC1	LUAD
533	MUC4, ITGA2 + ITGA2	
534	MUC4, ALCAM + ALCAM	
535	MUC4, EPCAM + EPCAM	
536	MUC4, LeX + LeX	LUAD
537	MUC4, MUC1 + MUC1	LUAD
538	MUC4, LEY + LEY	LUAD
539	MUC4, PS + PS	
540	MUC4, CD274 + CD274	
541	MUC4, Tn + Tn	
542	MUC4, TSPAN8 + TSPAN8	
543	MUC4, SDC1 + SDC1	
544	MUC4, SLC34A2 + SLC34A2	
545	MUC4, STn + STn	LUAD
546	MUC4, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
547	TNFRSF10B, CD55 + CD55	
548	TNFRSF10B, EGFR + EGFR	LUSqC
549	TNFRSF10B, TFRC + TFRC	
550	TNFRSF10B, NT5E + NT5E	
551	TNFRSF10B, LEY + LEY	
552	TNFRSF10B, CD9 + CD9	
553	TNFRSF10B, BCAP31 + BCAP31	
554	TNFRSF10B, CD274 + CD274	
555	TNFRSF10B, PTGFRN + PTGFRN	
556	TNFRSF10B, T + T	
557	TNFRSF10B, FOLR1 + FOLR1	
558	TNFRSF10B, LeX + LeX	
559	CD274, CEACAM6 + CEACAM6	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 5】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
560	CD274, CD9 + CD9	
561	CD274, TFRC + TFRC	
562	CD274, CD55 + CD55	
563	CD274, NT5E + NT5E	
564	CD274, PTGFRN + PTGFRN	
565	CD274, TACSTD2 + TACSTD2	
566	CD274, ITGA2 + ITGA2	
567	CD274, sLeX + sLeX	
568	CD274, FOLR1 + FOLR1	
569	CD274, LEY + LEY	
570	CD274, LeX + LeX	
571	CD274, EGFR + EGFR	
572	CD274, PS + PS	
573	CD274, IL1RAP + IL1RAP	
574	CD274, MSLN + MSLN	
575	CD274, MUC4 + MUC4	
576	CD274, Tn + Tn	
577	LAMB3, Tn + Tn	
578	LAMB3, CEACAM6 + CEACAM6	
579	LAMB3, T + T	
580	LAMB3, LEY + LEY	
581	LAMB3, CD9 + CD9	
582	LAMB3, TFRC + TFRC	
583	LAMB3, TSPAN8 + TSPAN8	
584	LAMB3, ITGA2 + ITGA2	
585	LAMB3, MUC4 + MUC4	
586	LAMB3, BCAP31 + BCAP31	
587	LAMB3, PTGFRN + PTGFRN	
588	LAMB3, TACSTD2 + TACSTD2	
589	SDC1, Tn + Tn	
590	SDC1, LeX + LeX	
591	SDC1, sLeX + sLeX	
592	SDC1, CD9 + CD9	
593	SDC1, T + T	
594	SDC1, TACSTD2 + TACSTD2	
595	TFRC, CD9 + CD9	
596	TFRC, FOLR1 + FOLR1	
597	TFRC, CD274 + CD274	
598	TFRC, NT5E + NT5E	
599	TFRC, TACSTD2 + TACSTD2	LUSqC
600	TFRC, LEY + LEY	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 6】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
601	TFRC, ITGA2 + ITGA2	
602	TFRC, IL1RAP + IL1RAP	
603	TFRC, T + T	LUSqC
604	TFRC, MUC1 + MUC1	
605	TFRC, STn + STn	LUNG
606	TFRC, MUC1 + MUC1	
607	CD55, LeX + LeX	
608	CD55, CEACAM6 + CEACAM6	
609	CD55, CD9 + CD9	
610	CD55, TSPAN8 + TSPAN8	
611	CD55, ITGA2 + ITGA2	
612	CD55, MSLN + MSLN	
613	CD55, EPCAM + EPCAM	LUAD
614	CD55, EGFR + EGFR	
615	CD55, LEY + LEY	
616	CD55, NT5E + NT5E	
617	CD55, TACSTD2 + TACSTD2	
618	CD55, T + T	
619	CD55, CD274 + CD274	
620	CD55, BCAP31 + BCAP31	
621	CD55, PS + PS	
622	CD55, MUC1 + MUC1	LUAD
623	CD55, MUC1 + MUC1	
624	CD55, PTGFRN + PTGFRN	
625	CD55, ALCAM + ALCAM	
626	CD55, sLeX + sLeX	
627	CD55, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
628	CD55, MUC4 + MUC4	
629	CD55, STn + STn	LUNG
630	CD55, MET + MET	
631	CD109, ITGA2 + ITGA2	
632	CD109, CD9 + CD9	
633	CD109, T + T	
634	CD109, CD55 + CD55	
635	CD109, PTGFRN + PTGFRN	
636	CD109, EPCAM + EPCAM	
637	CD109, EGFR + EGFR	
638	CD109, LeX + LeX	
639	CD109, TSPAN8 + TSPAN8	
640	CD109, IL1RAP + IL1RAP	
641	CD109, VWA1 + VWA1	LUSqC

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 7】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
642	CD109, CD274 + CD274	
643	IGSF3, CD9 + CD9	
644	IGSF3, LeX + LeX	
645	IGSF3, LEY + LEY	
646	IGSF3, EGFR + EGFR	
647	IGSF3, STn + STn	
648	IGSF3, MUC4 + MUC4	
649	IGSF3, MSLN + MSLN	LUAD
650	IGSF3, IL1RAP + IL1RAP	
651	IGSF3, CEACAM5 + CEACAM5	
652	IGSF3, NT5E + NT5E	
653	IGSF3, TSPAN8 + TSPAN8	
654	IGSF3, Tn + Tn	
655	MET, CD9 + CD9	
656	MET, T + T	LUSqC
657	MET, LeX + LeX	
658	MET, CD55 + CD55	
659	MET, Tn + Tn	LUSqC
660	MET, NT5E + NT5E	
661	MET, EGFR + EGFR	LUSqC
662	MET, sLeX + sLeX	
663	MET, ALCAM + ALCAM	
664	MET, BCAP31 + BCAP31	
665	MET, TFRC + TFRC	
666	MET, CEACAM6 + CEACAM6	
667	DSC3, CD9 + CD9	
668	DSC3, CEACAM6 + CEACAM6	
669	DSC3, TACSTD2 + TACSTD2	
670	DSC3, EGFR + EGFR	
671	DSC3, BCAP31 + BCAP31	
672	DSC3, CEACAM5 + CEACAM5	LUAD
673	DSC3, TFRC + TFRC	
674	DSC3, FOLR1 + FOLR1	
675	DSC3, CD55 + CD55	
676	DSC3, ITGA2 + ITGA2	
677	DSC3, sLeX + sLeX	
678	DSC3, PS + PS	
679	DSC3, PTGFRN + PTGFRN	
680	DSC3, T + T	
681	DSC3, VWA1 + VWA1	
682	DSC3, LeX + LeX	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 8】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
683	DSC3, SLC34A2 + SLC34A2	
684	DSC3, MARCKSL1 + MARCKSL1	
685	DSC3, ALCAM + ALCAM	
686	DSC3, TSPAN8 + TSPAN8	
687	DSC3, CD274 + CD274	
688	DSC3, LEY + LEY	
689	DSC3, MSLN + MSLN	
690	DSC3, MUC1 + MUC1	
691	IGF1R, CD9 + CD9	
692	IGF1R, BCAP31 + BCAP31	
693	IGF1R, CD55 + CD55	
694	IGF1R, MUC1 + MUC1	
695	IGF1R, TFRC + TFRC	
696	IGF1R, MUC1 + MUC1	LUNG
697	IGF1R, LEY + LEY	
698	IGF1R, PS + PS	
699	IGF1R, PTGFRN + PTGFRN	
700	IGF1R, ALCAM + ALCAM	
701	IGF1R, FOLR1 + FOLR1	
702	IGF1R, CEACAM5 + CEACAM5	
703	IGF1R, NT5E + NT5E	
704	IGF1R, sLeX + sLeX	
705	IGF1R, Tn + Tn	
706	IGF1R, T + T	
707	IGF1R, MUC4 + MUC4	
708	IGF1R, CEACAM6 + CEACAM6	
709	MARCKSL1, ALCAM + ALCAM	
710	MARCKSL1, LEY + LEY	
711	MARCKSL1, EGFR + EGFR	LUNG
712	MARCKSL1, T + T	
713	MARCKSL1, NT5E + NT5E	
714	MARCKSL1, CD9 + CD9	
715	BCAP31, TSPAN8 + TSPAN8	
716	BCAP31, EPCAM + EPCAM	
717	BCAP31, LeX + LeX	
718	BCAP31, FOLR1 + FOLR1	
719	BCAP31, CD9 + CD9	
720	BCAP31, CEACAM6 + CEACAM6	LUSqC
721	BCAP31, TACSTD2 + TACSTD2	
722	BCAP31, LEY + LEY	
723	BCAP31, sLeX + sLeX	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 1 9】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー1 + 検出バイオマーカー2)	観察
724	BCAP31, NT5E + NT5E	
725	BCAP31, MUC1 + MUC1	
726	BCAP31, MSLN + MSLN	
727	BCAP31, T + T	
728	BCAP31, MUC1 + MUC1	LUAD
729	BCAP31, PS + PS	
730	BCAP31, MUC1 + MUC1	
731	STn, EGFR + EGFR	LUAD
732	STn, SLC34A2 + SLC34A2	LUAD
733	MUC1, SDC1 + SDC1	LUAD
734	EPCAM, MSLN + MSLN	
735	EPCAM, Tn + Tn	
736	EPCAM, MUC1 + MUC1	LUSqC
737	EPCAM, SLC34A2 + SLC34A2	
738	FOLR1, SLC34A2 + SLC34A2	
739	FOLR1, CEACAM5 + CEACAM5	
740	SLC34A2, EPCAM + EPCAM	
741	TACSTD2, MET + MET	
742	TACSTD2, SLC34A2 + SLC34A2	
743	TACSTD2, SDC1 + SDC1	
744	T, CEACAM5 + CEACAM5	LUAD
745	T, SLC34A2 + SLC34A2	
746	LEY, T + T	
747	LEY, sLeX + sLeX	LUNG
748	LEY, Tn + Tn	LUAD
749	LEY, SLC34A2 + SLC34A2	
750	LEY, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
751	sLeX, LEY + LEY	
752	sLeX, SLC34A2 + SLC34A2	
753	sLeX, PS + PS	
754	sLeX, EGFR + EGFR	LUAD
755	MUC1, PS + PS	
756	MUC1, MARCKSL1 + MARCKSL1	
757	MUC1, T + T	LUSqC
758	MUC1, CEACAM5 + CEACAM5	LUNG
759	MUC1, CD274 + CD274	
760	MUC1, SLC34A2 + SLC34A2	
761	CEACAM5, CD274 + CD274	
762	TRPV4, LeX + LeX	
763	TRPV4, SDC1 + SDC1	
764	PTGFRN, LEY + LEY	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 2 0】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
765	PTGFRN, FOLR1 + FOLR1	
766	PTGFRN, Tn + Tn	
767	EGFR, CD274 + CD274	
768	EGFR, TACSTD2 + TACSTD2	
769	EGFR, LEY + LEY	
770	EGFR, CEACAM5 + CEACAM5	
771	EGFR, MUC1 + MUC1	
772	TSPAN8, SLC34A2 + SLC34A2	
773	MUC4, MSLN + MSLN	LUAD
774	MUC4, T + T	
775	TNFRSF10B, TACSTD2 + TACSTD2	
776	TNFRSF10B, STn + STn	LUNG
777	TNFRSF10B, MUC1 + MUC1	LUAD
778	TNFRSF10B, MUC1 + MUC1	
779	CD274, CEACAM5 + CEACAM5	
780	CD274, T + T	
781	CD274, STn + STn	
782	SDC1, MUC1 + MUC1	LUAD
783	SDC1, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
784	TFRC, MUC1 + MUC1	
785	TFRC, CEACAM6 + CEACAM6	LUSqC
786	TFRC, LeX + LeX	fail
787	TFRC, sLeX + sLeX	LUAD
788	TFRC, MUC4 + MUC4	
789	CD55, SLC34A2 + SLC34A2	
790	IGSF3, CD274 + CD274	LUNG
791	MET, TACSTD2 + TACSTD2	
792	DSC3, MUC1 + MUC1	
793	DSC3, MET + MET	
794	DSC3, Tn + Tn	
795	DSC3, SDC1 + SDC1	
796	IGF1R, SLC34A2 + SLC34A2	
797	IGF1R, STn + STn	
798	IGF1R, CD274 + CD274	
799	IGF1R, EGFR + EGFR	LUNG
800	IGF1R, SDC1 + SDC1	
801	PTK7, T + T	
802	PTK7, MUC4 + MUC4	
803	MARCKSL1, CD274 + CD274	
804	MARCKSL1, FOLR1 + FOLR1	
805	MARCKSL1, PTGFRN + PTGFRN	

10

20

30

40

50

【表 4 B - 2 1】

番号	例示的な組合せ(捕捉バイオマーカー、検出バイオマーカー-1 + 検出バイオマーカー-2)	観察
806	MARCKSL1, LeX + LeX	
807	CEACAM5, KRT19 + KRT19	
808	EGFR, KRT19 + KRT19	
809	EPCAM, KRT19 + KRT19	
810	LeX, KRT19 + KRT19	
811	MUC1, KRT19 + KRT19	
812	MUC4, KRT19 + KRT19	
813	SDC1, KRT19 + KRT19	
814	sLeX, KRT19 + KRT19	
815	STn, KRT19 + KRT19	
816	TACSTD2, KRT19 + KRT19	
817	T, KRT19 + KRT19	
818	TRPV4, KRT19 + KRT19	
819	CEACAM6, KRT19 + KRT19	
820	KRT19, CEACAM5 + CEACAM5	
821	KRT19, EGFR + EGFR	
822	KRT19, LeX + LeX	
823	KRT19, MUC4 + MUC4	
824	KRT19, PTGFRN + PTGFRN	
825	KRT19, SDC1 + SDC1	
826	KRT19, sLeX + sLeX	
827	KRT19, STn + STn	
828	KRT19, TACSTD2 + TACSTD2	
829	KRT19, T + T	
830	KRT19, CEACAM6 + CEACAM6	LUAD
831	EPCAM, SDC1 + SDC1	
832	T, SDC1 + SDC1	
833	CEACAM5, SDC1 + SDC1	
834	EGFR, SDC1 + SDC1	

10

20

30

【0602】

追加のカットオフ基準を、以下を含む表 4 B に開示されるある特定のバイオマーカーの組合せについて評価した。

- ・ L U A D および L U S q C プールの両方について 3 C t のカットオフ
- ・ L U A D プールについて 3 のカットオフ、および L U S q C プールについて 2 のカットオフ

【表 4 C】

40

表 4C - 上記に示されたさまざまな ΔCt カットオフを使用する表 4B の結果に基づくバイオマーカーの組合せの査定の要約。

分類	ΔCt カットオフ		
	2 (両プール)	3 (両プール)	3 (LUAD), 2 (LUSqC)
LUNG	53	28	42
LUAD	98	78	64
LUSqC	35	17	46
未分類	646	702	780

50

【0603】

図16A～20Bおよび下記の表5は、肺がん、例えば、肺がんの異なる型および／またはステージを検出するための、上記の表4Aおよび／または表4Bに列挙される、ある特定の二重バイオマーカーの組合せを使用する結果を要約する。アッセイを、実施例1および実施例2に記載されるようにして行った。表5に示される結果は、健康な非喫煙者のプールされた試料、健康な喫煙者のプールされた試料、初期肺腺癌のプールされた試料、末期肺腺癌のプールされた試料、初期肺扁平上皮細胞癌のプールされた試料、および末期肺扁平上皮細胞癌のプールされた試料を比較する。好適な陽性対照および陰性対照を、それぞれのバイオマーカーの組合せについて実施して、アッセイが適切に働いたことを検証した（例えば、陽性対照試料は肺がん細胞株由来の細胞外小胞を含み、陰性対照試料は細胞外小胞を含まない）。結果は、ある特定のバイオマーカーの組合せが、述べられた参照試料から肺がん試料を成功裏に区別する（例えば、表されたバイオマーカーの組合せを用いて実施例1に記載されるようにして行われた増幅における少なくとも2倍の差によって測定される場合）ことを実証した。

10

【0604】

健康な非喫煙者プールは、肺がんの病歴を有さない対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。一部の事例では、そのような対象は、肺がんではないか、または例えば、慢性胃炎、冠動脈疾患、食道潰瘍、高血圧、変形性関節症、慢性胆嚢炎、静脈瘤、肥満、慢性前立腺炎、および／もしくは高血圧を含む、肺障害と関連しない医学的状态を有し得る。すべての試料は、55～78歳の、22～31の範囲の肥満度指数（BMI）を有する白人由来であった。

20

【0605】

健康な喫煙者プールは、肺がんの病歴を有さないが、20～30パック年に等しい喫煙歴を有する対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。一部の事例では、そのような対象は、肺がんではないか、または例えば、慢性気管支炎、高血圧、および／もしくは胃十二指腸炎を含む、肺障害と関連しない医学的状态を有し得る。すべての試料は、50～67歳の、23～29の範囲のBMIを有する白人由来であった。

【0606】

初期LUADプールは、初期LUADを有すると決定された対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。すべての試料は、36～77歳、非喫煙者から45パック年までの範囲の各種の喫煙歴を有し、19～41の範囲のBMIを有する白人由来であった。一部の事例では、そのような対象は、以下の医学的状态（初期LUADに加えて）：高血圧、肥満、喘息、虚血性心疾患、腎臓がん、アテローム性動脈硬化症、2型真性糖尿病、慢性気管支炎、子宮がん、乳がん、慢性腎盂腎炎、子宮頸がん、胃潰瘍、腎臓がん、慢性胃炎、および／または変形性関節症のうちの少なくとも1つまたは複数

30

【0607】

末期LUADプールは、末期LUADを有すると決定された対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。すべての試料は、51～72歳、非喫煙者から54パック年までの範囲の各種の喫煙歴を有し、19～40の範囲のBMIを有する白人由来であった。一部の事例では、そのような対象は、以下の医学的状态（末期LUADに加えて）：脳血管疾患、虚血性心疾患、アテローム性動脈硬化症、高血圧、冠動脈疾患、肥満、結節性甲状腺腫、慢性胆嚢炎、2型真性糖尿病、脳卒中、慢性気管支炎、慢性胃炎、アングナ、甲状腺中毒症、および／または慢性閉塞性気管支炎のうちの少なくとも1つまたは複数

40

【0608】

初期LUSCプールは、初期LUSCを有すると決定された対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。すべての試料は、49～82歳、非喫煙者から50パック年までの範囲の各種の喫煙歴を有し、19～33の範囲のBMIを有する白人由来であった。一部の事例では、そのような対象は、以下の医学的状态（初期LUSCに

50

加えて）：脳卒中、慢性気管支炎、2型真性糖尿病、アテローム性動脈硬化症、慢性萎縮性胃炎、冠動脈疾患、高血圧、慢性胃炎、慢性静脈機能不全、慢性閉塞性肺疾患、脂肪性肝炎、胃がん、発作性心房細動、腎臓がん、洞不全症候群、不整脈、感覚性難聴、振動病、大腸炎、耐糖能障害、消化性潰瘍、十二指腸潰瘍、および／または肥満のうちの少なくとも1つまたは複数を持っていた。

【0609】

末期LUSCプールは、末期LUSCを有すると決定された対象（例えば、女性および男性対象）からの血清試料を含んでいた。すべての試料は、49～66歳、20～52パックス年の範囲の喫煙歴を有し、23～31の範囲のBMIを有する白人由来であった。一部の事例では、そのような対象は、以下の医学的状態（末期LUSCに加えて）：慢性気管支炎、肺硬化症、肺不全、慢性胃炎、慢性アルコール依存症、胃潰瘍、冠動脈疾患、アテローム性動脈硬化症、肺気腫、十二指腸潰瘍、慢性閉塞性肺疾患、静脈瘤疾患、疼痛症候群、高血圧、および／またはアテローム硬化性動脈硬化症のうちの少なくとも1つまたは複数を持っていた。

10

【0610】

本実施例は、本明細書に記載されるアッセイが、本明細書に提供されるある特定のバイオマーカーシグネチャーを使用して、健康な組織が起源のものから肺がん由来EVを識別することができたことを示す。そのため、一部の実施形態では、本明細書に提供されるある特定のバイオマーカーシグネチャー（例えば、表4Aおよび／または表4Bに列挙される通り）は、肺がん、または特に非小細胞肺がん（例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌）を検出するために特に有用である。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるEVアッセイと組み合わせた表4Aおよび／または表4Bに列挙されるバイオマーカーの組合せは、一部の実施形態では、例えば、健康な個体（例えば、非喫煙者および／または喫煙者）からの血漿試料のプールよりも少なくとも2倍大きいシグナルで、肺がんを検出することが可能であった。

20

【0611】

下記に示されるように、一部の実施形態では、ある特定のバイオマーカーの組合せは、末期肺がんプールと健康なプール（非喫煙者および／または喫煙者）との間を識別した。数ある中でも、そのような知見は、本開示に従って使用される、提供されるバイオマーカーの組合せが、非がん性状態から肺悪性腫瘍を識別することを実証し、それによって、開示される技術の特に有利な特色を立証する。一部の状況では、肺腫瘍が、喫煙と関連する他の疾患、例えば、慢性気管支炎および／または慢性閉塞性肺障害と類似の症状を発生し得、多くの場合に、従来のスクリーニング方法を使用して、区別することが困難であるので、そのような特色は、特に有益である。

30

【0612】

下記に示されるように、一部の実施形態では、ある特定のバイオマーカーの組合せは、健康なプール（非喫煙者および喫煙者）から初期肺がんプールを識別した。数ある中でも、そのような知見は、本開示に従って使用される、提供されるバイオマーカーの組合せが、肺がんなしの個体に対して肺悪性腫瘍を識別することを実証し、それによって、開示される技術の特に有利な特色を立証する。一部の状況では、初期で健康な個体（喫煙者および／または非喫煙者）から肺がん試料を正確に区別することは、患者の福祉を維持しながら、疾患と成功裏に戦う機会を増加させることができるので、そのような特色は、特に有益である。

40

【0613】

数ある中でも、本実施例に提供された結果は、提供される技術が、肺がん（例えば、非小細胞肺がん、例えば、肺腺癌および／または肺扁平上皮細胞癌など）を検出することを実証し、提供される技術（例えば、EV中および／またはEV上のバイオマーカーを検出するために、本明細書に記載されるバイオマーカーの組合せを使用する）が、非肺がん組織に由来するEVから肺がん由来EVを識別することを具体的に実証する。

【0614】

50

一部の実施形態では、肺がんの検出のための本明細書に提供される標的バイオマーカーシングネチャーは、少なくとも3つの標的バイオマーカーを含むことができ、その少なくとも1つは、本明細書に記載される表面バイオマーカーである。一部の実施形態では、少なくとも2つまたは少なくとも3つのそのような標的バイオマーカーは、本明細書に記載される別個の表面バイオマーカーである。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、TNFRSF10B、MUC1、およびCEACAM6を含む。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、DSG2、MUC1、およびCEACAM6を含む。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、CEACAM6、MUC1、およびsTn抗原を含む。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、SLC34A2、MUC1、およびCEACAM6を含む。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、CEACAM6、MUC1、およびMSLNを含む。一部の実施形態では、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のために有用であり得る標的バイオマーカーシングネチャーは、FOLR1、T抗原、およびEGFRを含む。

10

【0615】

一部の実施形態では、本明細書に記載される標的バイオマーカーシングネチャーは、本明細書に記載されるアッセイ（例えば、本明細書に記載される近接に基づくライゲーションアッセイ）によって検出され得る。一部の実施形態では、近接に基づくライゲーションアッセイは、TNFRSF10Bを対象にする捕捉プローブ、MUC1を対象にする検出プローブ、およびCEACAM6を対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーションアッセイは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、LUADなど）を識別することが可能であった（例えば、図21A～24B；および表6を参照されたい）。一部の実施形態では、近接に基づくライゲーションアッセイは、DSG2を対象にする捕捉プローブ、MUC1を対象にする検出プローブ、およびCEACAM6を対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーションアッセイは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、LUADなど）を識別することが可能であった（例えば、図21A～24B；および表6を参照されたい）。一部の実施形態では、近接に基づくライゲーションアッセイは、CEACAM6を対象にする捕捉プローブ、MUC1を対象にする検出プローブ、およびsTn抗原を対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーションアッセイは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、LUADなど）を識別することが可能であった（例えば、図21A～24B；および表6を参照されたい）。一部の実施形態では、近接に基づくライゲーションアッセイは、SLC34A2を対象にする捕捉プローブ、MUC1を対象にする検出プローブ、およびCEACAM6を対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーションアッセイは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者から初期肺がん（例えば、初期非小細胞肺がん、例えば、LUADなど）を識別することが可能であった（例えば、図21A～24B；および表6を参照されたい）。一部の実施形態では、近接に基づくライゲーションアッセイは、CEACAM6を対象にする捕捉プローブ、MUC1を対象にする検出プローブ、およびMSLNを対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーションアッセイは、健康な非喫煙者および健康な喫煙者から末期肺がん（例えば、末期非小細胞肺がん、例えば、LUADなど）を識別することが可能であった（例えば、図21A～24B；および表6を参照されたい）。一部の実施形態では、近接に基づくライ

20

30

40

50

ゲーショニアッセイは、F O L R 1を対象にする捕捉プローブ、T抗原を対象にする検出プローブ、およびE G F Rを対象にする検出プローブを含むことができる。ある特定の実施形態では、本明細書に記載されるそのような近接に基づくライゲーショニアッセイは、健康な非喫煙者から末期肺がん（例えば、末期非小細胞肺がん、例えば、L U A D など）を識別することが可能であった（例えば、図 2 1 A ～ 2 4 B ；および表 6 を参照されたい）。

【表 5 - 1】

表5 - ある特定の例示的な2つのバイオマーカーの組合せを使用する肺がんの検出

バイオマーカーの組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか？						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から早期(ES)または末期(LS)LUSC試料を区別するか？					
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 NS
TNFRSF10B + PD-L1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TNFRSF10B + CEACAM6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TNFRSF10B + EGFR	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TNFRSF10B + IGF1R	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ALCAM + EPCAM			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
CEACAM6 + MUC1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
EGFR + T 抗原		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
EPCAM + T 抗原		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
FOLR1 + T 抗原		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
Tn 抗原 + TACSTD2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
TNFRSF10B + FOLR1	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
TNFRSF10B + sTn 抗原	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ALCAM + PD-L1		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*
EPCAM + MUC1		*		*	*	*	*	*	*	*	*	*

10

20

30

40

50

【 表 5 - 2 】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料 から早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか？						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUSC試料を区別するか？					
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 NS
TNFRSF10B + CD55		*	*	*	*		*		*		*	
TNFRSF10B + MUC1	*	*	*	*	*		*					
FOLR1 + TACSTD2					*	*	*	*	*	*		*
MET + MUC1	*	*		*	*		*					
MET + sTn 抗原		*		*		*		*			*	*
MUC1 + TACSTD2		*		*		*		*				*
PD-L1 + MUC1	*	*		*	*		*					
PD-L1 + Tn 抗原	*	*		*	*		*					
SLC34A2 + MET		*		*		*			*	*	*	*
SLC34A2 + T 抗原				*	*		*		*	*	*	*
TNFRSF10B + CEACAM5			*	*					*	*	*	*
TNFRSF10B + MSLN		*		*		*			*	*	*	*
TNFRSF10B + Tn 抗原			*	*					*	*	*	*
ALCAM + T 抗原		*		*		*				*	*	*
ALCAM + TACSTD2		*				*		*			*	*

10

20

30

40

50

【 表 5 - 3 】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料か ら早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUSC試料を区別するか?					
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 NS
CD55 + PD-L1	*	*					*					
CDH3 + CDH1							*	*	*			
CEACAM5 + MUC1		*		*				*				
CEACAM6 + EGFR		*					*	*				
CEACAM6 + EPCAM		*						*				*
CEACAM6 + FOLR1		*		*				*				
CEACAM6 + MSLN		*		*								*
CEACAM6 + sTn 抗原					*			*				*
CEACAM6 + TACSTD2				*				*				*
DSG2 + CEACAM6	*				*							*
EGFR + MUC1		*		*			*					
FOLR1 + MUC1		*		*			*					
MUC1 + sTn 抗原		*		*				*				
SLC34A2 + MSLN		*						*				*
T 抗原 + CDH1				*					*		*	*

10

20

30

40

50

【 表 5 - 4 】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料から 早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか？						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか？					
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS
Tn 抗原 + IGF1R	*	*			*				*			
TNFRSF10B + ALCAM			*	*					*			
CD55 + EPCAM	*		*									
CEACAM6 + PD-L1		*			*				*			
CEACAM6 + SLC34A2		*		*								
DSG2 + CEACAM5			*									*
DSG2 + EPCAM			*									*
DSG2 + MET			*	*				*				
DSG2 + T 抗原		*		*								
EGFR + sTn 抗原		*								*		
EGFR + TACSTD2				*				*				*
EPCAM + TACSTD2										*		*
IGF1R + T 抗原									*		*	
MET + Tn 抗原		*						*				
MSLN + T 抗原		*		*				*				

10

20

30

40

50

【 表 5 - 5 】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料か ら早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?					
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 NS
PD-L1 + sTn 抗原								*				*
PD-L1 + T 抗原	*		*									
SLC34A2 + MUC1		*		*								
SLC34A2 + PD-L1		*			*							
SLC34A2 + sTn 抗原								*				*
SLC34A2 + Tn 抗原		*		*								
TACSTD2 + sTn 抗原								*				*
TNFRSF10B + CDH3			*									*
TNFRSF10B + EPCAM								*				*
TNFRSF10B + MET	*		*									
ALCAM + CDH3								*				
ALCAM + MET												*
ALCAM + MUC1		*										
ALCAM + SLC34A2									*			
ALCAM + sTn 抗原												*

10

20

30

40

50

【表 5 - 6】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料か 早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?						健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?					
	ES 対 S	LS vs S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 NS
CD55 + CDH1				*								
CD55 + MET			*									
CDH3 + T 抗原						*		*				
CEACAM5 + MSLN				*								
CEACAM5 + TACSTD2						*		*				
CEACAM6 + Tn 抗原	*											
DSG2 + CDH1			*									
DSG2 + CDH3		*										
DSG2 + MUC1			*									
DSG2 + SLC34A2			*									
DSG2 + sTn 抗原			*									
EGFR + MSLN				*								
FOLR1 + sTn 抗原		*										
FOLR1 + Tn 抗原				*								
MET + T 抗原									*			

10

20

30

40

50

【表 5 - 7】

バイオマーカーの 組合せ	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料 から早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか?				健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から 早期(ES)または末期(LS)LUSC試料を区別するか?			
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS
MSLN + sTn 抗原								*
MUC1 + T 抗原								*
MUC1 + Tn 抗原		*						
SLC34A2 + EGFR		*						
TNFRSF10B + CDH1		*						
TNFRSF10B + SLC34A2								*

10

20

30

40

表 5 は、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のための特定の例示的な 2 つの標的バイオマーカーの組合せの評価を表す。比較は、健康な喫煙者（S）試料プールまたは健康な非喫煙者（NS）試料プールに対する初期（ES）または末期（LS）の肺腺癌（LUAD）または肺扁平上皮細胞癌（LUSC）のものである。横列は、健康な喫煙者または非喫煙者試料から肺がん試料を区別するバイオマーカーの組合せを表す。検出／差別化は、*として表し、述べられた参照試料と比較した場合に、がん性試料間の少なくとも 2 倍の増幅の差（例えば、少なくとも 3 倍の増幅の差、少なくとも 4 倍の増幅の差など）に対応する。そのような特定の例示的な 2 つのバイオマーカーの組合せの 2 つのバイオマーカーを、提供される近接に基づくライゲーションアッセイのための捕捉プローブ

50

および／または検出プローブの標的として利用することができることに留意すべきである。

【表 6】

表 6 -ある特定の例示的な3つのバイオマーカーの組合せを使用する肺がんの検出

	健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)の試料から早期(ES)または末期(LS)LUAD試料を区別するか？				健康な喫煙者(S)または健康な非喫煙者(NS)試料から早期(ES)または末期(LS)LUSC試料を区別するか？			
	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS	ES 対 S	LS 対 S	ES 対 NS	LS 対 NS
バイオマーカーの組合せ								
CEACAM6, MUC1 + sTn 抗原	*	*	*	*	*	*	*	*
TNFRSF10B, MUC1 + CEACAM6	*	*	*	*				*
SLC34A2, MUC1 + CEACAM6	*	*		*	*	*		
CEACAM6, MUC1 + MSLN		*		*	*	*		*
FOLR1, T 抗原 + EGFR				*				
DSG2, MUC1 + CEACAM6	*	*						

表 6 は、肺がん（例えば、非小細胞肺がん）の検出のためのある特定の例示的な 3 つの標的バイオマーカーの組合せの評価を表す。比較は、健康な喫煙者（S）試料プールまたは健康な非喫煙者（NS）試料プールに対する初期（ES）または末期（LS）の肺腺癌（LUAD）または肺扁平上皮細胞癌（LUSC）のものである。横列は、健康な喫煙者または非喫煙者試料から肺がん試料を区別するバイオマーカーの組合せを表す。検出／差別化は、*として表し、述べられた参照試料と比較した場合に、がん性試料間の少なくとも 2 倍の増幅の差（例えば、少なくとも 3 倍の増幅の差、少なくとも 4 倍の増幅の差など

）に対応する。それぞれのバイオマーカーの組合せについて、列挙された最初のバイオマーカーは、捕捉プローブの標的であるが、その後の列挙されたバイオマーカーは、検出プローブの標的である。バイオマーカーが、提供される近接に基づくライゲーションアッセイのための1つまたは複数の検出プローブおよび／または捕捉のための標的として好適であり得ることに留意すべきである。

【0616】

（実施例11）

例示的な肺がんリキッドバイオプシーアッセイのさらなる特徴付け

この実施例は、異なる細胞集団および患者集団を使用する、例示的な肺がんリキッドバイオプシーアッセイにおけるさまざまなバイオマーカーの組合せのさらなる特徴付けに対する。肺がんの検出のための有用なバイオマーカーの組合せは、プールされた対照および患者血漿試料における本明細書に開示されるバイオマーカー（例えば、表面バイオマーカー、例えば、実施例1～6に記載される通り）のさまざまな組合せをスクリーニングすることによって決定することができる。プールされた試料は、さまざまな患者コホート間の平均アッセイシグナルについての推定を提供し、バイオマーカーの組合せのトリアージを容易にし得る。

【0617】

一部の実施形態では、肺がんの検出のためのバイオマーカーの組合せは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはそれよりも多くのバイオマーカー（例えば、本明細書に記載されるもの）を含むことができ、ここで、そのような組合せは、細胞外小胞を捕捉するための少なくとも1つのバイオマーカー（例えば、免疫親和性捕捉による）、およびp l i q - P C Rアッセイによる検出のための少なくとも1つのバイオマーカー（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、またはそれよりも多くのバイオマーカーを含む）を含む。一部の実施形態では、細胞外小胞を捕捉するための（例えば、免疫親和性捕捉）標的バイオマーカーは、p l i q - P C Rに基づく分析のための少なくとも1つの標的バイオマーカーと同じであり得る。一部の実施形態では、細胞外小胞を捕捉するため、およびp l i q - P C Rに基づく分析のための標的バイオマーカーは、それぞれ別個であり得る。

【0618】

さまざまなバイオマーカーの組合せを、プールされた患者コホートにおいて検証することができる。患者コホートは、適切な患者および／または対照集団を含むことができる。ある特定の実施形態では、患者コホートは、健康な非喫煙者対象（例えば、45～85歳の年齢の健康な対照）、喫煙歴を有する健康な対象（例えば、45～85歳の年齢の健康な対象）、末期肺がん（例えば、ステージIIIおよびステージIV非小細胞肺がん、例えば、肺腺癌または肺扁平上皮細胞癌など）を有する対象、初期肺がん（例えば、ステージIおよびII非小細胞肺がん、例えば、肺腺癌または肺扁平上皮細胞癌など）を有する対象、良性腫瘍を有する対象、炎症性疾患、障害もしくは状態を有する対象、および／または他のがんを有する対象を含むことができる。

【0619】

一部の実施形態では、2ステップのスクリーニング手順は、さまざまなバイオマーカーの組合せの性能を特徴付けることができる。例えば、さまざまなバイオマーカーの組合せ（例えば、捕捉プローブ（例えば、免疫親和性捕捉のため）および検出プローブのためのバイオマーカーのさまざまな組合せ）を、最初に、健康なバックグラウンドプール（さまざまな年齢群由来）および進行したステージの肺がん（例えば、L U A Dおよび／またはL U S C）プールにおいてスクリーニングすることができる。一部の実施形態では、健康なプールと肺がんプールとの間の限界分離（例えば、4未満のΔC_t、16倍未満の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せを、単離において使用するためのバイオマーカーの組合せとしてさらなる研究から除外することができるが、しかしながら、そのようなバイオマーカーの組合せは、本明細書に記載される追加のバイオマーカーの組合せと組み合わせた場合に、有用であり得る。一部の実施形態では、健康なプールと肺がんプールと

10

20

30

40

50

の間の限界分離（例えば、2未満の ΔCt 、4倍未満の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せを、単離において使用するためのバイオマーカーの組合せとしてさらなる研究から除外することができるが、しかしながら、そのようなバイオマーカーの組合せは、本明細書に記載される追加のバイオマーカーの組合せと組み合わせた場合に、有用であり得る。一部の実施形態では、健康なプールと肺がんプールとの間の限界分離（例えば、1未満の ΔCt 、2倍未満の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せを、単離において使用するためのバイオマーカーの組合せとしてさらなる研究から除外することができるが、しかしながら、そのようなバイオマーカーの組合せは、本明細書に記載される追加のバイオマーカーの組合せと組み合わせた場合に、有用であり得る。

【0620】

一部の実施形態では、2ステップのスクリーニング手順は、さまざまなバイオマーカーの組合せの性能を特徴付けることができる。例えば、さまざまなバイオマーカーの組合せ（例えば、捕捉プローブ（例えば、免疫親和性捕捉のため）および検出プローブのためのバイオマーカーのさまざまな組合せ）を、最初に、健康なバックグラウンドプール（さまざまな年齢群由来）および進行したステージの肺がんプールにおいてスクリーニングすることができる。一部の実施形態では、良好な診断性能（例えば、1超の ΔCt 、2倍超の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せは、初期肺がん、良性腫瘍、他のがん、および／または炎症状態からのプールされた試料を用いるスクリーニングの第2ラウンドを受けることができる。一部の実施形態では、良好な診断性能（例えば、2超の ΔCt 、4倍超の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せは、プールされた初期肺がん、良性腫瘍、他のがん、および／または炎症状態を用いるスクリーニングの第2ラウンドを受けることができる。一部の実施形態では、良好な診断性能（例えば、4超の ΔCt 、16倍超の差に対応する）を示すバイオマーカーの組合せは、プールされた初期肺がん、良性腫瘍、他のがん、および／または炎症状態を用いるスクリーニングの第2ラウンドを受けることができる。一部の実施形態では、対照プールから初期および末期肺がんを識別することができる上位のバイオマーカーの組合せ（例えば、最も良好に機能するおよそ20のバイオマーカーの組合せ）をさらに評価することができる。

【0621】

例示的なアッセイ（例えば、本明細書に記載されるもの）における1つまたは複数の追加のバイオマーカーの組合せの組み込みは、その感度を改善することができる。上記で述べたように、少なくとも2つのバイオマーカーの組合せを利用することによって、アッセイの改善された性能（例えば、99%の特異度で少なくともおよそ10%の感度；または98%の特異度で少なくともおよそ80%の感度；または99.5%の特異度で少なくともおよそ70%の感度）を達成することができる。プールされた患者試料は、個々の患者集団全体のアッセイシグナルを近似することができ、この形質は、効率的な様式で、多数のバイオマーカーの組合せを査定するための現実的なマトリックスを提供することができる。同定された上位のバイオマーカーの組合せ（例えば、最大で20バイオマーカーの組合せ）は、個々の患者血漿に基づくパイロット研究においてさらに試験することができる。一部の実施形態では、個々の患者血漿に基づくパイロット研究は、健康な喫煙者もしくは非喫煙者である対照患者、肺がんに類似する症状を誘導する状態を有する対照患者、他の型のがんを有する対照患者、および／または良性腫瘍を有する対照患者を含むことができる。一部の実施形態では、個々の患者血漿に基づくパイロット研究は、健康な喫煙者もしくは非喫煙者のいずれかである試験患者、症候性である試験患者、無症候性である試験患者、ステージIもしくはステージII肺がんを有する試験患者、および／またはステージIIIもしくはステージIV肺がんを有する試験患者を含むことができる。非肺がん健康状態は、肺がんコホートと年齢がマッチし得る。対照試料（例えば、健康な対照、良性腫瘍、および／または他のオフターゲット状態など）が、遺伝的リスクおよび／または生活様式関連リスクスクリーニングアッセイについて98%の特異度（およそ95%）ならびに症候性トリアージアッセイについて99.5%の特異度（およそ）に関するシグナルカットオフを設定するための対数正規分布の推定を提供することができることが予想され

10

20

30

40

50

得る。バイオマーカーの組合せの性能の特徴付けは、独立性を査定するための組合せ間の二変量の関連を使用して評価することができ、上位のバイオマーカーの組合せは、肺がんを予測するための3変数ロジスティック回帰モデルを使用してさらに試験することができる。

【0622】

対照から肺がん症例を識別し、組合せ間のオルソゴナル性を同定することができる新規バイオマーカーの組合せの同定を達成することができる。このオルソゴナル性は、対照コホートから肺がん症例を識別するのに役立ち、本明細書に記載される例示的なアッセイの感度を増加させることができる。患者コホートにおける人種の多様性を査定するために、試料を、多様な集団が起源の供給業者から得ることができる。ある特定の実施形態では、例示的なバイオマーカーの組合せは、特定の人種および／または民族群に特異的であり得る。ある特定の実施形態では、多様な人種および／または民族群において例示的なバイオマーカーの組合せを試験することで、特定の人種および／または民族群に対して適切な診断価値のバイオマーカーの組合せを同定することができる。

10

【0623】

主要な患者試料における追加の肺がんバイオマーカーの組合せの検証は、例示的なアッセイの診断性能を改善することができる。一部の実施形態では、追加のオルソゴナルなバイオマーカーの組合せの組み込みにより、アッセイ性能は、99%またはそれよりも高い特異度で50%またはそれよりも高い感度を超えて、改善することができる。一部の実施形態では、追加のオルソゴナルなバイオマーカーの組合せの組み込みにより、アッセイ性能は、98%の特異度で70%またはそれよりも高い感度、および99.5%の特異度で60%またはそれよりも高い感度を超えて、改善することができる。

20

【0624】

(実施例12)

例示的な肺がんリキッドバイオブシーアッセイの検証

この実施例は、追加の集団／コホートにおける例示的な肺がんリキッドバイオブシーアッセイの検証に関する。患者試料の追加コホートを使用する、本明細書に記載される例示的な肺がん診断アッセイを査定するための独立検証研究を行うことができる。試料は、任意の適切な供給源から得ることができる。技術専門家は、任意の結果分析の前に試料の指定に対して盲検化され、および／または分析結果は、外部の独立した技術専門家によって分析される。米国を代表する集団からの試料採取を確実にするために、試料の少なくともおよそ20%は、試料の利用可能性に応じて、非白人民族 (United States Census Bureau, 2018) が起源であり得る。

30

【0625】

ある特定の実施形態では、分析される患者コホートは、任意のリスクを低減する行動を取る前に肺がんについての遺伝的および／または生活様式関連リスクがある患者、ならびに適切な関連対照コホートを含むことができる。ある特定の実施形態では、バイオマーカーの組合せ (例えば、本明細書に記載されるもの) は、遺伝的および／または生活様式関連リスクを有する対象において、およそ98%の特異度で少なくともおよそ80%の感度を提供することができる。ある特定の実施形態では、バイオマーカーの組合せ (例えば、本明細書に記載されるもの) は、遺伝的および／または生活様式関連リスクを有する対象において、およそ99.5%の特異度で少なくともおよそ70%の感度を提供することができる。また、ある特定の実施形態では、例示的なアッセイは、いくつかの偽陽性をもたらして、良性腫瘍を有する対象と肺がんを有する対象との間を区別することができる。

40

【0626】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載される例示的なアッセイの追加の検証研究を、独立した起源からの長期にわたって収集された試料を利用して実施することができる。一部の実施形態では、試料は、肺がん症例から長期にわたって収集された採血 (例えば、時間的に別個の時点で収集された採血) から得ることができるか、またはそれに由来することができる。加えて、年齢がマッチした対照からの採血を分析することができる。99

50

%の特異度カットオフのための例示的なロジスティック回帰モデルを使用して、査定は、診断前に何年間も行うことができ（例えば、しかしながら、肺がんの診断前に何年間も採血が利用可能である）、例示的なアッセイは、99%の年間の特異度を維持しながら肺がんを検出することができる。アッセイの感度は、特異度を99%で対照試料において維持することを確実にしながら、診断前の年の関数として計算することができる。

引用された参考文献

【表 7 - 1】

- 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. 10
- 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.
- Geena X. Wu, Dan J. Raz, Laura Brown, and Virginia Sun, 2016. Psychological burden associated with lung cancer screening: a systematic review. *Clin Lung Cancer*, 2016 Sep; 17(5): 315-324.
- Charles S. Dela Cruz, Lynn T. Tanoue, and Richard A. Matthay. 2011. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention, *Clin Chest Med* 32 (2011) 605–644. doi:10.1016/j.ccm.2011.09.001
- Darmanis, S., Nong, R.Y., Hammond, M., Gu, J., Alderborn, A., Vanelid, 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. 20
- 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, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/, based on November 2018 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2019.
- 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.
- 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. 30
- Kinsinger LS, Anderson C, Kim J, *et al.* Implementation of Lung Cancer Screening in the Veterans Health Administration. *JAMA Intern Med*. 2017;177(3):399-406. doi:10.1001/jamainternmed.2016.9022
- Martin M Oken, Willam G Hocking, Paul A Kvale, Gerald L Andriole, Sandra S Buys, Timothy R Church, E David Crawford, Mona N Fouad, Claudine Isaacs, Douglas J Reding, Joel L Weissfeld, Lance A Yokochi, Barbara O'Brien, Lawrence R Ragard, Joshua M Rathmell, Thomas L Riley, Patrick Wright, Neil Caparaso, Ping Hu, Grant Izmirlian, Paul F Pinsky, Philip C Prorok, Barnett S Kramer, Anthony B Miller, John K

40

【表 7 - 2】

- Gohagan, Christine D Berg, PLCO Project Team., 2011. Screening by Chest Radiograph and Lung Cancer Mortality: The Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian (PLCO) Randomized Trial. *JAMA*, 2011 Nov 2; 306(17):1865-1873.
- Raghu VK, Zhao W, Pu J, *et al.* 2019. Feasibility of lung cancer prediction from low-dose CT scan and smoking factors using causal models. *Thorax* 2019;74:643–649.
- Shao, H., Im, H., Castro, C.M., Breakefield, X., Weissleder, R. and Lee, H., 2018. New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical reviews*, 118(4), pp.1917-1950.

50

【0627】

均等物

当業者は、ルーチンを超えない実験を使用して、本明細書に記載される本発明の具体的な実施形態に対する多くの均等物を認識するか、またはそれを確認することができるであろう。他に指示されない限り、または矛盾もしくは不一致が生じるであろうことが当業者に明らかでない限り、本発明は、列举された請求項のうち的一项または複数の項からの1つまたは複数の限定、要素、項目、記述用語などが、同じ基礎請求項（または、関連する任意の他の請求項として）に従属する別の請求項に導入される、すべての変形形態、組合せ、および置換を包含することが理解されるべきである。さらに、具体的な除外が本明細書に挙げられているかどうかにかかわらず、本発明の任意の実施形態または態様は、特許請求の範囲から明らかに除外され得ることも理解されるべきである。本発明の範囲は、上記の記載に限定されることを意図するものではなく、むしろ続く特許請求の範囲に示される通りである。

【図面】

【図1】

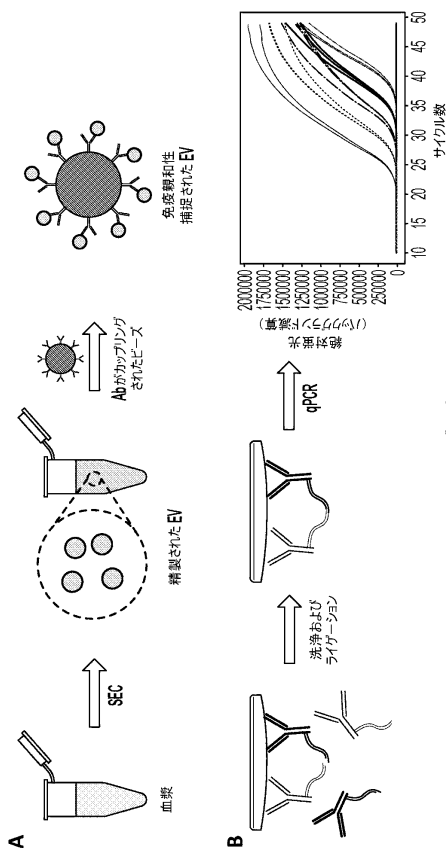


FIG. 1

【図2】

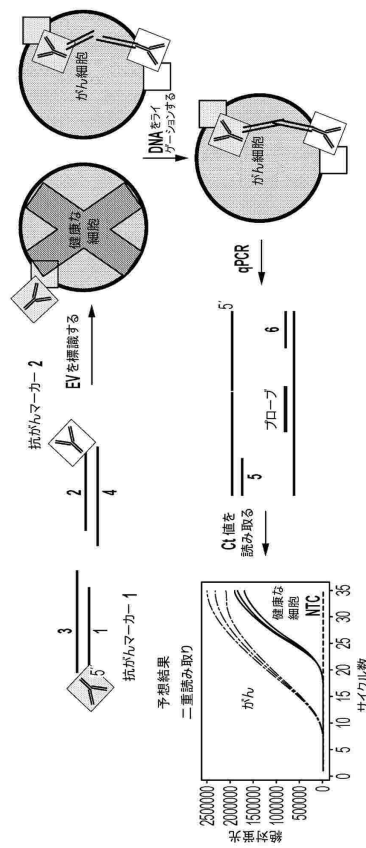


FIG. 2

10

20

30

40

50

【図 3】

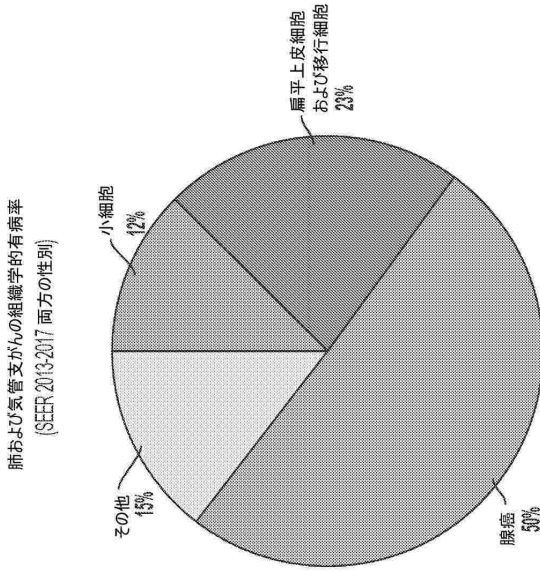


FIG. 3

【図 4】

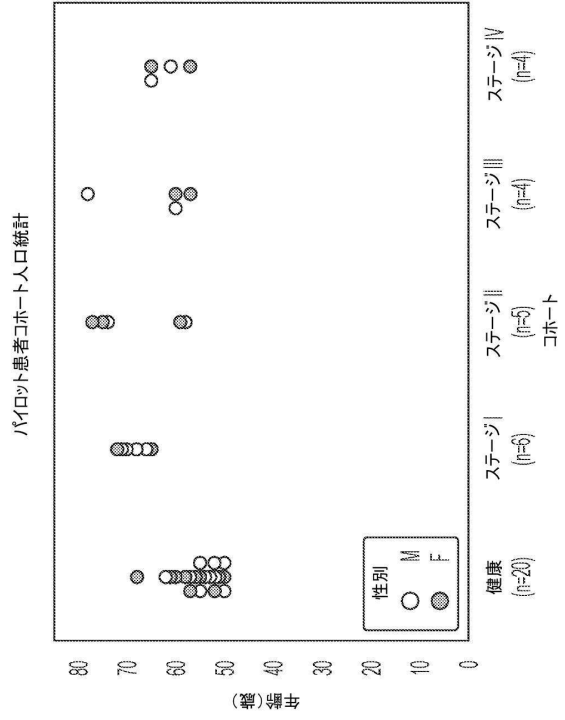


FIG. 4

10

20

【図 5】

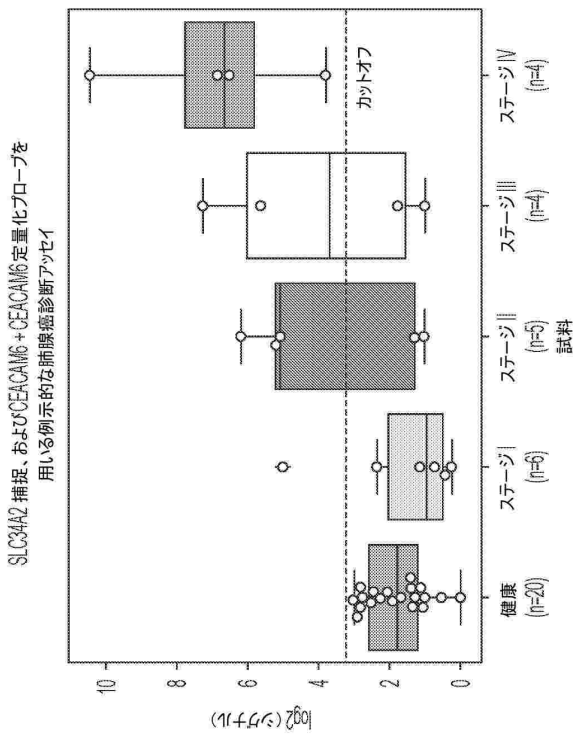


FIG. 5

【図 6】

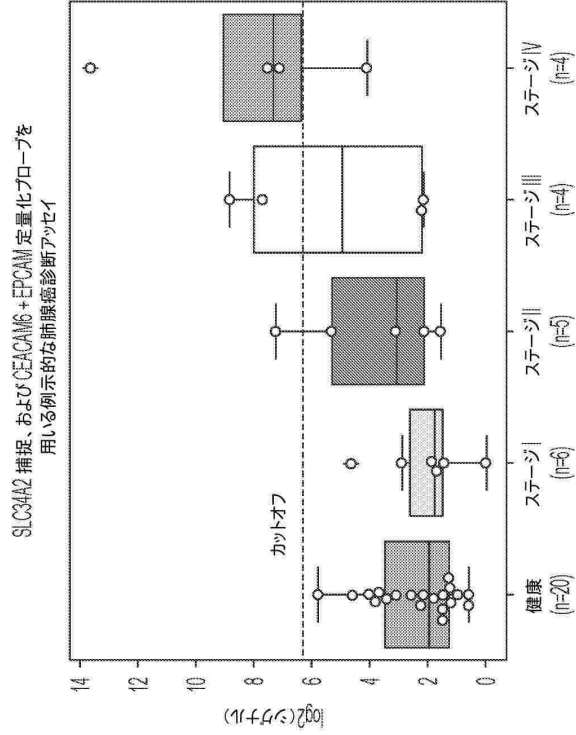


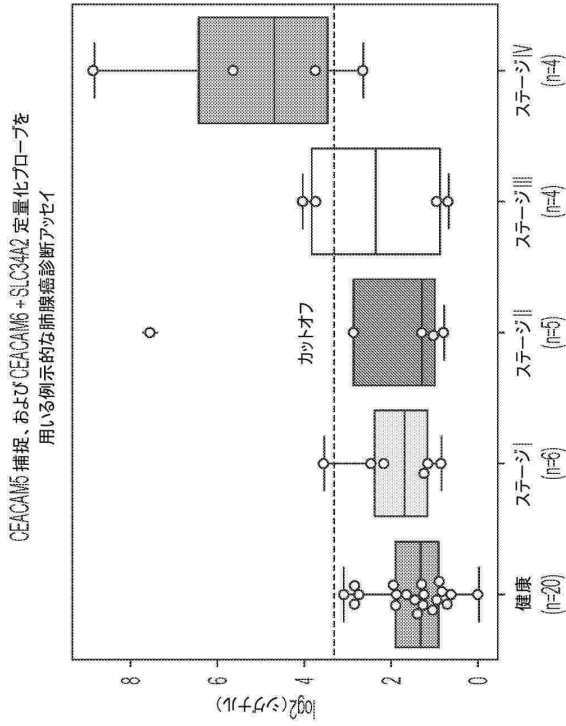
FIG. 6

30

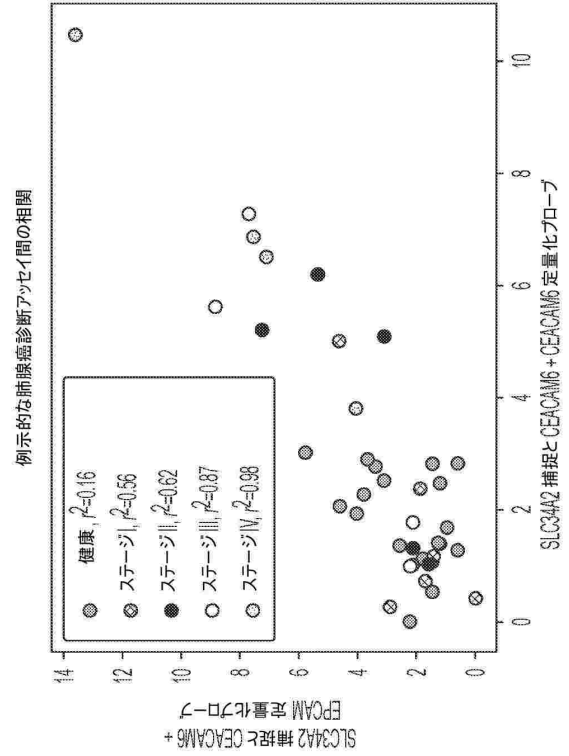
40

50

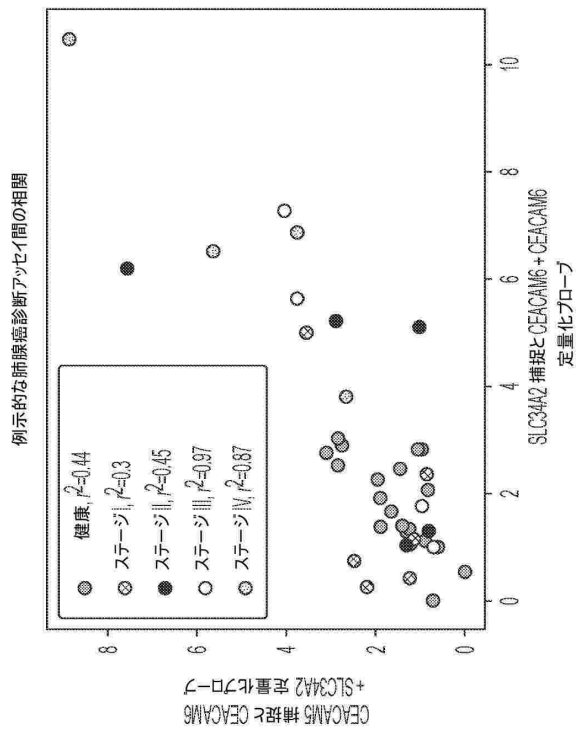
【図 7】



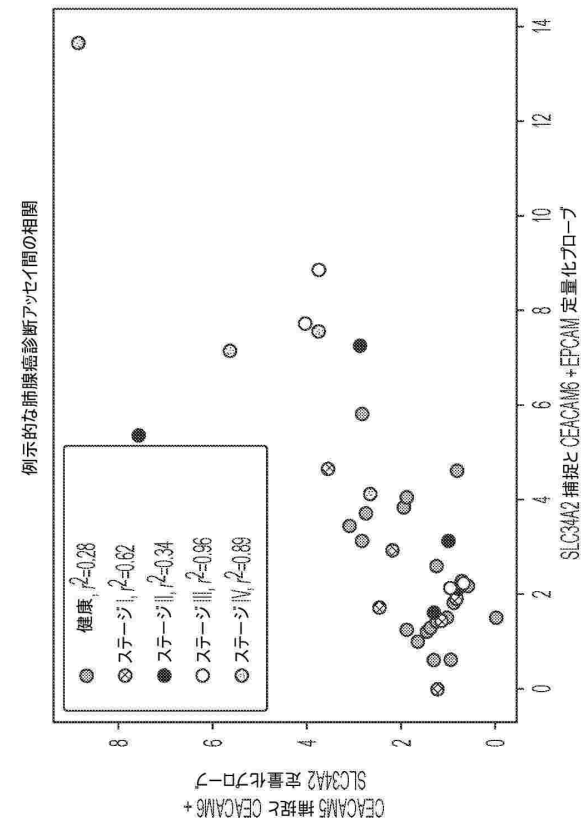
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

20

30

40

50

【図 1 1】

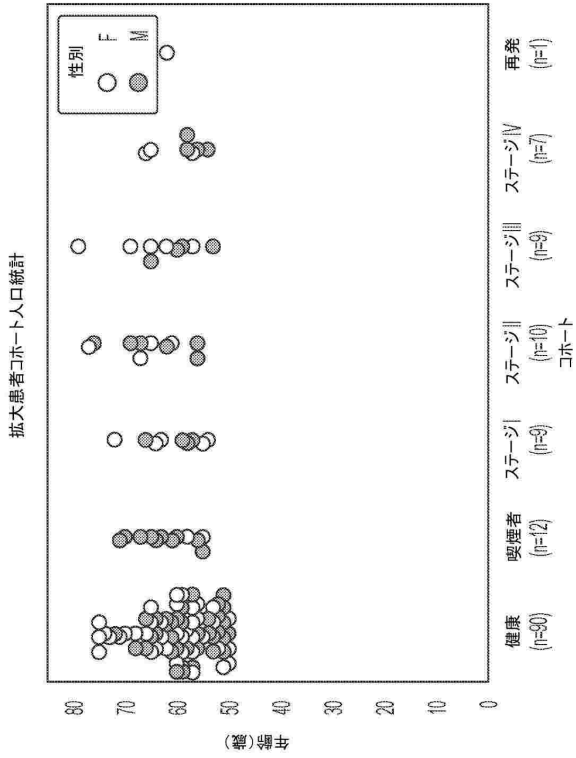


FIG. 11

SLC34A2 捕捉、およびCEACAM6 + CEACAM6 定量化プロトコルを用いる例示的な肺腺癌診断アッセイ

【図 1 2】

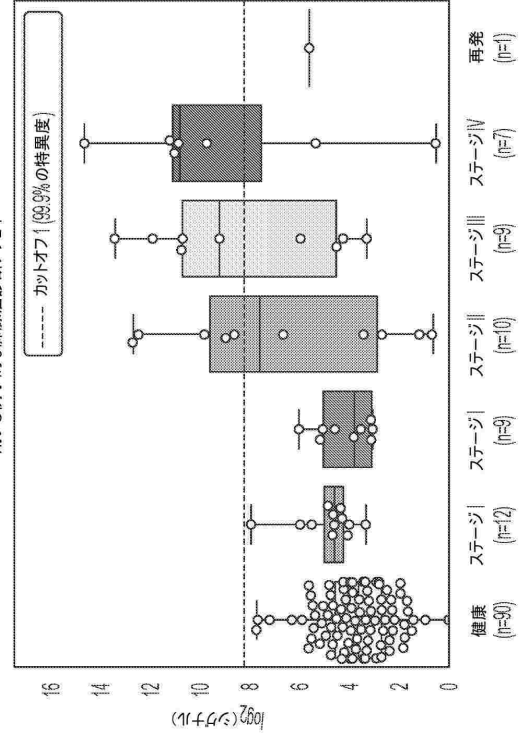


FIG. 12

【図 1 3】

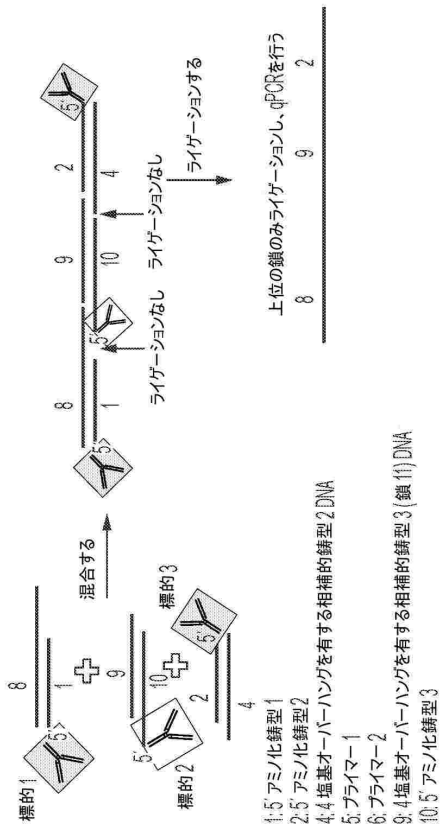


FIG. 13

【図 1 4】

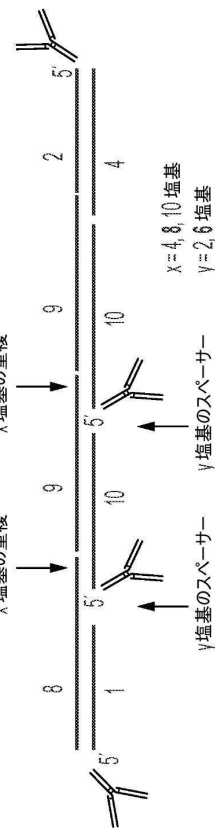


FIG. 14

【図 15】

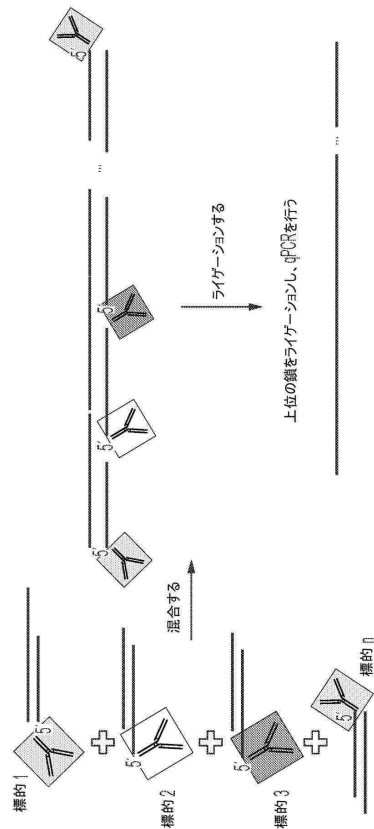


FIG. 15

【図 16 A】

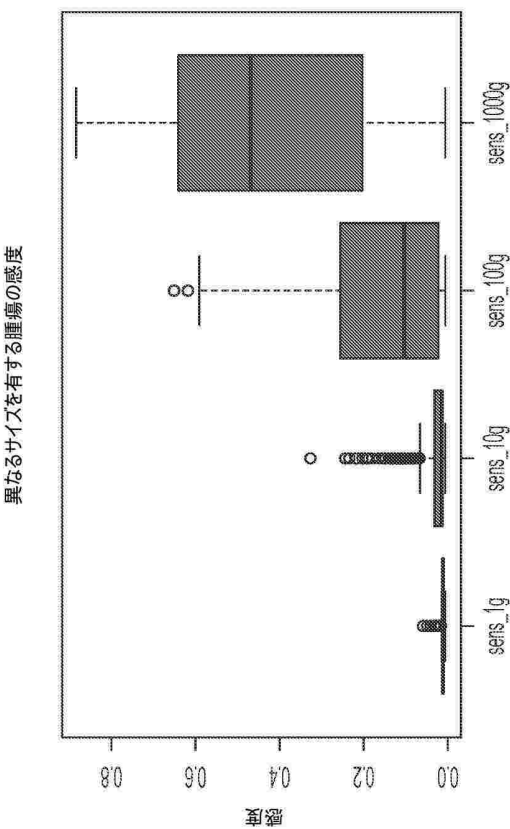


FIG. 16A

【図 16 B】

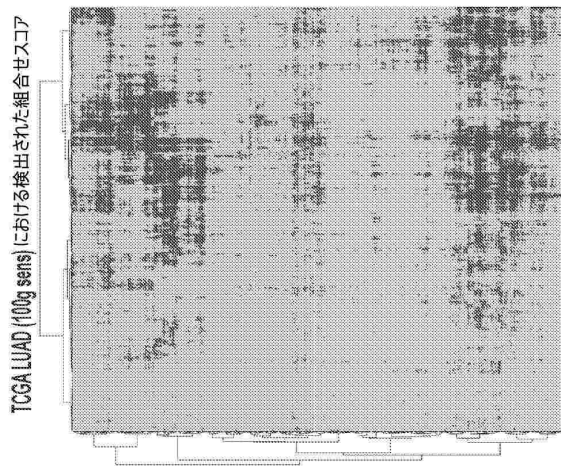


FIG. 16B

【図 16 C】

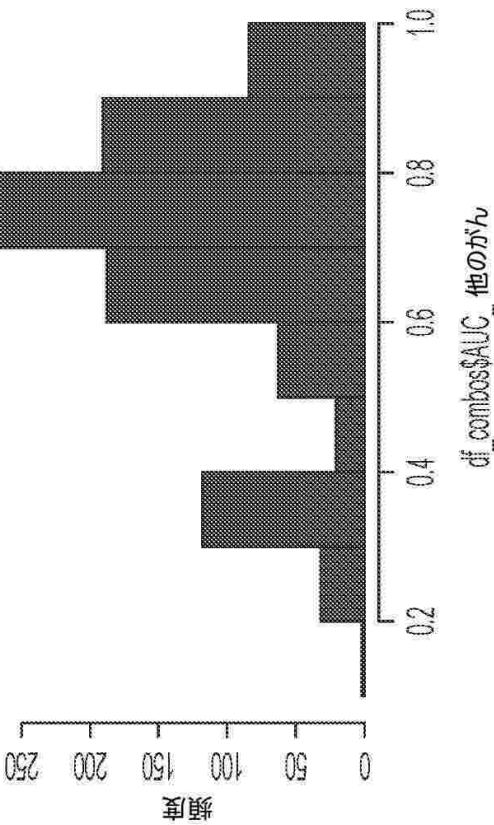


FIG. 16C

10

20

30

40

50

【図 17 A】

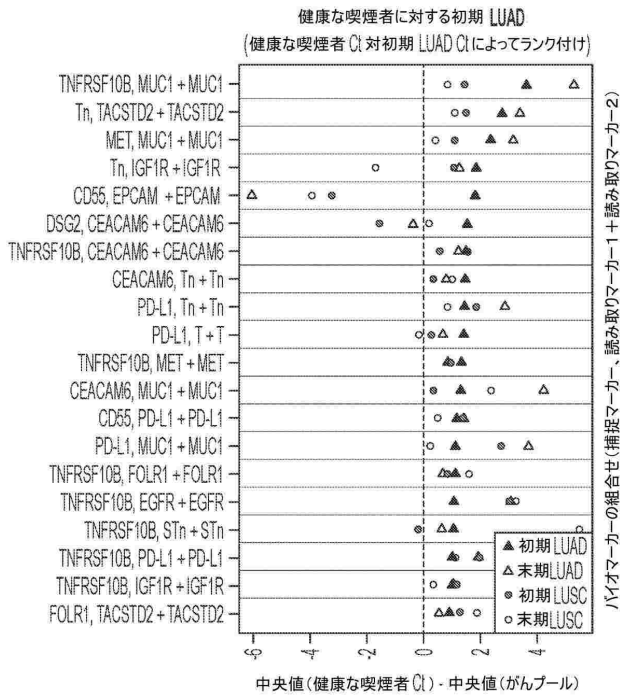


FIG. 17A

【図 17 B】

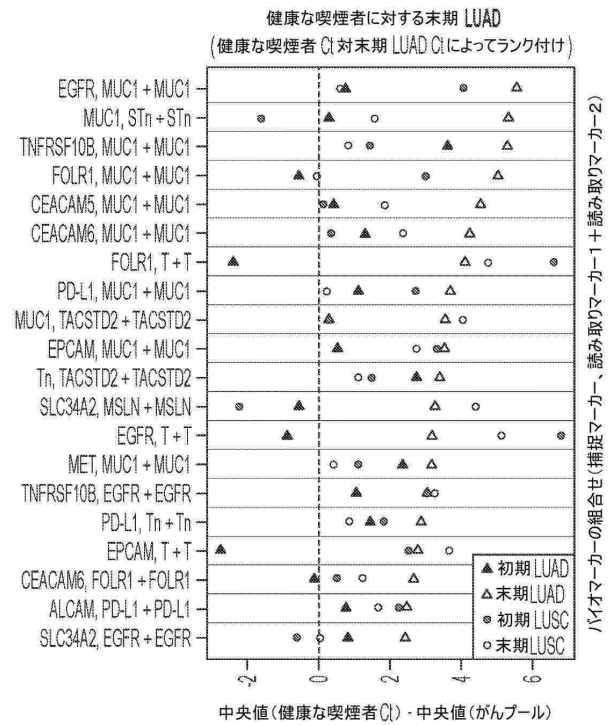


FIG. 17B

【図 18 A】

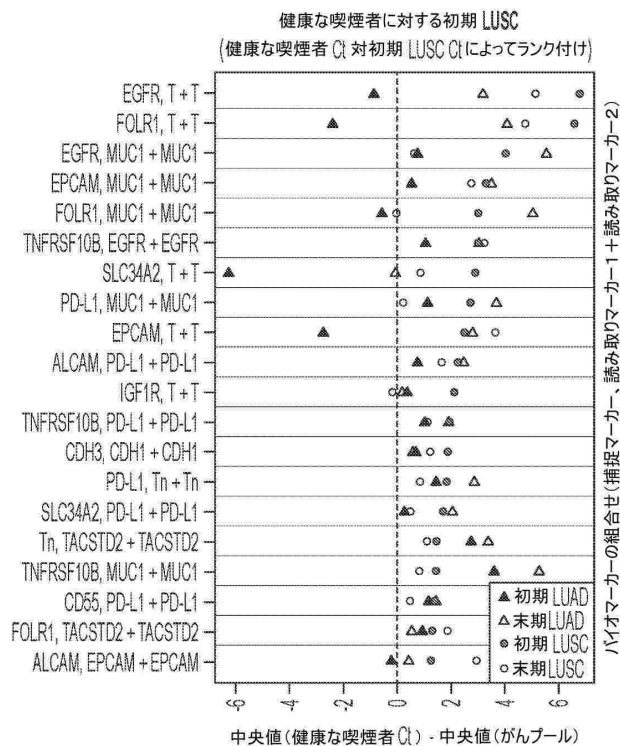


FIG. 18A

【図 18 B】

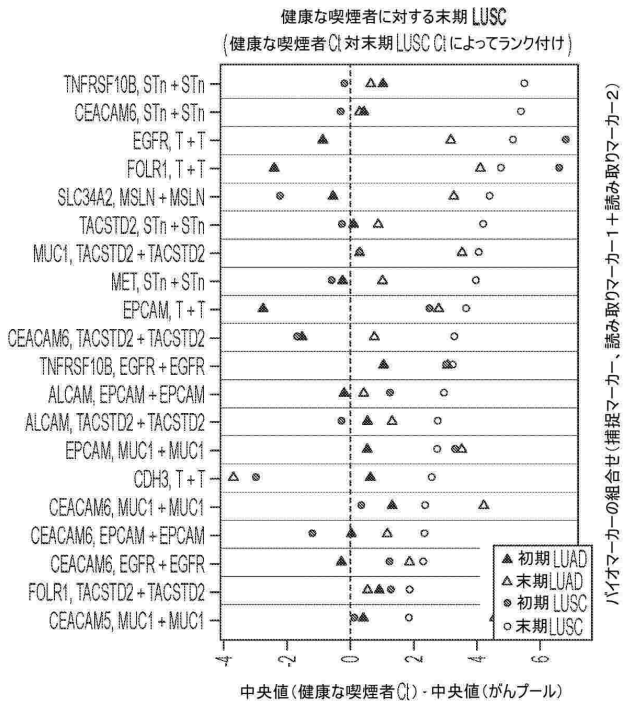


FIG. 18B

10

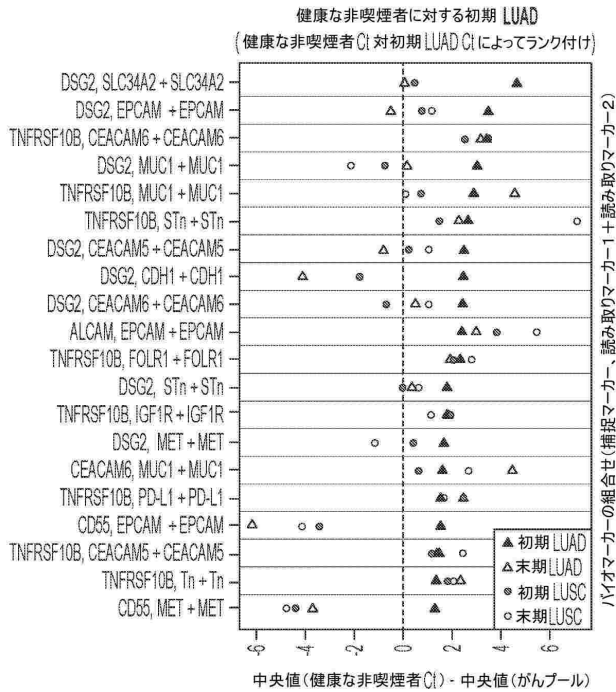
20

30

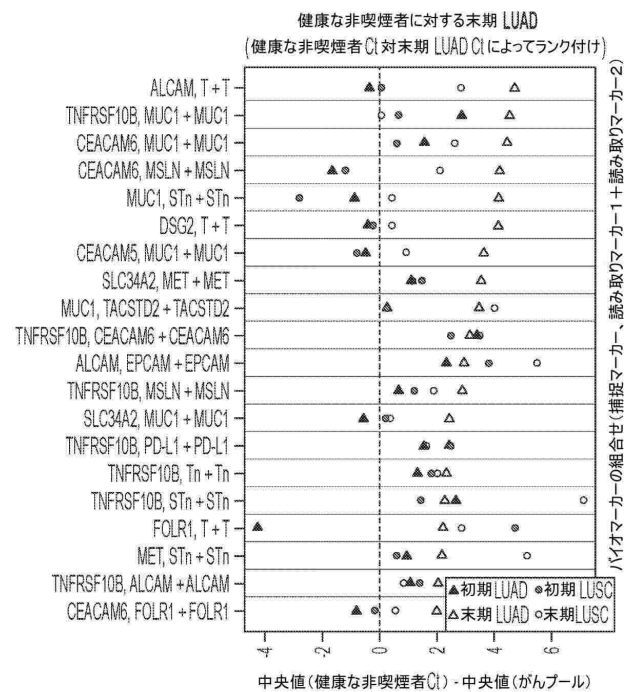
40

50

【図 19 A】



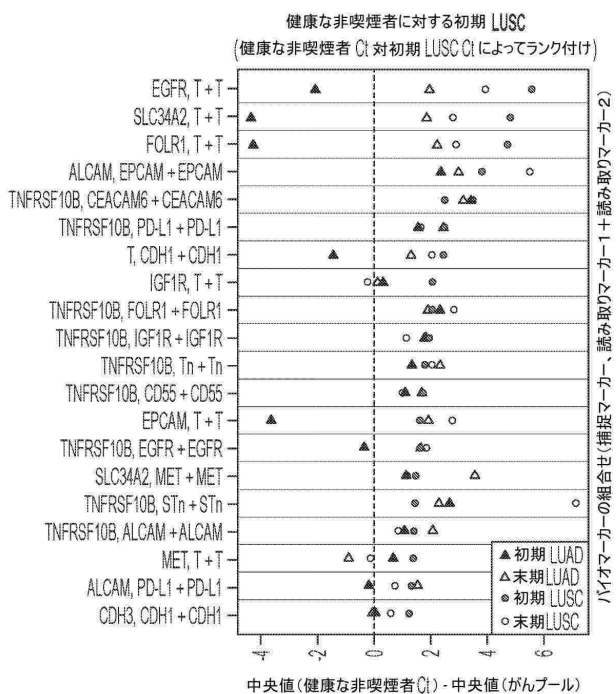
【図 19 B】



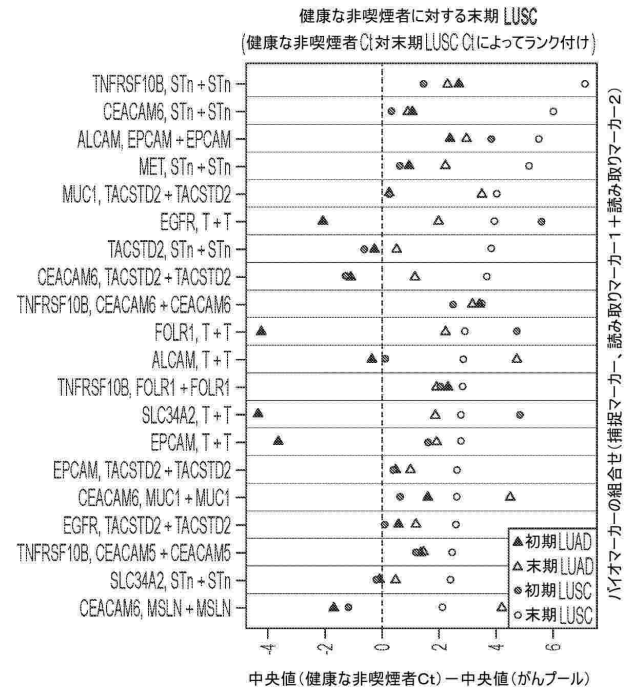
10

20

【図 20 A】



【図 20 B】



30

40

50

【図 2 1 A】

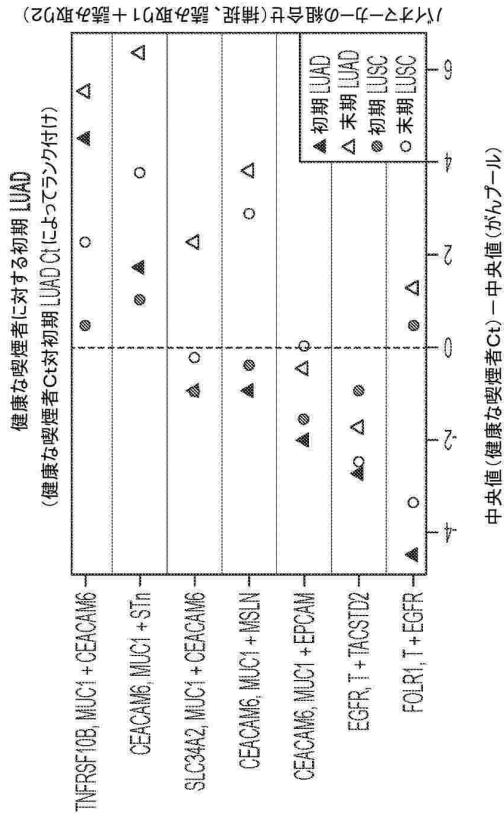


FIG. 21A

【図 2 1 B】

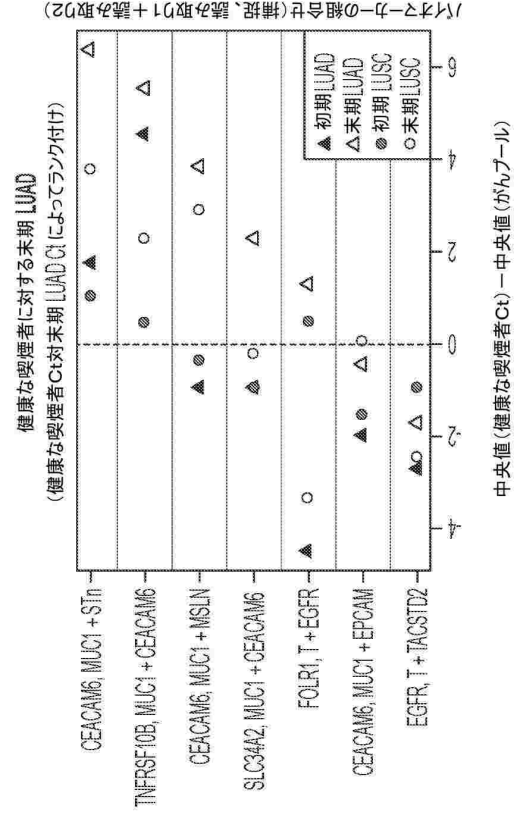


FIG. 21B

【図 2 2 A】

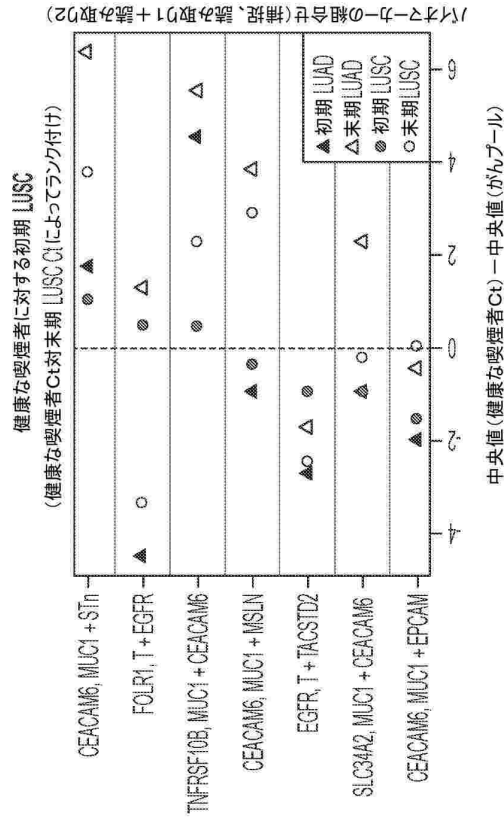


FIG. 22A

【図 2 2 B】

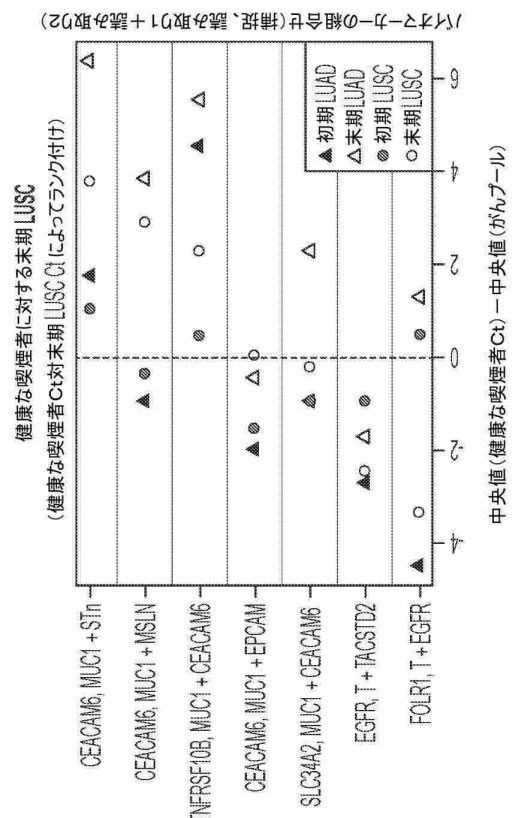


FIG. 22B

【図 2 3 A】

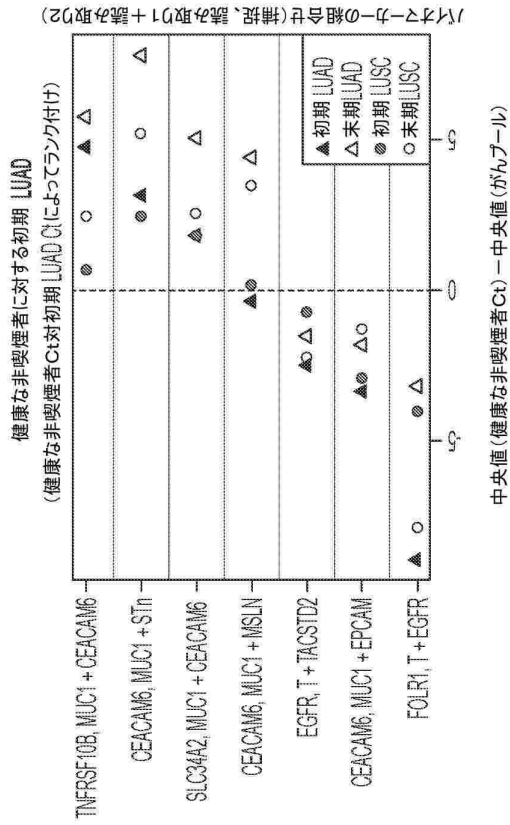


FIG. 23A

【図 2 3 B】

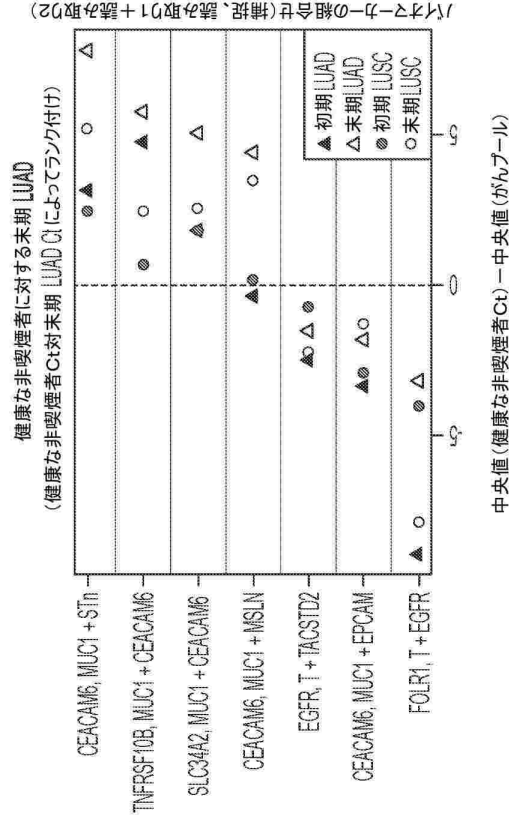


FIG. 23B

【図 2 4 A】

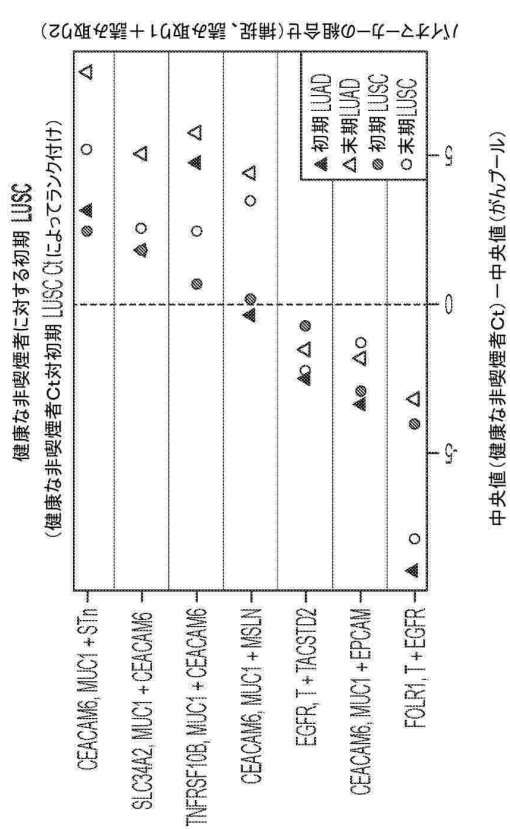


FIG. 24A

【図 2 4 B】

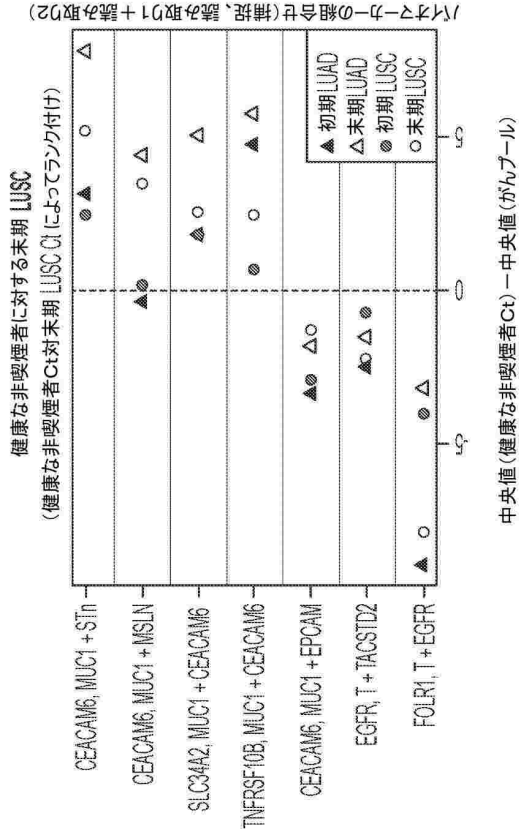


FIG. 24B

【図 25】

肺がん訓練コホート		
試料群	n	試料起源
ステージ I および II LUAD/LUSqC	20/20	OTB, ProteoGenex iSpecimen
ステージ III および IV LUAD/LUSqC	10/10	ProteoGenex
健康な未喫煙者	18	Mercy がスポンサーのコレクション
健康な喫煙経験者	30	Mercy がスポンサーのコレクション
COPD 喫煙経験者	10	ProteoGenex
肺がん検証コホート		
試料群	n	試料起源
ステージ I および II LUAD/LUSqC	90/56	OTB
ステージ III および IV LUAD/LUSqC	19/20	OTB
健康な未喫煙者	110	Mercy がスポンサーのコレクション
健康な喫煙経験者	117	Mercy がスポンサーのコレクション, ProteoGenex
COPD 喫煙経験者	44	ProteoGenex

FIG. 25

【図 26】

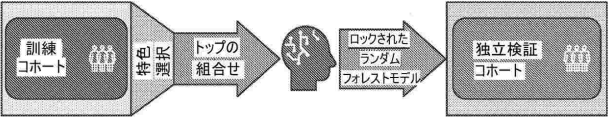


FIG. 26

【図 27】

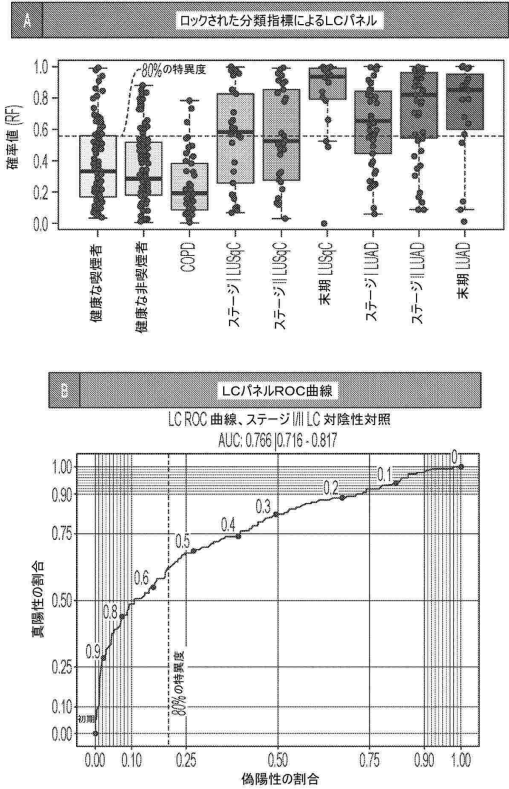


FIG. 27

【図 28】

コホート	n	80% specificity sensitivity (95% CI)
Stage I	71	62% (50%-73%)
Stage II	75	63% (51%-74%)
Stage III/IV	39	82% (66%-92%)

FIG. 28

10

20

30

40

50

【図 2 9】

モデルアウトプットとの相関	検体相関	P値
腫瘍サイズ	0.354	1.3e-7
喫煙歴 (健康な喫煙経験者)	0.142	0.072

FIG. 29

【図 3 0】

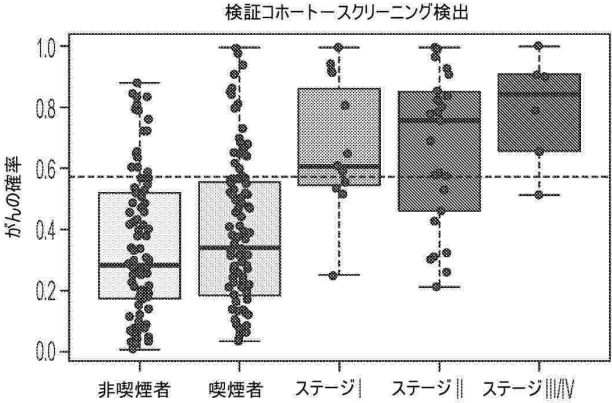


FIG. 30

【図 3 1】

スクリーニングで検出した肺がん症例		
コホート	n	80%の特異度での感度 (95% CI)
ステージ I	11	73% (39% - 84%)
ステージ II	25	68% (46% - 85%)
ステージ III/IV	6	83% (36% - 100%)

FIG. 31

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/10358

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - INV. G01N 33/574 (2023.01)

ADD. C12Q 1/6886 (2023.01)

CPC - INV. G01N 33/57423

ADD. C12Q 1/6886, C12Q 2600/158, G01N 2800/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

See Search History document

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

See Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

See Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2021/0285952 A1 (CORNELL UNIVERSITY) 16 September 2021 (16.09.2021); abstract; para [0050], [0058], [0060], [0064], [0082], [0226], [0407]; claim 1, 7, 11, 19	1-3, 7 76-81
Y	ZHANG et al., Combination of CT and telomerase+ circulating tumor cells Improves diagnosis of small pulmonary nodules. Journal of Clinical Investigation. 08 June 2021 (08.06.2021); abstract; pg 7, para 1; Table 3	76-81
Y	LIU et al., In-depth Proteomic Analysis of Six Types of Exudative Pleural Effusions for Nonsmall Cell Lung Cancer Biomarker Discovery, Molecular & Cellular Proteomics. April 2015, Vol. 14, No. 4, pages 917-932; abstract; Table 1	80-81

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"D" document cited by the applicant in the international application

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 May 2023 (12.05.2023)

Date of mailing of the international search report

JUN 15 2023

Name and mailing address of the ISA/US

Mall Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Kari Rodriguez

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/10358

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 4-6, 8-43, 48-58, 63-75, 82-87, 102-111
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
—See Supplemental Box —

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-3, 7, 76-81

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/10358

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 1-3, 7, 76-81, directed to a method for detection of early-stage lung cancer, susceptibility to lung cancer and differentiating benign lung mass from lung cancer.

Group II, claims 44-47, 98-101, directed to a kit for detection of lung cancer.

Group III, claims 59-62, directed to a complex comprising a nanoparticle expressing a target biomarker signature for lung cancer.

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special technical features:

Group I has the special technical feature of a method for detection of early-stage lung cancer, susceptibility to lung cancer and differentiating benign lung mass from lung cancer, that is not required by Groups II-III.

Group II has the special technical feature of a kit comprising at least one set of probes for a biomarker combination specific for detection of lung cancer, that is not required by Groups I and III.

Group III has the special technical feature of a complex comprising a nanoparticle expressing a target biomarker signature for lung cancer, that is not required by Groups I-II.

Common technical features:

Groups I-III share the common technical feature of:

a nanoparticle having a size within the range of about 30 nm to about 1000 nm and expressing a target biomarker signature for lung cancer, wherein the target biomarker signature comprises:

at least one nanoparticle-associated surface biomarker and at least one target biomarker selected from the group consisting of: surface biomarkers, intravesicular biomarkers, and intravesicular RNA biomarkers, wherein:

the surface biomarkers are selected from ALCAM, BCAP31, CD109, CD274, CD56, CD9, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, DSG2, DSC3, EGFR, EPCAM, FOLR1, HACD3, IL1RAP, IGF1R, IGSF3, ITGA2, LAMB3, Lewis Y antigen, Lewis X antigen, MARCKSL1, MET, MSLN, MUC1, MUC4, NTSE, Phosphatidylserine, PTGFRN, PTK7, SDC1, Sialyl Lewis X antigen, SLC34A2, Sialyl Tn antigen, Tn antigen, T antigen, TACSTD2, TNFRSF10B, TRFC, TRPV4, TSPAN8, CD274, CDH1, CNTN1, GOLM1, VWA1, CELSR2, CLDN1, DSG2, DSG3, GPC1, LAMC2, NECTIN1, ST14, CLCA2, PTPRZ1, SLC2A1, LYPD3, Gb3 (CD77), GJB2, MPZL2, RAP2B, ITGB4, DSP, MEST, ITGA6, ABCC5, ATP1B3, JAG1, GPNMB, PERP, TMPRSS11D, Sialyl-6T antigen (6-sialyl core 1), Sialyl-T antigen, Sialyl Lewis A antigen (CA19-9), Globo H, Gb5 (SSEA-3), Lactotriaosylceramide (Lc3), Forssman antigen, and combinations thereof; the intravesicular biomarkers are selected from AOC1, C12orf45, CRABP2, CST1, ETV4, FAM83A, FOXA2, HMGB3, LGALS3BP, MIF, NAPSA, PPP1R14D, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SPINK1, TGFA, ZC3H11A, and combinations thereof; and the intravesicular RNA biomarkers are selected from RNA transcripts (e.g., mRNA transcripts) encoded by human genes as follows: ABCC3, AOC1, ARSL, B3GNT3, C12orf45, CDCP1, CDH1, CDH3, CEACAM5, CEACAM6, CELSR1, CLDN18, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLIC6, CRABP2, CST1, DMBT1, DSG2, EPCAM, EPHX3, ETV4, EVA1A, FAM83A, FOLR1, FOXA2, GJB1, GJB2, GPC4, HMGB3, HS6ST2, KDELR3, KRTCAP3, LAMB3, LFNG, LGALS3BP, LSR, MANEAL, MIF, MSLN, MUC1, MUC21, NAPSA, PIGT, PODXL2, PPP1R14D, PRRG4, ROS1, S100A14, SBK1, SCGB3A2, SDC1, SERINC2, SEZ6L2, SFTA2, SFTPA1, SFTPA2, SFTPB, SLC34A2, SLC44A4, SLC6A14, SLC7A7, SMIM22, SMPDL3B, SPINK1, ST14, TGFA, TMC4, TMC5, TMEM45B, TMPRSS2, TMPRSS4, TSPAN1, TSPAN8, ZC3H11A, and combinations thereof;

wherein the nanoparticle is immobilized onto a solid substrate comprising a target-capture moiety directed to the nanoparticle-associated surface biomarker;

(b) a first detection probe and a second detection probe each bound to the nanoparticle, wherein each detection probe comprises:

(i) a target binding moiety directed to one of the target biomarker of the tumor target biomarker signature; and
(ii) an oligonucleotide domain coupled to the target binding moiety, the oligonucleotide domain comprising a double-stranded portion and a single-stranded overhang portion extended from one end of the oligonucleotide domain, wherein the single-stranded overhang portions of the first and second detection probes are hybridized to each other.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because this shared technical feature is anticipated by US 2021/0285952 A1 to Cornell University (hereinafter "Cornell Univ").

Cornell Univ discloses a method (abstract - "The present invention is directed to methods of diagnosing, prognosing, and managing treatment of cancer in a subject") comprising steps of:

(a) providing or obtaining a biological sample from a subject (claim 1 - "selecting a subject having cancer; obtaining, from the selected subject, a population of either exomeres having a diameter of less than 50 nm, small exosomes having a diameter of 80-80 nm, or large exosomes having a diameter of 90-120 nm; recovering the exomeres, small exosomes, or large exosomes from the sample");

—See next Supplemental Box —

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 23/10358

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

(b) detecting, in the biological sample, nanoparticles having a size within the range of about 30 nm to about 1000 nm (Abstract - "These methods involve selecting a subject having cancer and obtaining, from the selected subject a population of either exosomes having a diameter less than 50 nm, small exosomes having a diameter of 60-80 nm, or large exosomes having a diameter of 90-120 nm"; claim 1 - "contacting the exosomes, small exosomes, or large exosomes or portions thereof with one or more reagents suitable to detect: (1) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more proteins contained in said exosomes, small exosomes, or large exosomes, (2) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more N-glycans contained in said exosomes, small exosomes, or large exosomes") and expressing a first target biomarker signature (claim 7 - "wherein said method is carried out to determine if the subject has cancer by detecting, higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more of the proteins"), the first target biomarker signature comprising:

at least one nanoparticle-associated surface biomarker (para [0060] - "Because the exosomes, small exosomes, or large exosomes often carry surface molecules such as antigens from their donor cells, surface molecules may be used to identify, isolate or enrich for exosomes, small exosomes, or large exosomes from a specific donor cell type") and at least one target biomarker selected from the group consisting of: surface biomarkers, intravesicular biomarkers, and intravesicular RNA biomarkers (para [0082] - "In accordance with this aspect and other aspects of the invention relating to detecting higher or lower levels or the presence or absence of one or more proteins in the sample, suitable methods for detecting proteins include, but are not limited to, measuring RNA expression level and measuring protein expression levels"), wherein:

the surface biomarkers is ALCAM (claim 11 - "one or more of the proteins selected from the group consisting of SQSTM1, STIP1, HINT1, WASF2, RASA3, EPB41L2, GIPC1, S100A10, MPP8, KIF23, RACGAP1, ANXA5, CASK, DLG1, TJP1, BAG5, TXN, ABI1, ANXA1, CAPG, DB1, S100A6, CHMP2B, CHMP3, ANXA2, MYO1C, ANXA4, SNX12, LIN7C, STXB3, CEP55, ALCAM"); the intravesicular biomarkers is LGALS3BP (para [0064] - "exosomes are recovered from the sample and the method is carried out by detecting, higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more of the proteins selected from the group consisting of PP1D, GANAB, MAT1A, CPYD, FAT4, GMPPB, ERP44, CALR, GPD1, BZW1, PFKL, OLFML3, HGD, LGALS3BP"); and

the intravesicular RNA biomarkers are selected from RNA transcripts (e.g., mRNA transcripts) encoded by human genes as follows: EPCAM (para [0060] - "the tumor-associated surface antigen is epithelial-cell-adhesion-molecule (EpCAM), which is specific to exosomes from carcinomas of lung"; para [0082] - "In accordance with this aspect and other aspects of the invention relating to detecting higher or lower levels or the presence or absence of one or more proteins in the sample, suitable methods for detecting proteins include, but are not limited to, measuring RNA expression level and measuring protein expression levels");

(c) comparing sample information indicative of level of the first target biomarker signature-expressing nanoparticles in the biological sample to reference information including a first reference threshold level (claim 1 - "contacting the exosomes, small exosomes, or large exosomes or portions thereof with one or more reagents suitable to detect: (1) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more proteins contained in said exosomes, small exosomes, or large exosomes, (2) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer");

(d) classifying the subject as having or being susceptible to lung cancer when the biological sample shows an elevated level of first target biomarker signature-expressing nanoparticles relative to a classification cutoff referencing the first reference threshold level (abstract - "Cancer is then diagnosed, prognosed, or treatment is modified based on this information"; claim 1 - "contacting the exosomes, small exosomes, or large exosomes or portions thereof with one or more reagents suitable to detect: (1) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer, or the presence or absence, of one or more proteins contained in said exosomes, small exosomes, or large exosomes, (2) higher or lower levels, relative to a standard for subjects not having cancer"; para [0060] - "the tumor-associated surface antigen is epithelial-cell-adhesion-molecule (EpCAM), which is specific to exosomes from carcinomas of lung").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I-III inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

Continuation of Item 4 above: claims 4-6, 8-43, 48-58, 63-75, 82-97, 102-111 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL
,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
N,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PYTHON

弁護士 山本 健策

- (72)発明者 セドラック, ジョゼフ チャールズ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ボートリン, ローラ テレサ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 セイラム, ダニエル パーカー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ウィンディー, エミリー スーザン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 グーセンライトナー, ダニエル
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 クービロン, アンソニー デイビッド
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ビエット, ケリー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- (72)発明者 ザブロスキ, イブクノルワボ オー.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01760, ネイティック, ストラスモア ロード 22 ナ
ンバー260, マーシー バイオアナリティクス, インコーポレイテッド 気付
- F ターム (参考) 4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ52 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR55 QR62
QS25 QS34 QX02