

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-508947

(P2023-508947A)

(43)公表日 令和5年3月6日(2023.3.6)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 Q	1/6869(2018.01)	C 1 2 Q	1/6869	Z Z N A	4 B 0 2 9
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z	4 B 0 6 3
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 C 0 8 4
C 1 2 M	1/34 (2006.01)	C 1 2 M	1/34	Z	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 7
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全136頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-538934(P2022-538934)	(71)出願人	520478530		
(86)(22)出願日	令和2年12月23日(2020.12.23)		レクセント バイオ, インコーポレイテッド		
(85)翻訳文提出日	令和4年7月29日(2022.7.29)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2		
(86)国際出願番号	PCT/US2020/066976		1 4 1, ケンブリッジ, セカンド ス		
(87)国際公開番号	WO2021/133993		トリート 1 5 0		
(87)国際公開日	令和3年7月1日(2021.7.1)	(74)代理人	100078282		
(31)優先権主張番号	62/953,368		弁理士 山本 秀策		
(32)優先日	令和1年12月24日(2019.12.24)	(74)代理人	100113413		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 森下 夏樹		
(31)優先権主張番号	62/993,564	(74)代理人	100181674		
(32)優先日	令和2年3月23日(2020.3.23)		弁理士 飯田 貴敏		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	弁理士 石川 大輔		
			230113332		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 循環腫瘍DNAの分析を介した分子疾患評価のための方法およびシステム

(57)【要約】

本開示は、対象における腫瘍状態（例えば、進行、退行、再発など）を評価する方法を提供する。一態様では、対象の腫瘍状態（例えば、進行、退行、再発など）を評価するための方法は、異なる時点での対象のcfDNA分子の第1および第2のWGSデータに基づいて、(i)第1および第2の複数のCNA、および(ii)第1および第2の複数の断片長を決定することと、第1および第2の複数のCNAを処理して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1および第2の複数の断片長を比較して、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1または第2の時点での対象の第1または第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含み得る。

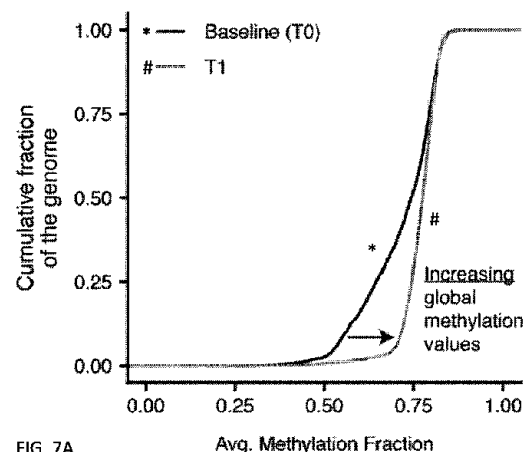


FIG. 7A

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

第 1 の複数の無細胞 DNA (c f DNA) 分子の第 1 の全ゲノム配列決定 (W G S) データを取得することであって、前記第 1 の複数の c f DNA 分子が、第 1 の時点での前記対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第 1 の時点は、前記がんを治療するように構成された治療薬が、前記対象に投与される前である、取得することと、

前記第 1 の W G S データに基づいて、(i) 前記第 1 の複数の c f DNA 分子における第 1 の複数のコピー数異常 (C N A)、および (i i) 前記第 1 の複数の c f DNA 分子の第 1 の複数の断片長を決定することと、

10

第 2 の複数の無細胞 DNA (c f DNA) 分子の第 2 の全ゲノム配列決定 (W G S) データを取得することであって、前記第 2 の複数の c f DNA 分子が、第 2 の時点での前記対象の第 2 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第 2 の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第 2 の W G S データに基づいて、(i i i) 前記第 2 の複数の c f DNA 分子における第 2 の複数のコピー数異常 (C N A)、および (i v) 前記第 2 の複数の c f DNA 分子の第 2 の複数の断片長を決定することと、

前記第 1 の複数の C N A を前記第 2 の複数の C N A と比較して、C N A プロファイル変化を決定することと、

20

前記第 1 の複数の断片長および前記第 2 の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

少なくとも部分的に、前記 C N A プロファイル変化および前記断片長プロファイル変化に基づいて、前記第 1 の時点での前記対象の第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の時点での前記対象の第 2 の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【請求項 2】

前記第 1 または第 2 の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液 (C S F)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 3】

前記第 1 の W G S データを取得することが、前記第 1 の複数の c f DNA 分子を配列決定して、第 1 の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または前記第 2 の W G S データを取得することが、前記第 2 の複数の c f DNA 分子を配列決定して、第 2 の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記配列決定が、約 25 回以下の深度で実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記配列決定が、約 10 回以下の深度で実施される、請求項 3 に記載の方法。

40

【請求項 6】

前記配列決定が、約 8 回以下の深度で実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 7】

前記配列決定が、約 6 回以下の深度で実施される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 または第 2 の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 9】

複数のゲノム領域について前記第 1 または第 2 の複数の c f DNA 分子を濃縮することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 10】

前記濃縮が、前記第1または第2の複数のcfDNA分子を増幅することを含む、請求項9に記載の方法。

【請求項 11】

前記増幅が、選択的な増幅を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 12】

前記増幅が、普遍的な増幅を含む、請求項10に記載の方法。

【請求項 13】

前記濃縮が、前記第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む、請求項9に記載の方法。

10

【請求項 14】

前記第1または第2の複数のcfDNA分子の前記少なくとも一部分を選択的に単離することが、複数のプローブを使用することを含み、前記複数のプローブの各々が、前記複数のゲノム領域のうちのゲノム領域の少なくとも一部分と配列相補性を有する、請求項13に記載の方法。

【請求項 15】

前記少なくとも一部分が、腫瘍マーカー遺伝子座を含む、請求項13に記載の方法。

【請求項 16】

前記少なくとも一部分が、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む、請求項15に記載の方法。

20

【請求項 17】

前記複数の腫瘍マーカー遺伝子座が、The Cancer Genome Atlas (TCGA) または Catalogue of Somatic Mutations in cancer (COSMIC) から選択される1つ以上の遺伝子座を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記第1の複数のCNAを決定することが、前記第1の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含み、前記第2の複数のCNAを決定することが、前記第2の複数の配列決定読み取りの前記複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含む、請求項3に記載の方法。

30

【請求項 19】

GC含量および／またはマッピング傾向について、前記第1の複数のCNAまたは前記第2の複数のCNAを修正することをさらに含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 20】

前記修正が、統計モデリング分析を使用することを含む、請求項19に記載の方法。

【請求項 21】

前記統計モデリング分析が、LOESS回帰またはベイズモデルを含む、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

前記複数のゲノム領域が、予め決定されたサイズを有する基準ゲノムの非重複ゲノム領域を含む、請求項18に記載の方法。

40

【請求項 23】

前記予め決定されたサイズが、約50キロベース(kb)、約100kb、約200kb、約500kb、約1メガベース(Mb)、約2Mb、約5Mb、または約10Mbである、請求項22に記載の方法。

【請求項 24】

前記複数のゲノム領域が、少なくとも約1,000個の別個のゲノム領域を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項 25】

前記複数のゲノム領域が、少なくとも約2,000個の別個のゲノム領域を含む、請求

50

項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記 C N A プロファイル変化を決定することが、前記第 1 の複数の C N A および前記第 2 の複数の C N A を複数の基準 C N A 値と比較することを含み、前記複数の基準 C N A 値が、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加の c f D N A 分子から取得される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記追加の対象が、がんを有しない 1 人以上の対象を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記追加の対象が、腫瘍進行を有しない 1 人以上の対象を含む、請求項 2 6 に記載の方法。

10

【請求項 2 9】

前記複数の基準 C N A 値が、前記第 1 の時点後の 1 つ以上の後続の時点で取得される前記対象の追加の体液試料を使用して取得される、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 3 0】

予め決定された基準を満たす前記第 1 の複数の C N A および前記第 2 の複数の C N A のサブセットを除外することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 1】

所与の C N A 値と対応する基準 C N A 値との間の差が、約 1 標準偏差以下の差を含む場合に、前記第 1 の複数の C N A または前記第 2 の複数の C N A 値の前記所与の C N A 値を除外することをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

20

【請求項 3 2】

所与の C N A 値と対応する基準 C N A 値との間の差が、約 2 標準偏差以下の差を含む場合に、前記第 1 の複数の C N A または前記第 2 の複数の C N A 値の前記所与の C N A 値を除外することをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 3】

所与の C N A 値と対応する基準 C N A 値との間の差が、約 3 標準偏差以下の差を含む場合に、前記第 1 の複数の C N A または前記第 2 の複数の C N A 値の前記所与の C N A 値を除外することをさらに含む、請求項 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 4】

所与の C N A 値と対応する局所平均断片長との間のスピアマンの順位相関に基づいて、前記第 1 の複数の C N A または前記第 2 の複数の C N A 値の前記所与の C N A 値を除外することをさらに含む、請求項 3 0 に記載の方法。

30

【請求項 3 5】

前記スピアマンの順位相関係数（スピアマンの $r h o$ ）が、 -0.1 未満である場合に、前記第 1 の複数の C N A または前記第 2 の複数の C N A 値の所与の C N A 値を除外することをさらに含む、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

ライブラリまたはゲノム位置に基づいて、前記第 1 の複数の断片長または前記第 2 の複数の断片長を正規化することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 3 7】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、1 を超える、1.1 を超える、1.2 を超える、1.3 を超える、1.4 を超える、1.5 を超える、1.6 を超える、1.7 を超える、1.8 を超える、1.9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、前記腫瘍状態が、前記対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、0.01 未満、0.05 未満、0.1 未満、0.2 未満、0.3 未満、0.4 未満、または 0.5 未満である場合に、前記対象の主要分子応答（MMR）を検出することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

50

【請求項 39】

少なくとも約 50 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 ～ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

少なくとも約 70 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

少なくとも約 90 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

少なくとも約 50 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 ～ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

少なくとも約 70 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

少なくとも約 90 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 43 に記載の方法。

【請求項 45】

少なくとも約 98 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

少なくとも約 50 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 ～ 45 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 47】

少なくとも約 70 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 48】

少なくとも約 90 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

少なくとも約 50 % の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 ～ 48 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 50】

少なくとも約 70 % の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

少なくとも約 90 % の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

少なくとも約 0.60 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 ～ 51 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 53】

少なくとも約 0.75 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 52 に記載の方法。

【請求項 54】

少なくとも約 0.90 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 53 に記載の方法。

【請求項 55】

腫瘍進行が検出されない場合に、前記対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、

10

20

30

40

50

請求項 1 ～ 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記対象の前記決定された腫瘍状態に基づいて、前記対象の前記がんを治療するために治療有効用量の治療を投与することをさらに含む、請求項 1 ～ 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む、請求項 5 6 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

前記検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、請求項 1 ～ 5 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記第 1 および第 2 の W G S データが、パイロ配列決定、合成による配列決定、単一分子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、超並列配列決定、鎖末端配列決定、単一分子リアルタイム配列決定、ポロニー配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、またはハイブリッド捕捉系配列決定によって取得される、請求項 1 ～ 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6 0】

前記第 1 および第 2 の W G S データが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、請求項 1 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 1】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、

(i) 第 1 の複数の無細胞 D N A (c f D N A) 分子の第 1 の全ゲノム配列決定 (W G S) データであって、前記第 1 の複数の c f D N A 分子が、第 1 の時点での前記対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第 1 の時点は、前記がんを治療するように構成された治療薬が、前記対象に投与される前である、第 1 の全ゲノム配列決定 (W G S) データ、および (i i) 第 2 の複数の無細胞 D N A (c f D N A) 分子の第 2 の全ゲノム配列決定 (W G S) データであって、前記第 2 の複数の c f D N A 分子が、第 2 の時点での前記対象の第 2 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第 2 の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、第 2 の全ゲノム配列決定 (W G S) データを保存するように構成されているデータベースと、

30

前記データベースと動作可能に結合された 1 つ以上のコンピュータプロセッサであって、前記 1 つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

前記第 1 の W G S データに基づいて、(i) 前記第 1 の複数の c f D N A 分子における第 1 の複数のコピー数異常 (C N A) 、および (i i) 前記第 1 の複数の c f D N A 分子の第 1 の複数の断片長を決定し、

前記第 2 の W G S データに基づいて、(i i i) 前記第 2 の複数の c f D N A 分子における第 2 の複数のコピー数異常 (C N A) 、および (i v) 前記第 2 の複数の c f D N A 分子の第 2 の複数の断片長を決定し、

40

前記第 1 の複数の C N A を前記第 2 の複数の C N A と比較して、C N A プロファイル変化を決定し、

前記第 1 の複数の断片長および前記第 2 の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定し、

少なくとも部分的に、前記 C N A プロファイル変化および前記断片長プロファイル変化に基づいて、前記第 1 の時点での前記対象の第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の時点での前記対象の第 2 の腫瘍割合を決定し、かつ

少なくとも部分的に、前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合に基づいて、前記

50

対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【請求項62】

非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、前記方法が、

第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記がんを治療するように構成された治療薬が、前記対象に投与される前である、取得することと、

10

前記第1のWGSデータに基づいて、(i) 前記第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 前記第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、

第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第2のWGSデータに基づいて、(iii) 前記第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(iv) 前記第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

20

前記第1の複数のCNAを前記第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

前記第1の複数の断片長および前記第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

少なくとも部分的に、前記CNAプロファイル変化および前記断片長プロファイル変化に基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

30

【請求項63】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

40

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1の平均メチル化割合プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、

50

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【請求項64】

前記第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液（CSF）、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、請求項63に記載の方法。

【請求項65】

前記第1のMSデータを取得することが、前記第1の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または前記第2のMGSデータを取得することが、前記第2の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、請求項63に記載の方法。

【請求項66】

前記メチル化配列決定が、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項67】

前記メチル化配列決定が、全ゲノム酵素的メチル-seqを含む、請求項65に記載の方法。

【請求項68】

前記メチル化配列決定が、酸化的バイサルファイト配列決定、TET支援ピリジンボラン配列決定（TAPSS）、TET支援バイサルファイト配列決定（TABSS）、酸化的バイサルファイト配列決定（oxBS-Seq）、APOBEC結合エピジェネティック配列決定（ACE-seq）、メチル化DNA免疫沈降（MeDIP）配列決定、ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降（hMeDIP）配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定（RRBS-Seq）、またはシトシン5-ヒドロキシメチル化配列決定を含む、請求項65に記載の方法。

【請求項69】

前記メチル化配列決定が、約25回以下の深度で実施される、請求項65に記載の方法。

【請求項70】

前記メチル化配列決定が、約10回以下の深度で実施される、請求項65に記載の方法。

【請求項71】

前記メチル化配列決定が、約8回以下の深度で実施される、請求項65に記載の方法。

【請求項72】

前記メチル化配列決定が、約6回以下の深度で実施される、請求項65に記載の方法。

【請求項73】

前記第1または第2の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項74】

前記ゲノムの前記領域について前記第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む、請求項65に記載の方法。

【請求項75】

前記濃縮が、前記第1または第2の複数のcfDNA分子を増幅することを含む、請求項74に記載の方法。

【請求項76】

前記増幅が、選択的な増幅を含む、請求項75に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 77】

前記増幅が、普遍的な増幅を含む、請求項 75 に記載の方法。

【請求項 78】

前記濃縮が、前記第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む、請求項 74 に記載の方法。

【請求項 79】

前記第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子の前記少なくとも一部分を選択的に単離することが、複数のプローブを使用することを含み、前記複数のプローブの各々が、前記ゲノムの前記領域のうちの少なくとも一部分と配列相補性を有する、請求項 78 に記載の方法。

10

【請求項 80】

前記少なくとも一部分が、腫瘍マーカー遺伝子座を含む、請求項 78 に記載の方法。

【請求項 81】

前記少なくとも一部分が、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む、請求項 80 に記載の方法。

【請求項 82】

前記複数の腫瘍マーカー遺伝子座が、The Cancer Genome Atlas (TCGA) または Catalogue of Somatic Mutations in cancer (COSMIC) から選択される 1 つ以上の遺伝子座を含む、請求項 81 に記載の方法。

20

【請求項 83】

前記ゲノムの前記領域が、CpG アイランド、CpG ショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 84】

前記ゲノムの前記領域が、前記ゲノムの複数の非重複領域を含む、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 85】

前記ゲノムの前記複数の非重複領域が、予め決定されたサイズを有する、請求項 84 に記載の方法。

30

【請求項 86】

前記予め決定されたサイズが、約 50 キロベース (kb)、約 100 kb、約 200 kb、約 500 kb、約 1 メガベース (Mb)、約 2 Mb、約 5 Mb、または約 10 Mb である、請求項 85 に記載の方法

【請求項 87】

前記ゲノムの前記複数の非重複領域が、少なくとも約 1,000 個の別個の領域を含む、請求項 84 に記載の方法。

【請求項 88】

前記ゲノムの前記複数の非重複領域が、少なくとも約 2,000 個の別個の領域を含む、請求項 87 に記載の方法。

40

【請求項 89】

前記第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することが、前記メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、前記 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれ由来する追加の cfDNA 分子から取得される、請求項 63 に記載の方法。

【請求項 90】

前記追加の対象が、がんを有する 1 人以上の対象を含む、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

前記追加の対象が、がんを有しない 1 人以上の対象を含む、請求項 89 に記載の方法。

50

【請求項 9 2】

前記追加の対象が、腫瘍進行を有する 1 人以上の対象を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 3】

前記追加の対象が、腫瘍進行を有しない 1 人以上の対象を含む、請求項 8 9 に記載の方法。

【請求項 9 4】

前記 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、前記第 1 の時点後の 1 つ以上の後続の時点で取得される前記対象の追加の体液試料を使用して取得される、請求項 8 9 に記載の方法。

10

【請求項 9 5】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、1 を超える、1.1 を超える、1.2 を超える、1.3 を超える、1.4 を超える、1.5 を超える、1.6 を超える、1.7 を超える、1.8 を超える、1.9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、前記腫瘍状態が、前記対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、0.01 未満、0.05 未満、0.1 未満、0.2 未満、0.3 未満、0.4 未満、または 0.5 未満である場合に、前記対象の主要分子応答 (MMR) を検出することをさらに含む、請求項 6 3 に記載の方法。

20

【請求項 9 7】

少なくとも約 50 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 6 3 ~ 9 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9 8】

少なくとも約 70 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

少なくとも約 90 % の感度で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 9 8 に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

少なくとも約 50 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 6 3 ~ 9 9 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 1 0 1】

少なくとも約 70 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 0 0 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

少なくとも約 90 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 0 1 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

少なくとも約 98 % の特異性で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 0 2 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 4】

少なくとも約 50 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 6 3 ~ 1 0 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

少なくとも約 70 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 0 4 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

少なくとも約 90 % の陽性予測値 (PPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 1 0 5 に記載の方法。

50

【請求項 107】

少なくとも約 50% の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 63～106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

少なくとも約 70% の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 107 に記載の方法。

【請求項 109】

少なくとも約 90% の陰性予測値 (NPV) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

少なくとも約 0.60 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記状態進行を検出することをさらに含む、請求項 63～109 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 111】

少なくとも約 0.75 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 110 に記載の方法。

【請求項 112】

少なくとも約 0.90 の曲線下面積 (AUC) で前記対象の前記腫瘍状態を検出することをさらに含む、請求項 111 に記載の方法。

【請求項 113】

腫瘍進行が検出されない場合に、前記対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、請求項 63～112 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 114】

前記対象の前記決定された腫瘍状態に基づいて、前記対象の前記がんを治療するために治療有効用量の第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、請求項 63～113 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 115】

前記第 2 の治療薬が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記第 1 および第 2 の複数の cfDNA 分子が、前記対象の免疫細胞に由来する、請求項 63～115 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 117】

前記検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、請求項 63～116 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 118】

前記第 1 および第 2 の MS データが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、請求項 63～117 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 119】

前記対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、請求項 1～60 および 63～118 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 120】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、

(i) ゲノムの領域全体にわたる第 1 の複数の無細胞 DNA (cfDNA) 分子の第 1 のメチル化配列決定 (MS) データであって、前記第 1 の複数の cfDNA 分子が、第 1 の時点での前記対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第 1 の時点は、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である

10

20

30

40

50

、第1のメチル化配列決定(MS)データ、および(ii)前記ゲノムの前記領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、

前記データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、前記1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得し、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得し、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1の平均メチル化割合プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定し、

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【請求項121】

非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、前記方法が、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点が、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1の平均メチル化割合プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

【請求項122】

前記検出された腫瘍進行が、少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化割合プロファイルの1つ以上の統計モデリング分析に基づく、請求項120に記載のコンピュータシステムまたは請求項112に記載の非一時的コンピュータ可読媒体。

【請求項123】

前記1つ以上の統計モデリング分析が、線形回帰、単純回帰、バイナリ回帰、ベイズ線形回帰、ベイズモデリング、多項回帰、ガウス過程回帰、ガウスモデリング、ロジスティック回帰、または非線形回帰を含む、請求項122に記載のシステムまたは媒体。

【請求項124】

前記1つ以上の統計モデリング分析が、前記検出された腫瘍進行を、既知の腫瘍割合を有する試料に由来するMSデータ、純粋な腫瘍試料に由来するMSデータ、または健常な試料に由来するMSデータと比較する、請求項122または123に記載のシステムまたは媒体。

10

【請求項125】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、

20

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、

前記1つ以上の遺伝子座全体にわたる前記第1のメチル化プロファイルと、前記1つ以上の遺伝子座全体にわたる前記第2のメチル化プロファイルとを比較することと、

30

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【請求項126】

前記第1および前記第2のメチル化プロファイルが、5-ヒドロキシメチルシトシン状態、5-メチルシトシンの状態、濃縮系メチル化評価、中央メチル化レベル、モードメチル化レベル、最大メチル化レベル、または最小メチル化レベルを含む、請求項125に記載の方法。

40

【請求項127】

前記第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液(CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、請求項125または126に記載の方法。

【請求項128】

前記第1のMSデータを取得することが、前記第1の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または前記第2のMSデータを取得することが、前記第2の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、請求項125

50

に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記メチル化配列決定が、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記メチル化配列決定が、全ゲノム酵素的メチル-*seq*を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記メチル化配列決定が、酸化的バイサルファイト配列決定、TET支援ピリジンボラン配列決定 (TAPS)、TET支援バイサルファイト配列決定 (TABS)、酸化的バイサルファイト配列決定 (oxBS-*Seq*)、APOBEC結合エピジェネティック配列決定 (ACE-*seq*)、メチル化DNA免疫沈降 (MeDIP) 配列決定、ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降 (hMeDIP) 配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定 (RRBS-*Seq*)、またはシトシン5-ヒドロキシメチル化配列決定を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記第 1 または第 2 の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記ゲノムの前記領域について前記第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子を濃縮することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記ゲノムの前記領域が、CpGアイランド、CpGショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記ゲノムの前記領域が、前記ゲノムの複数の非重複領域を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することが、前記メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、前記 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれ由来する追加の cfDNA 分子から取得される、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、1 を超える、1.1 を超える、1.2 を超える、1.3 を超える、1.4 を超える、1.5 を超える、1.6 を超える、1.7 を超える、1.8 を超える、1.9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、前記腫瘍状態が、前記対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記第 1 の腫瘍割合または前記第 2 の腫瘍割合が、0.01 未満、0.05 未満、0.1 未満、0.2 未満、0.3 未満、0.4 未満、または 0.5 未満である場合に、前記対象の主要分子応答 (MMR) を検出することをさらに含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 9】

腫瘍進行が検出されない場合に、前記対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、請求項 1 2 8 ~ 1 3 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記対象の前記決定された腫瘍状態に基づいて、前記対象の前記がんを治療するために

10

20

30

40

50

治療有効用量の第2の治療薬を投与することをさらに含む、請求項128～139のいずれか一項に記載の方法。

【請求項141】

前記第1および第2の複数のcfDNA分子が、前記対象の免疫細胞に由来する、請求項128～140のいずれか一項に記載の方法。

【請求項142】

前記検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、請求項128～141のいずれか一項に記載の方法。

【請求項143】

前記第1および第2のMSデータが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、請求項128～142のいずれか一項に記載の方法。

【請求項144】

前記対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、請求項128～143のいずれか一項に記載の方法。

【請求項145】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、

(i) ゲノムの領域全体にわたる第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、第1のメチル化配列決定 (MS) データ、および (ii) 前記ゲノムの前記領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、

前記データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、前記1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得し、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得し、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1のメチル化プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2のメチル化プロファイルとを比較し、

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【請求項146】

非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、前記方法が、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分

10

20

30

40

50

子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点が、前記対象に前記がんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点が、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

10

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1の平均メチル化割合プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較することと、

少なくとも部分的に、前記それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

20

【請求項147】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、

前記第1のWGSデータに基づいて、(i)前記第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)前記第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、

30

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

40

前記第2のWGSデータに基づいて、(iii)前記第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)前記第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの前記領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割

50

合プロファイルを取得することと、

前記第1の複数のCNAを前記第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

前記第1の複数の断片長および前記第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第1の平均メチル化割合プロファイルと、前記1つ以上のCpGアイランド全体にわたる前記第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、

少なくとも部分的に、前記CNAプロファイル変化、前記断片長プロファイル変化、および前記それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

10

、
少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【請求項148】

がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第1の時点は、前記がんを治療するように構成された治療薬が、前記対象に投与される前である、取得することと、

20

前記第1のWGSデータに基づいて、(i)前記第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)前記第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、前記第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での前記対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

前記第1のMSデータに基づいて、前記ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

30

定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、
第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、前記第2の時点は、前記対象に前記治療薬が投与された後である、取得することと、

前記第2のWGSデータに基づいて、(iii)前記第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)前記第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

前記ゲノムの前記領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、前記第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での前記対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

40

、
前記第2のMSデータに基づいて、前記ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、
前記第1の複数のCNAを前記第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

前記第1の複数の断片長および前記第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

前記1つ以上の遺伝子座全体にわたる前記第1のメチル化プロファイルと、前記1つ以

50

上の遺伝子座全体にわたる前記第2のメチル化プロファイルとを比較することと、

少なくとも部分的に、前記CNAプロファイル変化、前記断片長プロファイル変化、および前記それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、前記第1の時点での前記対象の第1の腫瘍割合または前記第2の時点での前記対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、前記第1の腫瘍割合または前記第2の腫瘍割合に基づいて、前記対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【請求項149】

前記第1および前記第2のメチル化プロファイルが、5-ヒドロキシメチルシトシン状態、5-メチルシトシンの状態、濃縮系メチル化評価、中央メチル化レベル、モードメチル化レベル、最大メチル化レベル、または最小メチル化レベルを含む、請求項148に記載の方法。

10

【請求項150】

前記第1のWGSデータおよび前記第1のMSデータが、同じ試料から取得される、請求項147～149のいずれか一項に記載の方法。

【請求項151】

前記第1のWGSデータおよび前記第1のMSデータが、異なる試料から取得される、請求項147～149のいずれか一項に記載の方法。

【請求項152】

前記第2のWGSデータおよび前記第2のMSデータが、同じ試料から取得される、請求項147～151のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項153】

前記第2のWGSデータおよび前記第2のMSデータが、異なる試料から取得される、請求項147～151のいずれか一項に記載の方法。

【請求項154】

前記第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液(CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、請求項147～153のいずれか一項に記載の方法。

【請求項155】

前記第1のWGSデータを取得することが、前記第1の複数のcfDNA分子を配列決定して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または前記第2のWGSデータを取得することが、前記第2の複数のcfDNA分子を配列決定して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、請求項147～154のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項156】

複数のゲノム領域について前記第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することとをさらに含む、請求項147～155のいずれか一項に記載の方法。

【請求項157】

前記第1の複数のCNAを決定することが、前記第1の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含み、前記第2の複数のCNAを決定することが、前記第2の複数の配列決定読み取りの前記複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含む、請求項155または請求項156に記載の方法。

40

【請求項158】

前記CNAプロファイル変化を決定することが、前記第157の複数のCNAおよび前記第2の複数のCNAを複数の基準CNA値と比較することを含み、前記複数の基準CNA値が、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加のcfDNA分子から取得される、請求項147～157のいずれか一項に記載の方法。

【請求項159】

前記第1および第2のWGSデータが、パイロ配列決定、合成による配列決定、単一分

50

子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、超並列配列決定、鎖末端配列決定、単一分子リアルタイム配列決定、ポロニー配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、またはハイブリッド捕捉系配列決定によって取得される、請求項 1 4 7 ~ 1 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

前記第 1 の MS データを取得することが、前記第 1 の複数の cfDNA 分子のメチル化配列決定を実施して、第 1 の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または前記第 2 の MGS データを取得することが、前記第 2 の複数の cfDNA 分子のメチル化配列決定を実施して、第 2 の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、請求項 1 4 7 ~ 1 5 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 6 1】

前記ゲノムの前記領域について前記第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子を濃縮することをさらに含む、請求項 1 4 7 ~ 1 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 2】

前記ゲノムの前記領域が、CpG アイランド、CpG ショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのビン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む、請求項 1 4 7 ~ 1 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 3】

前記第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することが、前記メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、前記 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれ由来する追加の cfDNA 分子から取得される、請求項 1 4 7 ~ 1 6 2 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 1 6 4】

前記対象の前記決定された腫瘍状態に基づいて、前記対象の前記がんを治療するために治療有効用量の治療を投与することをさらに含む、請求項 1 4 7 ~ 1 6 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 5】

前記治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む、請求項 1 6 4 に記載の方法。

30

【請求項 1 6 6】

前記第 1 および第 2 の複数の cfDNA 分子が、前記対象の免疫細胞に由来する、請求項 1 4 7 ~ 1 6 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 7】

前記検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、請求項 1 4 7 ~ 1 6 6 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 1 6 8】

前記第 1 および第 2 の MS データが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、請求項 1 4 7 ~ 1 6 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6 9】

前記対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、請求項 1 4 7 ~ 1 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年12月24日に出願された米国仮特許出願第62／953,368号および2020年3月23日に出願された同第62／993,564号の優先権を主張し、その各々の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の申請

ASCIIテキストファイルでの以下の申請の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：配列表のコンピュータ可読形式（CRF）（ファイル名：197102004840SEQULIST.TXT、記録日：2020年12月18日、サイズ：34KB）。

10

【背景技術】

【0003】

腫瘍進行は、一般に、がんを有する対象（例えば、患者）において重症度（例えば、腫瘍量、腫瘍サイズ、がんステージ）が進行している腫瘍を有する場合を指し得る。例えば、患者における腫瘍進行は、患者の腫瘍が、がんに対する治療レジメンに応答しないことを示し得る。一方で、患者における腫瘍非進行は、患者の腫瘍が、がんの治療レジメンに応答していることを示し得る。加えて、患者の腫瘍進行または腫瘍非進行状態は、がん治療に対する対象の予後を示し得る。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0004】

方法およびシステムは、対象の体液試料（例えば、血液試料）を分析することによって、がんを有する患者などの対象の腫瘍状態（例えば、進行、退行、再発など）を評価するために提供される。腫瘍進行または腫瘍非進行は、対象の試料からの腫瘍DNA（例えば、無細胞DNAから）を分析することによって評価および／またはモニターされ得る。対象の腫瘍進行または腫瘍非進行状態は、がんを有する対象についての診断、予後、または治療の選択を示し得る。

【0005】

一態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータを処理して、（i）第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常（CNA）、および（ii）第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータを処理して、（iii）第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常（CNA）、および（iv）第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAで処理して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長を第2の複数の断片長で処理して、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することと、を含む、方法が提供される。

30

40

【0006】

一態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退

50

行、または再発)を評価するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA(cfdna)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第1の複数のcfdna分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、(i)第1の複数のcfdna分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)第1の複数のcfdna分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA(cfdna)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第2の複数のcfdna分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、(iii)第2の複数のcfdna分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)第2の複数のcfdna分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態(例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発)を検出することと、を含む、方法が提供される。

10

20

【0007】

一態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA(cfdna)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第1の複数のcfdna分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、(i)第1の複数のcfdna分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)第1の複数のcfdna分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA(cfdna)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第2の複数のcfdna分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、(iii)第2の複数のcfdna分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)第2の複数のcfdna分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態(例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発)を検出することと、検出された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療上有効用量の治療(例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤)を投与することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行を含み、方法は、患者に第2の治療を施すことを含み、投与前に、患者は、がんに対する第1の治療で治療されている(第1および第2の治療は、異なる)。

30

40

【0008】

いくつかの実施形態では、第1または第2の体液試料は、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液(CSF)、胸水、

50

腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1のWGSデータを取得することは、第1の複数のcfDNA分子を配列決定して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のWGSデータを取得することは、第2の複数のcfDNA分子を配列決定して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む。いくつかの実施形態では、配列決定は、ナノポア配列決定、鎖末端（サンガー）配列決定、合成による配列決定（例えば、IlluminaまたはSolexa配列決定）、単一分子リアルタイム配列決定、超並列シグネチャ配列決定、ポロニー配列決定、454パイロ配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、ライゲーションによる配列決定（SOLiD配列決定）、またはGenapSys配列決定によるものである。いくつかの実施形態では、配列決定には、全ゲノムバイサルファイト配列決定（WGBS）、全ゲノム酵素的メチル-seq、全エクソーム配列決定、全エピゲノム配列決定、メチル化アレイ、減少表現バイサルファイト配列決定（RRBS-seq）、TET支援ピリジンボラン配列決定（TAPS）、TET支援バイサルファイト配列決定（TAB-seq）、APOBEC結合エピジェネティック配列決定（ACE-seq）、酸化的バイサルファイト配列決定（oxBS-seq）、プルダウンもしくはメチル化DNA免疫沈降配列決定、またはシトシン5-ヒドロキシメチル化配列決定（例えば、BlueStarを介する）が含まれる。

10

【0009】

いくつかの実施形態では、配列決定は、約40回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約30回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約25回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約20回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約12回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約10回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約8回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約6回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、配列決定は、約5回以下、約4回以下、約3回以下、約2回以下、または約1回以下の深度で実施される。

20

【0010】

いくつかの実施形態では、方法は、第1または第2の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、複数のゲノム領域について第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第1または第2の複数のcfDNA分子を増幅することを含む。いくつかの実施形態では、増幅は、選択的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、増幅は、普遍的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む。いくつかの実施形態では、第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することは、複数のプローブを使用することを含み、複数のプローブの各々は、複数のゲノム領域のうちのゲノム領域の少なくとも一部分と配列相補性を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、複数の腫瘍マーカー遺伝子座は、コピー数変化を有する1つ以上の遺伝子座（例えば、MET、EGFR、およびBRCA2などのCNA遺伝子座、ならびに染色体1および8の全アームCNA）を含む。かかるCNA遺伝子座は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) および Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC) などのデータベースを使用して見出すことができる。

30

40

【0011】

いくつかの実施形態では、第1の複数のCNAを決定することは、第1の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含み、第2の複数のCNAを決定することは、第2の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領

50

域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、GC含量および／またはマップビリティ傾向について、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNAを修正することをさらに含む。いくつかの実施形態では、修正は、統計モデリング分析を使用することを含む。いくつかの実施形態では、修正は、LOESS回帰またはベイズモデルを使用することを含む。いくつかの実施形態では、複数のゲノム領域は、予め決定されたサイズを有する基準ゲノムの非重複ゲノム領域を含む。いくつかの実施形態では、予め決定されたサイズは、約50キロベース(kb)、約100kb、約200kb、約500kb、約1メガベース(Mb)、約2Mb、約5Mb、または約10Mbである。

【0012】

いくつかの実施形態では、複数のゲノム領域は、少なくとも約1,000個の別個のゲノム領域を含む。いくつかの実施形態では、複数のゲノム領域は、少なくとも約2,000個の別個のゲノム領域を含む。いくつかの実施形態では、複数のゲノム領域は、少なくとも約3,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約4,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約5,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約6,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約7,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約8,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約9,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約10,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約15,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約20,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約25,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約30,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約35,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約40,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約45,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約50,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約100,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約150,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約200,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約250,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約300,000個の別個のゲノム領域、少なくとも約400,000個の別個のゲノム領域、または少なくとも約500,000個の別個のゲノム領域を含む。

【0013】

いくつかの実施形態では、CNAプロファイル変化を決定することは、第1の複数のCNAおよび第2の複数のCNAを複数の基準CNA値と処理することを含み、複数の基準CNA値は、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加のcfDNA分子から取得される。いくつかの実施形態では、追加の対象は、がんを有しない1人以上の対象（例えば、がんの影響を受けていない対象またはがんの診断を有しない対象）を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、腫瘍進行を有しない1人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、複数の基準CNA値は、第1の時点後の1つ以上の後続の時点で取得される対象の追加の体液試料を使用して取得される。

【0014】

いくつかの実施形態では、方法は、予め決定された基準を満たす第1の複数のCNAおよび第2の複数のCNAのサブセットを除外することをさらに含む。いくつかの実施形態では、所与のCNA値と対応する基準CNA値との間の差が、約1標準偏差以下の差を含む場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外する。いくつかの実施形態では、方法は、所与のCNA値と対応する基準CNA値との間の差が、約2標準偏差以下の差を含む場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、所与のCNA値と対応する局所平均断片または局所平均メチル化との間のスピアマンの順位相関に基づいて、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、スピアマンの順位相関係数（スピアマンのrho）が、-0.1

10

20

30

40

50

未満である場合に（例えば、局所平均断片長と局所腫瘍コピー数との間に有意な負の相関がないことを示す）、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む。これは、ピアソンの相関またはいくつかの他の種類の相関統計を使用して、CANと断片長またはメチル化との間に負の相関があるかを確認することができる。

【0015】

いくつかの実施形態では、方法は、ライブラリまたはゲノム位置に基づいて、第1の複数の断片長または第2の複数の断片長を正規化することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、1を超える、1.1を超える、1.2を超える、1.3を超える、1.4を超える、1.5を超える、1.6を超える、1.7を超える、1.8を超える、1.9を超える、2を超える、3を超える、4を超える、または5を超える場合に、腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）が、対象の腫瘍進行を含むことをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、0.01未満、0.05未満、0.1未満、0.2未満、0.3未満、0.4未満、または0.5未満である場合に、対象の主要分子応答（MMR）を検出することをさらに含む。

10

【0016】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約98%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約99%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

20

【0017】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約98%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約99%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

30

【0018】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の陽性予測値（PPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約98%の陽性予測値（PPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約99%の陽性予測値（PPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

40

【0019】

50

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 99 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。

10

【0020】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.50、少なくとも約 0.55、少なくとも約 0.60、少なくとも約 0.65、少なくとも約 0.70、少なくとも約 0.75、少なくとも約 0.80、少なくとも約 0.85、少なくとも約 0.90、少なくとも約 0.91、少なくとも約 0.92、少なくとも約 0.93、または少なくとも約 0.94 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.95、少なくとも約 0.96、少なくとも約 0.97、または少なくとも約 0.98 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.99 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を検出することをさらに含む。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、方法は、腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象の決定された腫瘍状態 (例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発) に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の治療を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、治療は、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤による治療を含む。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す。いくつかの実施形態では、第1および第2のWGSデータは、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサ (例えば、本開示の方法に基づいて、命令を実行するための1つ以上のプログラムを含む) によって取得される。

30

【0022】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するためのコンピュータシステムであって、(i) 第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データ、および(ii) 第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データを保存するように構成されたデータベースと、データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、第1のWGSデータを処理して、(i) 第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定し、第2のWGSデータを処理して、(iii) 第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(iv) 第2の複数の

40

50

c f D N A分子の第2の複数の断片長を決定し、第1の複数のC N Aを第2の複数のC N Aで処理して、C N Aプロファイル変化を決定し、第1の複数の断片長を第2の複数の断片長で処理して、断片長プロファイル変化を決定し、少なくとも部分的に、C N Aプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステムが提供される。

【0023】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するためのコンピュータシステムであって、（i）第1の複数の無細胞DNA（c f D N A）分子の第1の全ゲノム配列決定（W G S）データであって、第1の複数のc f D N A分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、第1の全ゲノム配列決定（W G S）データ、および（ii）第2の複数の無細胞DNA（c f D N A）分子の第2の全ゲノム配列決定（W G S）データであって、第2の複数のc f D N A分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2の全ゲノム配列決定（W G S）データを保存するように構成されたデータベースと、データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、第1のW G Sデータに基づいて、（i）第1の複数のc f D N A分子における第1の複数のコピー数異常（C N A）、および（ii）第1の複数のc f D N A分子の第1の複数の断片長を決定し、第2のW G Sデータに基づいて、（iii）第2の複数のc f D N A分子における第2の複数のコピー数異常（C N A）、および（iv）第2の複数のc f D N A分子の第2の複数の断片長を決定し、第1の複数のC N Aを第2の複数のC N Aと比較して、C N Aプロファイル変化を決定し、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定し、少なくとも部分的に、C N Aプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステムが提供される。

【0024】

一態様では、本開示は、非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、第1の複数の無細胞DNA（c f D N A）分子の第1の全ゲノム配列決定（W G S）データを取得することであって、第1の複数のc f D N A分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のW G Sデータを処理して、（i）第1の複数のc f D N A分子における第1の複数のコピー数異常（C N A）、および（ii）第1の複数のc f D N A分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA（c f D N A）分子の第2の全ゲノム配列決定（W G S）データを取得することであって、第2の複数のc f D N A分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のW G Sデータを処理して、（iii）第2の複数のc f D N A分子における第2の複数のコピー数異常（C N A）、および（iv）第2の複数のc f D N A分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のC N Aを第2の複数のC N Aで処理して、C N Aプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長を第2の複数の断片長で処理して、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、C N A

プロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体が提供される。

【0025】

一態様では、本開示は、非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、（i）第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常（CNA）、および（ii）第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、（iii）第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常（CNA）、および（iv）第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体が提供される。

【0026】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するための方法であって、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイル

を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを処理して、メチル化割合プロファイル

を決定することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第2の時点後の追加の時点は、後続の時点で生じる腫瘍進行を検出するために、採取および分析され得る。

【0027】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するための方法であって、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第2の時点後の追加の時点は、後続の時点で生じる腫瘍進行を検出するために、採取および分析され得る。

10

20

【0028】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための方法であって、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、対象の検出された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の治療（例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤）を投与することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行を含み、方法は、患者に第2の治療を施すことを含み、投与前に、患者は、がんに対する第1の治療で治療されている（第1および第2の治療は、異なる）。

30

40

【0029】

50

いくつかの実施形態では、第1または第2の体液試料は、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液（CSF）、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第1のMSデータを取得することは、第1の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のMGSデータを取得することは、第2の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、全ゲノム酵素的メチル-seqを含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、酸化的バイサルファイト配列決定、TET支援ピリジンボラン配列決定（TAP S）、TET支援バイサルファイト配列決定（TABS）、酸化的バイサルファイト配列決定（oxBS-Seq）、APOBEC結合エピジェネティック配列決定（ACE-seq）、メチル化DNA免疫沈降（MeDIP）配列決定、ヒドロキシメチル化DNA免疫沈降（hMeDIP）配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定（RRBS-Seq）、またはシトシン5-ヒドロキシメチル化配列決定を含む。

10

【0030】

いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約40回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約30回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約25回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約20回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約12回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約10回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約8回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約6回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約5回以下、約4回以下、約3回以下、約2回以下、または約1回以下の深度で実施される。

20

【0031】

いくつかの実施形態では、方法は、第1または第2の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して（例えば、基準ゲノムのCからTに変換されたバージョンと同時に）、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ゲノムの領域について第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第1または第2の複数のcfDNA分子を増幅することを含む。いくつかの実施形態では、増幅は、選択的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、増幅は、普遍的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む。いくつかの実施形態では、第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することは、複数のプローブを使用することを含み、複数のプローブの各々は、ゲノムの領域の少なくとも一部分との配列相補性を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、複数の腫瘍マーカー遺伝子座は、The Cancer Genome Atlas（TCGA）またはCatalogue of Somatic Mutations in cancer（COSMIC）から選択される1つ以上の遺伝子座を含む。

30

40

【0032】

いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、CpGアイランド、CpGショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、ゲノムの複数の非重複領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、予め決定されたサイズを有する。いくつかの実施形態では、予め決定されたサイズは、約50キロベース（kb）、約100kb、約2

50

0 0 k b、約 5 0 0 k b、約 1 メガベース (M b)、約 2 M b、約 5 M b、または約 1 0 M b である。いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、1 つ以上の M A G E (黒色腫関連抗原) 遺伝子、例えば、ヒト M A G E 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、1 つ以上の M A G E (黒色腫関連抗原) 遺伝子、例えば、ヒト M A G E 遺伝子に対応する 1 つ以上のプロモーターを含む。

【0 0 3 3】

いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 1, 0 0 0 個の別個の領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 2, 0 0 0 個の別個の領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 3, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 4, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 5, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 6, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 7, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 8, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 9, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 1 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 1 5, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 2 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 2 5, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 3 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 3 5, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 4 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 4 5, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 5 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 1 0 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 1 5 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 2 0 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 2 5 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 3 0 0, 0 0 0 個の別個の領域、少なくとも約 4 0 0, 0 0 0 個の別個の領域、または少なくとも約 5 0 0, 0 0 0 個の別個の領域を含む。

【0 0 3 4】

いくつかの実施形態では、第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することは、メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルで処理することを含み、1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルは、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加の c f D N A 分子から取得される。いくつかの実施形態では、追加の対象は、がんを有する 1 人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、がんを有しない 1 人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、腫瘍進行を有する 1 人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、腫瘍進行を有しない 1 人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルは、第 1 の時点後の 1 つ以上の後続の時点で取得される対象の追加の体液試料を使用して取得される。

【0 0 3 5】

いくつかの実施形態では、方法は、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、1 を超える、1. 1 を超える、1. 2 を超える、1. 3 を超える、1. 4 を超える、1. 5 を超える、1. 6 を超える、1. 7 を超える、1. 8 を超える、1. 9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、0. 0 1 未満、0. 0 5 未満、0. 1 未満、0. 2 未満、0. 3 未満、0. 4 未満、または 0. 5 未満である場合に、対象の主要分子応答 (M M R) を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、統計的に有意に 1 を超える、1. 1 を超える、1. 2 を超える、1. 3 を超える、1. 4 を超える、1. 5 を超える、1. 6 を超える、1. 7 を超える、1. 8 を超える、1. 9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、対象の腫瘍進行を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、統計的に有意に 0. 0 1 未満、0. 0 5 未満、0. 1 未満、0. 2 未満、0. 3 未満、0. 4 未満、または 0. 5 未満である場合に、対象の主要分子応答 (M M R) を検出することをさらに含む。

【0 0 3 6】

10

20

20

30

30

40

40

50

50

0.95、少なくとも約0.96、少なくとも約0.97、または少なくとも約0.98の曲線下面積（AUC）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約0.99の曲線下面積（AUC）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、方法は、腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象の決定された腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の第2の治療薬を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第2の療法は、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、第1および第2の複数のcfDNA分子は、対象の免疫細胞に由来する。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す。いくつかの実施形態では、第1および第2のMSデータは、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサ（例えば、本開示の方法に基づいて、命令を実行するための1つ以上のプログラムを含む）によって取得される。

【0042】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、対象は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する。

【0043】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するためのコンピュータシステムであって、(i)ゲノムの領域全体にわたる第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、第1のメチル化配列決定（MS）データ、および(ii)ゲノムの領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2のMSデータであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、第1のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得し、第2のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得し、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルおよび1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイル処理し、メチル化割合プロファイル決定し、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステムが提供される。

【0044】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するためのコンピュータシステムであって、(i)ゲノムの領

域全体にわたる第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、第1のメチル化配列決定 (MS) データ、および (ii) ゲノムの領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得し、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得し、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定し、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステムが提供される。

10

20

【0045】

別の態様では、本開示は、非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを処理して、メチル化割合プロファイルを決定することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体が提供される。

30

40

【0046】

別の態様では、本開示は、非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、

50

第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することとであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体が提供される。

10

【0047】

いくつかの実施形態では、検出された腫瘍進行は、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルの1つ以上の統計モデリング分析に基づく。いくつかの実施形態では、1つ以上の統計モデリング分析は、線形回帰、単純回帰、バイナリ回帰、ベイズ線形回帰、ベイズモデリング、多項回帰、ガウス過程回帰、ガウスモデリング、バイナリ回帰、ロジスティック回帰、または非線形回帰を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の統計モデリング分析は、検出された腫瘍進行を、既知の腫瘍割合を有する試料に由来するMSデータ、純粋な腫瘍試料に由来するMSデータ、または健常な試料に由来するMSデータと比較される。

20

【0048】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するための方法であって、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することとであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決定し（例えば、ゲノム領域内の1つ以上のCpGアイランドまたは非CpGメチル化遺伝子座）、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することとであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決定し（例えば、ゲノム領域内の1つ以上のCpGアイランドまたは非CpGメチル化遺伝子座）、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、第2の時点後の追加の時点は、後続の時点で生じる腫瘍進行を検出するために、採取および分析され得る。

30

40

【0049】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための方法であって、ゲノムの

50

領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点が、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、第1のMSデータに基づいて、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを設定し (例えば、ゲノム領域内の1つ以上のCpGアイランドまたは非CpGメチル化遺伝子座)、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点が、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを設定し (例えば、ゲノム領域内の1つ以上のCpGアイランドまたは非CpGメチル化遺伝子座)、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較することと、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、検出された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の治療 (例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤) を投与することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行を含み、方法は、患者に第2の治療を施すことを含み、投与前に、患者は、がんに対する第1の治療で治療されている (第1および第2の治療は、異なる)。

10

20

30

40

50

【0050】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態 (例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発) を評価するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、(i) 第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を設定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、(iii) 第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(iv) 第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を設定し、それに

よって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決​​定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法が提供される。

10

【0051】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、(i)第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、(iii)第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決​​定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、検出された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の治療(例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤)を投与することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行を含み、方法は、患者に第2の治療を施すことを含み、投与前に、患者は、がんに対する第1の治療で治療されている(第1および第2の治療は、異なる)。

20

30

40

50

【0052】

別の態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を評価するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、（i）第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常（CNA）、および（ii）第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、（iii）第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常（CNA）、および（iv）第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第2のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法が提供される。

【0053】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを治療するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータに基づいて、（i）第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常（CNA）、および（ii）第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1のメチル化配列決定（MS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータに基づいて、（iii）第2の

複数の c f D N A 分子における第 2 の複数のコピー数異常 (C N A)、および (i v) 第 2 の複数の c f D N A 分子の第 2 の複数の断片長を決定することと、ゲノムの領域全体にわたって第 2 の複数の無細胞 D N A (c f D N A) 分子の第 2 の M S データを取得することと、第 2 の複数の c f D N A 分子が、第 2 の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、第 2 の M S データに基づいて、ゲノムの 1 つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第 2 のメチル化プロファイルを取得することと、第 1 の複数の C N A を第 2 の複数の C N A と比較して、C N A プロファイル変化を決定することと、第 1 の複数の断片長および第 2 の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、1 つ以上の遺伝子座全体にわたる第 1 のメチル化プロファイルと、1 つ以上の遺伝子座全体にわたる第 2 のメチル化プロファイルとを比較することと、少なくとも部分的に、C N A プロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第 1 の時点での対象の第 1 の腫瘍割合または第 2 の時点での対象の第 2 の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、検出された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の治療 (例えば、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤) を投与することと、を含む、方法が提供される。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行を含み、方法は、患者に第 2 の治療を施すことを含み、投与前に、患者は、がんに対する第 1 の治療で治療されている (第 1 および第 2 の治療は、異なる)。

10

20

30

40

50

【0054】

いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 のメチル化プロファイルは、5-ヒドロキシメチルシトシン状態、5-メチルシトシンの状態、濃縮系メチル化評価、中央メチル化レベル、モードメチル化レベル、最大メチル化レベル、または最小メチル化レベルを含む。いくつかの実施形態では、第 1 または第 2 の体液試料は、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液 (C S F)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第 1 の M S データを取得することは、第 1 の複数の c f D N A 分子のメチル化配列決定を実施して、第 1 の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第 2 の M G S データを取得することは、第 2 の複数の c f D N A 分子のメチル化配列決定を実施して、第 2 の複数の配列決定読み取りを生成することを含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、全ゲノム酵素的メチル- s e q を含む。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、酸化的バイサルファイト配列決定、T E T 支援ピリジンボラン配列決定 (T A P S)、T E T 支援バイサルファイト配列決定 (T A B S)、酸化的バイサルファイト配列決定 (o x B S - S e q)、A P O B E C 結合エピジェネティック配列決定 (A C E - s e q)、メチル化 D N A 免疫沈降 (M e D I P) 配列決定、ヒドロキシメチル化 D N A 免疫沈降 (h M e D I P) 配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定 (R R B S - S e q)、またはシトシン 5-ヒドロキシメチル化配列決定を含む。

【0055】

いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 40 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 30 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 25 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 20 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 12 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 10 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 8 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配列決定は、約 6 回以下の深度で実施される。いくつかの実施形態では、メチル化配

列決定は、約 5 回以下、約 4 回以下、約 3 回以下、約 2 回以下、または約 1 回以下の深度で実施される。

【0056】

いくつかの実施形態では、方法は、第 1 または第 2 の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して（例えば、基準ゲノムの C から T に変換されたバージョンと同時に）、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、ゲノムの領域について第 1 または第 2 の複数の c f D N A 分子を濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第 1 または第 2 の複数の c f D N A 分子を増幅することを含む。いくつかの実施形態では、増幅は、選択的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、増幅は、普遍的な増幅を含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、第 1 または第 2 の複数の c f D N A 分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 または第 2 の複数の c f D N A 分子の少なくとも一部分を選択的に単離することは、複数のプローブを使用することを含み、複数のプローブの各々は、ゲノムの領域の少なくとも一部分との配列相補性を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも一部分は、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む。いくつかの実施形態では、複数の腫瘍マーカー遺伝子座は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) または Catalogue of Somatic Mutations in cancer (COSMIC) から選択される 1 つ以上の遺伝子座を含む。

10

20

【0057】

いくつかの実施形態では、ゲノムの遺伝子座または領域は、C p G アイランド、C p G ショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、ゲノムの複数の非重複領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、予め決定されたサイズを有する。いくつかの実施形態では、予め決定されたサイズは、約 50 キロベース (k b)、約 100 k b、約 200 k b、約 500 k b、約 1 メガベース (M b)、約 2 M b、約 5 M b、または約 10 M b である。

【0058】

いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 1,000 個の別個の領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 2,000 個の別個の領域を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの複数の非重複領域は、少なくとも約 3,000 個の別個の領域、少なくとも約 4,000 個の別個の領域、少なくとも約 5,000 個の別個の領域、少なくとも約 6,000 個の別個の領域、少なくとも約 7,000 個の別個の領域、少なくとも約 8,000 個の別個の領域、少なくとも約 9,000 個の別個の領域、少なくとも約 10,000 個の別個の領域、少なくとも約 15,000 個の別個の領域、少なくとも約 20,000 個の別個の領域、少なくとも約 25,000 個の別個の領域、少なくとも約 30,000 個の別個の領域、少なくとも約 35,000 個の別個の領域、少なくとも約 40,000 個の別個の領域、少なくとも約 45,000 個の別個の領域、少なくとも約 50,000 個の別個の領域、少なくとも約 100,000 個の別個の領域、少なくとも約 150,000 個の別個の領域、少なくとも約 200,000 個の別個の領域、少なくとも約 250,000 個の別個の領域、少なくとも約 300,000 個の別個の領域、少なくとも約 400,000 個の別個の領域、または少なくとも約 500,000 個の別個の領域を含む。

30

40

【0059】

いくつかの実施形態では、第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することは、メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルで処理することを含み、1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルは、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加の c f D N A 分子から取得される。いくつかの実施形態では、追加の対象は、がんを有する 1 人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対

50

象は、がんを有しない1人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、腫瘍進行を有する1人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、追加の対象は、腫瘍進行を有しない1人以上の対象を含む。いくつかの実施形態では、1つ以上の基準メチル化割合プロファイルは、第1の時点後の1つ以上の後続の時点で取得される対象の追加の体液試料を使用して取得される。

【0060】

いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、1を超える、1.1を超える、1.2を超える、1.3を超える、1.4を超える、1.5を超える、1.6を超える、1.7を超える、1.8を超える、1.9を超える、2を超える、3を超える、4を超える、または5を超える場合に、腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、0.01未満、0.05未満、0.1未満、0.2未満、0.3未満、0.4未満、または0.5未満である場合に、対象の主要分子応答（MMR）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、統計的に有意に1を超える、1.1を超える、1.2を超える、1.3を超える、1.4を超える、1.5を超える、1.6を超える、1.7を超える、1.8を超える、1.9を超える、2を超える、3を超える、4を超える、または5を超える場合に、腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、統計的に有意に0.01未満、0.05未満、0.1未満、0.2未満、0.3未満、0.4未満、または0.5未満である場合に、対象の主要分子応答（MMR）を検出することをさらに含む。

10

20

【0061】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約98%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約99%の感度で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

30

【0062】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、または少なくとも約98%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約99%の特異性で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

40

【0063】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約92%、少なくとも約93%、または少なくとも約94%の陽性予測値（PPV）

50

で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 % の陽性予測値（PPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 99 % の陽性予測値（PPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

【0064】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 50 %、少なくとも約 55 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 65 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 75 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 91 %、少なくとも約 92 %、少なくとも約 93 %、または少なくとも約 94 % の陰性予測値（NPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、または少なくとも約 98 % の陰性予測値（NPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 99 % の陰性予測値（NPV）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.50、少なくとも約 0.55、少なくとも約 0.60、少なくとも約 0.65、少なくとも約 0.70、少なくとも約 0.75、少なくとも約 0.80、少なくとも約 0.85、少なくとも約 0.90、少なくとも約 0.91、少なくとも約 0.92、少なくとも約 0.93、または少なくとも約 0.94 の曲線下面積（AUC）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.95、少なくとも約 0.96、少なくとも約 0.97、または少なくとも約 0.98 の曲線下面積（AUC）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。いくつかの実施形態では、方法は、少なくとも約 0.99 の曲線下面積（AUC）で対象の腫瘍状態（例えば、腫瘍進行、非進行、退行、または再発）を検出することをさらに含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、方法は、腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象の決定された腫瘍状態（例えば、腫瘍の進行、非進行、退行、または再発）に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効用量の第 2 の治療薬を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、第 2 の療法は、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 の複数の cfDNA 分子は、対象の免疫細胞に由来する。いくつかの実施形態では、検出された腫瘍状態は、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す。いくつかの実施形態では、第 1 および第 2 の MS データは、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサ（例えば、本開示の方法に基づいて、命令を実行するための 1 つ以上のプログラムを含む）によって取得される。

【0067】

本明細書に記載の実施形態のいずれかによるいくつかの実施形態では、対象は、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する。

【0068】

本開示の別の態様は、非一時的コンピュータ可読媒体であって、1 つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、上記または本明細書の他の場所のいずれかの方法を

10

20

30

40

50

実施する、機械実行可能命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体が提供される。

【0069】

本開示の別の態様は、1つ以上のコンピュータプロセッサおよびそれに結合されたコンピュータメモリを含むシステムを提供する。コンピュータメモリは、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、上記または本明細書の他の場所のいずれかの方法を実施する、機械実行可能コードを含む。

【0070】

本開示の追加の態様および利点は、以下の詳細な説明から当業者に容易に明らかとされ、本開示の例示的な実施形態のみが示され、記載される。明白であるように、本開示は、他の異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細が、すべて本開示から逸脱することなく、様々な明らかな点で修正することができる。したがって、図面および説明は、本質的に例示的なものとみなされるべきであり、限定的なものとしてみなされるべきではない。

【0071】

本明細書に記載されているすべての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。参照により組み込まれる刊行物および特許または特許出願が明細書に含まれる開示と矛盾する範囲で、明細書は、任意のかかる矛盾する資料と入れ替わる、および／または優先することを意図している。

【0072】

本発明の新規の特徴は、添付の特許請求の範囲に詳細に記載されている。本発明の特徴および利点のより良好な理解は、本発明の原理が利用される例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、および添付の図面（さらに本明細書では「図（Figure）」および「図（FIG）」）を参照することによって得られるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0073】

【図1】いくつかの実施形態による、偏差の変化（CID）スコアを使用して対象における腫瘍進行を評価する例示的な方法を示す。

【図2】本明細書で提供される方法を実施するようにプログラムされているまたは他の方法で構成されたコンピュータシステムを示す。

【図3A】いくつかの実施形態による、臨床設定の概要を示す。図3Aは、分子応答を評価するためのエックス線撮影応答評価と、cfDNAの潜在的な使用とを比較する図を示す。図3Bは、研究中の患者についての画像化および採血のタイミングを示す。

【図3B】いくつかの実施形態による、臨床設定の概要を示す。図3Aは、分子応答を評価するためのエックス線撮影応答評価と、cfDNAの潜在的な使用とを比較する図を示す。図3Bは、研究中の患者についての画像化および採血のタイミングを示す。

【図4A】いくつかの実施形態による、分子進行を決定するためのctDNAの連続評価を示す。図4Aは、患者LS030178で検出されたCNAのゲノムワイドプロットを示す。T0ベースライン採血は、治療開始の13日前に収集され、T1は、治療開始の21日後に収集された。図4Bは、正規化された断片長がCNAと比較して逆パターンを示すことを示す。図4Cは、全体として、各ゲノム位置での正規化された断片長と推定コピー数との間に強い負の相関関係があったことを示す（Spearmanの $\rho = -0.57$ 、 $P < 1E-10$ ）。図4Dは、患者LS030178が、進行性疾患を示す画像化に先行して検出可能な、追跡時点T1およびT2でTFRの増加を有したことを示す。図4Eは、療法に応答した患者LS030093が、部分的応答を示した後の画像化と一致して、T1およびT2でTFRの著しい減少を示したことを示す。

【図4B】同上。

【図4C】同上。

【図4D】同上。

【図4E】同上。

【図 5 A】いくつかの実施形態による、療法の第 1 または第 2 のサイクルが進行を予測した後の c t D N A 評価を示す。図 5 A は、第 1 の F U I (R E C I S T 1. 1 によって評価された S L D) での画像化結果と分子進行の c t D N A 評価との比較を示し、いずれかの治療後試料の T F R の確実な増加によって示される (感度 = 5 4 % 、特異性 = 1 0 0 % 、 P P V = 1 0 0 % 、 N P V = 8 5 %) 。脚注のある事例は、明らかな臨床的進行を示した。図 5 B は、P D または非 P D のエックス線撮影または臨床評価と比較した、T 1 (左) および T 2 (右) での進行者および非進行者の T F R を示し、各時点での予測性能を示す。図 5 C は、分子進行を有する患者について、分子進行の検出が、中央値 4 0 日 (- 2 1 日 ~ 1 0 3 日の範囲) による標準治療画像化による進行の検出の日付に先行することを示す。

10

【図 5 B】同上。

【図 5 C】同上。

【図 6 A】いくつかの実施形態による、療法の経過における初期での分子応答評価が有利な P F S と関連していたことを示す。図 6 A は、完全なコホート (n = 9 2) が 2 1 1 日の中央値 P F S を有したことを示す。図 6 B は、T 1 または T 2 で c f D N A から検出された分子進行を有する患者 (n = 1 4 、中央値 P F S = 6 2 日) が、分子進行を有しない患者と比較して有意に不良な P F S を有したことを示す (n = 7 8 、中央値 P F S = 2 6 3 日 ; H R = 1 2 . 6 [9 5 % C I : 5 . 8 ~ 2 7 . 3] ; ログランク P < 1 E - 1 0) 。図 6 C ~ 6 D は、化学療法を伴うまたは伴わない免疫療法を受けている患者 (n = 3 4 ; ログランク P = 2 E - 1 2) (図 6 C) 、標的療法を伴うまたは伴わない化学療法を受けている患者 (n = 4 2 ; ログランク P = 7 E - 6) (図 6 D) についての治療様式に基づくサブセット分析を示す。図 6 E ~ 6 F は、肺がん患者 (n = 4 0 ; ログランク P = 8 E - 8) (図 6 E) および乳がん患者 (n = 2 5 ; ログランク P = 3 E - 4) (図 6 F) についてのがん種に基づくサブセット分析を示す。図 6 G は、M M R を伴う患者が、分子進行に基づく予測を考慮した後、有意に長い P F S を有したことを示す (C o x P = 0 . 0 1 1) 。図 6 H ~ 6 I は、応答状態 (ログランク P = 0 . 4) (図 6 H) または M M R (ログランク P = 0 . 0 2) (図 6 I) によって層別化された第 1 の F U I (n = 6 5) でのエックス線撮影によって決定された安定性疾患または部分的応答のいずれかを伴う患者のサブセット分析を示す。

20

【図 6 B】同上。

30

【図 6 C】同上。

【図 6 D】同上。

【図 6 E】同上。

【図 6 F】同上。

【図 6 G】同上。

【図 6 H】同上。

【図 6 I】同上。

【図 7 A】いくつかの実施形態による、メチル化が応答モニタリングについて C N A に交差性シグナルを提供し得ることを示す。これらの図は、ベースライン (黒線) および T 1 または T 2 のいずれか (オレンジ線) での患者 L S 0 3 0 0 8 3 (図 7 A) および L S 0 3 0 0 7 8 (図 7 B) についてのゲノムワイド 1 メガベースピンの平均メチル化レベルの分布を示す。

40

【図 7 B】同上。

【図 8】いくつかの実施形態による、健常な個体についての縦断的 W G S データを示す。この図には、図 4 A のように、最初の採血時 (上) および 3 4 日後 (下) で、参加者 L B - S 0 0 1 2 9 について C N A が検出されなかったことを示すゲノムワイドプロットが含まれる。

【図 9】いくつかの実施形態による、配列決定プロトコル全体にわたる腫瘍割合比の比較を示す。この図は、W G S および W G B S の両方で処理された 1 3 人の参加者からの 2 0 個の治療後試料についての結果を示す。第 1 の F U I での P D を有する患者からの 2 つの

50

試料は、分子進行の一致した分類を有さず、TFRの測定値はコール境界 (call boundary) に近かった。

【図10】いくつかの実施形態による、試料採取のタイミングおよび感度を示す。この図は、第1のFUIでPDを有する26人の参加者からの42個の試料についての分子進行および血液試料採取のタイミングを示す (2試料のコルモゴロフスミルノフ検定、 $P = 0.15$)。

【図11】いくつかの実施形態による、他のがんについての分子応答評価およびPFSを示す。この図は、図6E~6Fのようにプロットされた、非肺非乳がん ($n = 27$; ログランク $P = 5E-6$) を示す。

【図12A】いくつかの実施形態による、第1のFUIでの非PDを有する患者についてのMMRおよびPFSを示す。これらの図は、エックス線撮影での部分奏効 ($n = 30$) (図12A) または安定性疾患 ($n = 35$) (図12B) のすべての患者からの結果を示す。

【図12B】いくつかの実施形態による、第1のFUIでの非PDを有する患者についてのMMRおよびPFSを示す。これらの図は、エックス線撮影での部分奏効 ($n = 30$) (図12A) または安定性疾患 ($n = 35$) (図12B) のすべての患者からの結果を示す。

【図13A】いくつかの実施形態による、患者コホートにおけるこれらの3つの患者カテゴリ (MP、MMR、およびMPもMMRもなし) の各々についての Kaplan-Meier 無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) プロットの例を示す。これらの図は、生存曲線が互いに高度に分離されていることを示す。さらに、分子進行の予測は、高い特異性でエックス線撮影進行を予測する。

【図13B】いくつかの実施形態による、患者コホートにおけるこれらの3つの患者カテゴリ (MP、MMR、およびMPもMMRもなし) の各々についての Kaplan-Meier 無増悪生存期間 (PFS) および全生存期間 (OS) プロットの例を示す。これらの図は、生存曲線が互いに高度に分離されていることを示す。さらに、分子進行の予測は、高い特異性でエックス線撮影進行を予測する。

【図14A】いくつかの実施形態による、3つのMAGE遺伝子 (MAGEA1、MAGEA3、およびMAGEA4) で観察されたメチル化の強い平均減少の例を示す。

【図14B】いくつかの実施形態による、3つのMAGE遺伝子 (MAGEA1、MAGEA3、およびMAGEA4) で観察されたメチル化の強い平均減少の例を示す。

【図14C】いくつかの実施形態による、3つのMAGE遺伝子 (MAGEA1、MAGEA3、およびMAGEA4) で観察されたメチル化の強い平均減少の例を示す。

【図15A】治療経過全体にわたる患者からの複数の試料における特定のコピー数異常 (CNA) の強度の変化を定量化することは、CNAに基づいて別々の試料の腫瘍割合を別々に定量化することから生じる特定のエラーモードの傾向が少ないことを示す。

【図15B】治療経過全体にわたる患者からの複数の試料における特定のコピー数異常 (CNA) の強度の変化を定量化することは、CNAに基づいて別々の試料の腫瘍割合を別々に定量化することから生じる特定のエラーモードの傾向が少ないことを示す。

【発明を実施するための形態】

【0074】

本明細書で使用される「核酸」または「ポリヌクレオチド」という用語は、概して、1つ以上の核酸サブユニット、またはヌクレオチドを含む分子を指す。核酸は、アデノシン (A)、シトシン (C)、グアニン (G)、チミン (T)、およびウラシル (U)、またはそれらのバリエーションから選択される1つ以上のヌクレオチドを含み得る。ヌクレオチドは、概して、ヌクレオシドおよび少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ超のリン酸 (PO₃) 基を含む。ヌクレオチドは、核酸塩基、5炭素糖 (リボースまたはデオキシリボースのいずれか)、および1つ以上のリン酸基を個別にまたは組み合わせて含むことができる。

【0075】

10

20

30

40

50

リボヌクレオチドは、糖がリボースであるヌクレオチドである。デオキシリボヌクレオチドは、糖がデオキシリボースであるヌクレオチドである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドリン酸またはヌクレオシドポリリン酸であり得る。ヌクレオチドは、例えば、デオキシリボヌクレオシドトリホスフェート（dNTP）などのデオキシリボヌクレオシドポリホスフェートであり得、発光タグまたはマーカー（例えば、フルオロフォア）などの検出可能なタグが含まれる、デオキシアデノシントリホスフェート（dATP）、デオキシシチジントリホスフェート（dCTP）、デオキシグアノシントリホスフェート（dGTP）、ウリジントリホスフェート（dUTP）、およびデオキシチミジントリホスフェート（dTTP）dNTPから選択できる。ヌクレオチドは、成長する核酸鎖に組み込むことができる任意のサブユニットを含むことができる。かかるサブユニットは、A、C、G、T、もしくはU、あるいは1つ以上の相補的A、C、G、T、もしくはUと特異的であるか、またはプリン（すなわち、AもしくはG、またはそのバリエーション）もしくはピリミジン（すなわち、C、T、もしくはU、またはそれらのバリエーション）と相補的である任意の他のサブユニットであり得る。いくつかの例では、核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、またはそれらの誘導体もしくはバリエーションである。核酸は、一本鎖または二本鎖であり得る。核酸分子は、直鎖状、曲線状、もしくは環状、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。

10

【0076】

本明細書で使用される「核酸分子」、「核酸配列」、「核酸断片」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、概して、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチド（RNA）のいずれか、またはそれらの類似体など、様々な長さを有し得るポリヌクレオチドを指す。核酸分子は、少なくとも約5塩基、10塩基、20塩基、30塩基、40塩基、50塩基、60塩基、70塩基、80塩基、90、100塩基、110塩基、120塩基、130塩基、140塩基、150塩基、160塩基、170塩基、180塩基、190塩基、200塩基、300塩基、400塩基、500塩基、1キロボース（kb）、2kb、3kb、4kb、5kb、10kb、もしくは50kbの長さを有することができるか、またはそれは、前述の値のうちの任意の2つの間の任意の数の塩基を有し得る。オリゴヌクレオチドは、典型的に、4つのヌクレオチド塩基：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；およびチミン（T）（ポリヌクレオチドがRNAの場合はチミン（T）がウラシル（U））の特定の配列で構成される。したがって、「核酸分子」、「核酸配列」、「核酸断片」、「オリゴヌクレオチド」、および「ポリヌクレオチド」という用語は、少なくとも部分的に、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表現であることが意図されている。代替的に、これらの用語は、ポリヌクレオチド分子自体に適用され得る。このアルファベット表現は、中央処理装置を備えたコンピュータにおけるデータベースに入力する、ならびに／または機能ゲノミクスおよび相同性検索などのバイオインフォマティクスアプリケーションに使用され得る。オリゴヌクレオチドは、1つ以上の非標準ヌクレオチド、ヌクレオチド類似体、および／または修飾ヌクレオチドを含み得る。

20

30

【0077】

本明細書で使用される「試料」という用語は、概して、生物学的試料を指す。生物学的試料の例には、核酸分子、アミノ酸、ポリペプチド、タンパク質、炭水化物、脂質、またはウイルスが含まれる。一例では、生物学的試料は、1つ以上の核酸分子を含む核酸試料である。核酸分子は、無細胞DNA（cfDNA）または無細胞RNA（cfRNA）などの無細胞または無細胞核酸分子であり得る。核酸分子は、ヒト、哺乳動物、非ヒト哺乳動物、類人猿、サル、チンパンジー、爬虫類、両生類、または鳥類を含む様々な供給源に由来し得る。さらに、試料は、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液（CSF）、胸水、腹水、羊水、リンパ液などの体液試料を含むがこれらに限定されない、無細胞配列を含む様々な動物の体液から抽出され得る。無細胞ポリヌクレオチド（例えば、cfDNA）は、胎児由来（妊娠中の対象から採取した液体を介して）であり得るか、または対象自体の組織に由来し得る。

40

50

【0078】

本明細書で使用される「対象」という用語は、概して、処理または分析を受けている生物学的試料を有する個体を指す。対象は、動物または植物であり得る。対象は、ヒト、イヌ、ネコ、ウマ、ブタ、または齧歯動物などの哺乳動物であり得る。対象は、例えば、1つ以上のがん（例えば、脳がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、皮膚がん、尿路がん）、1つ以上の感染症、1つ以上の遺伝的障害、もしくは1つ以上の腫瘍、またはそれらの任意の組み合わせなどの疾患を有するか、あるいは有する疑いのある患者であり得る。1つ以上の腫瘍を有するかまたは有することが疑われる対象について、腫瘍は、1つ以上の種類のものであり得る。

10

【0079】

本明細書で使用される「全血」という用語は、概して、小成分に分離されていない（例えば、遠心分離によって）血液試料を指す。血液試料の全血には、cfDNAおよび／または生殖系列DNAを含み得る。全血DNA（cfDNAおよび／または生殖系列DNAを含み得る）は、血液試料から抽出され得る。全血DNA配列決定読み取り（cfDNA配列決定読み取りおよび／または生殖系列DNA配列決定読み取りを含み得る）は、全血DNAから抽出され得る。

【0080】

対象からの無細胞DNA配列データにおける腫瘍進行評価

対象から採取された試料の大部分（例えば、>80%）が腫瘍細胞から取得されるか、またはそれに由来する場合、腫瘍進行の評価は比較的複雑ではない。しかしながら、血液試料に由来する対象の血漿からの無細胞DNA（cfDNA）調製物では、cfDNAからの腫瘍DNAの検出、およびそこからの腫瘍進行の評価は、非感受性およびノイズの多いプロセスであり得る。非腫瘍DNAからの膨大なシグナル（例えば、腫瘍由来ではない生殖細胞からの生殖系列DNAから）のために、腫瘍DNAの検出ならびにかかる非感受性および／またはノイズの多いシグナルからの腫瘍進行の評価は困難であり得る。本開示は、対象（例えば、がんを有する患者）の試料から取得されるか、またはそれに由来するcfDNA分子の無細胞DNA（cfDNA）配列データ（例えば、cfDNA配列決定読み取り）から腫瘍進行を評価するための方法およびシステムを提供する。対象からの試料の分析からcfDNA配列データを受け取り、1つ以上のバイオインフォマティクスプロセスを使用して、対象の腫瘍進行または腫瘍非進行を評価することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞DNAは、cfDNAから検出され、任意に、腫瘍の進行を評価するために使用され得る。

20

30

【0081】

一態様では、本開示は、がんを有する対象の腫瘍進行を評価するための方法であって、第1の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第1の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、第1のWGSデータを処理して、（i）第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常（CNA）、および（ii）第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、第2の複数の無細胞DNA（cfDNA）分子の第2の全ゲノム配列決定（WGS）データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、第2のWGSデータを処理して、（iii）第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常（CNA）、および（iv）第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAで処理して、CNAプロファイル変化を決定することと、第1の複数の断片長を第2の複数の断片長で処理して、断片長プロファイル変化を決定することと、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に

40

50

基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することと、を含む、方法が提供される。

【0082】

図1は、いくつかの実施形態による、対象における腫瘍進行を評価する例示的な方法を示す。操作102において、第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データが、取得される。第1の複数のcfDNA分子は、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し得る。第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が対象に投与される前であり得る。操作104において、第1のWGSデータは、(i) 第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定するために処理される。操作106において、第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データが、取得される。第2の複数のcfDNA分子は、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し得る。第2の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が対象に投与された後であり得る。操作108において、第2のWGSデータは、(i) 第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定するために処理される。操作110において、第1の複数のCNAは、第2の複数のCNAと処理され (例えば、比較され)、CNAプロファイル変化を決定する。操作112において、第1の複数の断片長は、第2の複数の断片長と処理され (例えば、比較され)、断片長プロファイル変化を決定する。操作114において、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合および/または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合は、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて決定される。操作116において、対象の腫瘍進行は、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合および/または第2の腫瘍割合に基づいて検出される。

【0083】

いくつかの実施形態では、方法は、1つ以上のライブラリを同定することを含む (例えば、CNAパターンを使用することによって、またはライブラリが対照試料からのものであるという事実に基づいて、腫瘍割合を決定することができる)。各ライブラリについて、メチル化状態 (例えば、平均メチル化割合) は、本明細書に記載のメチル化配列決定を使用して、ゲノムの1つ以上の領域 (例えば、1つ、一部、またはすべてのCpGアイランド、プロモーターなど) から計算することができる。統計モデリング (例えば、線形回帰または本開示の別の技術) は、メチル化パターンに対して既知の腫瘍割合を規則化するために使用する、例えば、1人の参加者を残す交差検定を使用することができる。理論に縛られることを望まないが、これらの方法は、例えば、CNAが検出できない場合でさえ、メチル化パターンに基づいて試料の腫瘍割合を予測することを可能にすると考えられている。いくつかの実施形態では、方法は、2つ以上の時点にわたって上記の分析を比較することをさらに含む。

【0084】

例えば、配列決定読み取りは、当業者に知られている任意の好適な配列決定方法を使用して、cfDNAから生成され得る。配列決定法は、Maxam-Gilbertまたはサンガー配列決定などの第1世代配列決定法、またはハイスループット配列決定 (例えば、次世代配列決定またはNGS) 法であり得る。ハイスループット配列決定法は、少なくとも10,000、100,000、100万、1000万、1億、10億、またはそれ超のポリヌクレオチド分子を同時に (または実質的に同時に) 配列決定することができる。配列決定法には、パイロ配列決定、合成による配列決定、単一分子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、デジタル遺伝子発現 (Helicos (登録商標))、超並列配列決定、例えば、Helicos (登録商標)、クローン単一分子アレイ (Solexa (登録商

10

20

30

40

50

標)／Illumina(登録商標)、PacBio(登録商標)、SOLiD(登録商標)、Ion Torrent(登録商標)、またはNanopore(登録商標)プラットフォームを使用する配列決定が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、配列決定は、ナノポア配列決定、鎖末端(サンガー)配列決定、合成による配列決定(例えば、IlluminaまたはSolexa配列決定)、単一分子リアルタイム配列決定、超並列シグネチャ配列決定、ポロニー配列決定、454パイロ配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、ライゲーションによる配列決定(SOLiD配列決定)、またはGenapSys配列決定によるものである。いくつかの実施形態では、配列決定は、例えば、アダプタライゲーション系ライブラリを使用する、ハイブリッド捕捉系配列決定(ハイブリッド捕捉系NGS)を含む。例えば、Frampton, G. M. et al. (2013) Nat. Biotech. 31:1023-1031を参照されたい。

10

【0085】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、バイサルファイト配列決定を含む。バイサルファイト配列決定は、典型的に、配列決定の前にDNAをバイサルファイトで処理することを含み、これは、5-メチルシトシンを変換せずに、非メチル化シトシンをウラシルに変換し、これにより、DNAメチル化状態の検出が可能となる(ただし、以下に示すように、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンを区別するには追加の方法が必要である)。様々な標準的な配列決定法が、メチル化の検出に特異的または非特異的のいずれかの方法を含む、バイサルファイト処理後に使用され得る。配列決定法には、パイロ配列決定、直接配列決定(例えば、PCRを使用する)、高解像度融解分析、メチル化感受性一本鎖高次構造分析、メチル化感受性一塩基プライマー伸長、塩基特異的切断/MALDI-TOF、マイクロアレイによる配列分析、およびメチル化特異的PCRが含まれるが、これらに限定されない。

20

【0086】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、酸化的バイサルファイト配列決定を含む。酸化的バイサルファイト配列決定を使用して、5-ヒドロキシメチルシトシンを5-ホルミルシトシンに化学酸化することにより、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンを区別することができ、これは、バイサルファイト処理を介してウラシルに変換することができる。

30

【0087】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、TET支援ピリジンボラン配列決定(TAPS)またはTET支援バイサルファイト配列決定(TABSまたはTAB-Seq)などのTET系メチル化配列決定を含む。TAB-Seqは、テン-イレブントランスロケーション(TET)ジオキシゲナーゼ酵素を使用して5-ヒドロキシメチルシトシンの分離を可能にする。例示的な方法では、β-グルコシルトランスフェラーゼ(βGT)を使用して、5-ヒドロキシメチルシトシンをβ-グルコシル-5-ヒドロキシメチルシトシンに変換し(TETによるさらなる修飾およびバイサルファイトによる酸化を遮断する)、TET酵素を使用して、5-ヒドロキシメチルシトシンを5-カルボキシルシトシンに酸化し、それは、バイサルファイトを介したウラシル変換に感受性である。例えば、Yu, M. et al. (2012) Cell 149:1368-1380を参照されたい。TAPSの場合、TET酵素を使用して、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンを5-カルボキシルシトシンに酸化し、次に、ピリジンボラン還元により5-カルボキシルシトシンをジヒドロウラシル(DHU)に変換し、それは、PCRを介してチミンとして読み取ることができる。例えば、Liu, Y. et al. (2019) Nat. Biotechnol. 37:424-429を参照されたい。

40

【0088】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、酸化的バイサルファイト配列決定(oxBS-Seq)を含む。この方法では、過ルテニウム酸カリウムを使用して、5-メチルシトシンに影響を与えることなく、5-ヒドロキシメチルシトシンを5-ホルミルシトシンに

50

変換することができる。次に、バイサルファイト処理により、5-ホルミルシトシンをウラシルに変換することができる。

【0089】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、APOBEC結合エピジェネティック配列決定(ACE-seq)を含む。この方法では、アポリポタンパク質B mRNA編集酵素サブユニット3A(APOBEC3A)を使用して、シトシンおよび5-メチルシトシンを脱アミノ化し、それらをチミンとして配列決定し、一方でβ-グルコシルトランスフェラーゼ(βGT)を使用して、5-ヒドロキシメチルシトシンをβ-グルコシル-5-ヒドロキシメチルシトシンに変換する(それは、APOBECによる脱アミノ化を遮断する)。

10

【0090】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、メチル化DNA免疫沈降(MeDIP)またはヒドロキシメチル化DNA免疫沈降(hMeDIP)配列決定などのメチル化DNA免疫沈降配列決定を含む。これらの技術では、5-メチルシトシンまたは5-ヒドロキシメチルシトシンと特異的な抗体を使用して、免疫沈降、続いて精製および配列決定により、全DNAからメチル化DNAを単離する。

【0091】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、メチル化アレイを含む。この方法では、マイクロアレイ技術を使用して、複数のゲノム遺伝子座でのメチル化状態を調査することができる。例えば、DNAはバイサルファイト処理することができ、オリゴヌクレオチドプローブは、同じ遺伝子座の非メチル化(ウラシルを検出することにより)またはメチル化(シトシンを検出することにより)バージョンを検出するように設計され得る。どのプローブが配列とハイブリダイズするかを検出することで、その配列がメチル化されているかまたはいないかを同定する。

20

【0092】

いくつかの実施形態では配列決定法は、減少表現バイサルファイト配列決定(RRBS-Seq)を含む。この方法では、DNAをメチル化非感受性制限酵素(例えば、MspI)で消化し、付着末端およびAテイリングの修復後に配列アダプタを断片に付加する。次に、DNAをジスルフィドで処理し、PCRで増幅し、配列決定することができる。例えば、Meissner, A. et al. (2005) Nucleic Acids Res. 33:5868-5877を参照されたい。

30

【0093】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、シトシン5-ヒドロキシメチル化配列決定、例えば、hMe-SeaIを含む。この方法では、β-グルコシルトランスフェラーゼ(βGT)を使用して、アジド基を含むグルコース部分を5-ヒドロキシメチルシトシンに転移し、これは、ビオチンで化学修飾して、DNA断片の検出、親和性濃縮、および配列決定を可能にする。例えば、Song, C. X. et al. (2011) Nat. Biotechnol. 29:68-72を参照されたい。

【0094】

いくつかの実施形態では、配列決定法は、全ゲノム配列決定(WGS)を含む。配列決定は、所望の性能を有する対象における腫瘍進行または腫瘍非進行を評価するのに十分な深度で実施され得る(例えば、精度、感度、特異性、陽性予測値(PPV)、陰性予測値(NPV)、または受信者操作特性(ROC)の曲線下面積(AUC))。いくつかの実施形態では、配列決定は、「ローパス」方式で、例えば、約12回以下、約11回以下、約10回以下、約9回以下、約8回以下、約7回以下、約6回以下、約5回以下、約4回以下、約3.5回以下、約3回以下、約3回以下、約2.5回以下、約2回以下、約1.5回以下、または約1回以下の深度で実施される。

40

【0095】

いくつかの実施形態では、対象における腫瘍進行または腫瘍非進行を評価することは、cfDNA配列決定読み取りを基準ゲノムに整列することを含み得る。基準ゲノムは、ゲ

50

ノムの少なくとも一部分（例えば、ヒトゲノム）を含み得る。基準ゲノムは、全ゲノム（例えば、全ヒトゲノム）を含み得る。基準ゲノムは、メチル化データ整列に使用され得るように、特定の塩基変換が適用されたゲノム全体（例えば、非メチル化シトシンがチミンに変換されたヒトゲノム全体）を含み得る。基準ゲノムは、ゲノムのコーディングおよび／または非コーディングゲノム領域に対応する複数のゲノム領域を含むデータベースを含み得る。データベースは、がん由来変異などの、ゲノムのがん関連（または腫瘍関連）コーディングおよび／または非コーディングゲノム領域に対応する複数のゲノム領域を含み得る（例えば、一塩基バリエーション（SNV）、コピー数変化（CNA）、挿入または欠失（インデル）、ならびに他の再配列、融合遺伝子、およびゲノム領域（モノヌクレオチドおよび／またはジヌクレオチドなど））。整列は、Burrows-Wheelerアルゴリズム（BWA）、Sambambaアルゴリズム、Samtoolsアルゴリズム、またはその他の好適な整列アルゴリズムを使用して実施され得る。

10

【0096】

いくつかの実施形態では、対象における腫瘍進行または腫瘍非進行を評価することは、複数のゲノム領域の各々についてのcfDNA配列決定読み取りの定量的測定値を生成することを含み得る。cfDNA配列決定読み取りの定量的測定値は、所与のゲノム領域と整列されるDNA配列決定読み取りのカウントなどで生成され得る。所与のゲノム領域と整列する配列決定読み取りの一部分またはすべてを有するcfDNA配列決定読み取りは、そのゲノム領域について定量的な測定としてカウントされ得る。

【0097】

20

いくつかの実施形態では、ゲノム領域は、腫瘍マーカーを含み得る。特異的および非特異的ゲノム領域のパターンは、腫瘍進行または腫瘍非進行状態を示し得る。ゲノム領域のこれらのパターンの経時変化は、腫瘍進行または腫瘍非進行状態の変化を示し得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、cfDNAは、複数のゲノム領域の各々で複数のcfDNA分子の結合測定を実施することによってアッセイされ得る。いくつかの実施形態では、結合測定を実施することは、複数のcfDNA分子中の複数のゲノム領域のうちの少なくとも一部分に対して選択的であるプローブを使用して、複数のcfDNA分子をアッセイすることを含む。いくつかの実施形態では、プローブは、複数のゲノム領域の核酸配列と配列相補性を有する核酸分子である。いくつかの実施形態では、核酸分子は、プライマーまたは濃縮配列である。いくつかの実施形態では、アッセイには、アレイハイブリダイゼーション、またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、または核酸配列決定の使用が含まれる。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、方法は、複数のゲノム領域の少なくとも一部分について複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む。いくつかの実施形態では、濃縮は、複数のcfDNA分子を増幅することを含む。例えば、複数のcfDNA分子は、選択的増幅によって（例えば、複数のゲノム領域の核酸配列との配列相補性を有する核酸分子を含むプライマーまたはプローブのセットを使用することによって）増幅され得る。代替的に、または組み合わせて、複数のcfDNA分子は、普遍的な増幅によって（例えば、普遍的なプライマーを使用することによって）増幅され得る。いくつかの実施形態では、濃縮は、複数のcfDNA分子の少なくとも一部分（例えば、より短いcfDNA分子について濃縮された複数のcfDNA分子の一部分）を選択的に単離することを含む。

40

【0100】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、例えば、断片長、ヌクレオチド数などの1つ以上の定量的測定を取得することを含む。いくつかの実施形態では、定量的測定は、統計的測定である。好適な統計的測定は、当技術分野で既知である。例えば、いくつかの実施形態では、偏差の統計的測定は、基準試料のセットまたは基準値のセット（例えば、ベースライン値のセット）に対するzスコアを含む。

【0101】

50

いくつかの実施形態では、対象における腫瘍進行または腫瘍非進行を評価する方法は、複数のカウントを処理して、複数の c f D N A 分子の断片長の定量的測定（例えば、統計的測定）を取得することを含む。いくつかの実施形態では、複数の c f D N A 分子の断片長の定量的測定値は、複数の c f D N A 分子の各々のヌクレオチドの数を含む。基準試料は、腫瘍進行を有する 1 人以上の対象から、および／または腫瘍進行を有しない対象（例えば、腫瘍非進行を有する対象または非罹患患者）から取得され得る。基準試料は、がん種を有する 1 人以上の対象から、またはがん種を有しない対象から取得され得る（例えば、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がん）。基準試料は、進行期のがんを有する、または進行期のがんを有しない（例えば、初期のがんまたはがんのない）1 人以上の対象から取得され得る。

10

【0102】

いくつかの実施形態では、c f D N A 配列決定読み取りは、正規化または補正され得る。例えば、c f D N A 配列決定読み取りは、配列決定およびライブラリ調製における既知の傾向、ならびに／または配列決定およびライブラリ調製における既知の傾向を説明するために、重複排除、正規化、および／または補正され得る。いくつかの実施形態では、定量的測定値のサブセット（例えば、統計的測定値）は、例えば、かかる定量的測定値の変化（例えば、異なる時点にわたる）が、影響を受けていない対象で観察されたもの（例えば、c f D N A 分子のバックグラウンドプロファイル）と有意に異なるかに基づいて、除外され得る。定量的測定値は、例えば、定量的測定値の z スコアの絶対値が予め決定された数未満（またはそれ以下である）である場合に、除外され得る。予め決定された数は、約 0.1、約 0.2、約 0.5、約 1、約 1.5、約 2、約 2.5、約 3、約 3.5、約 4、約 4.5、約 5、または約 5 超であり得る。

20

【0103】

いくつかの実施形態では、複数のゲノム領域は、モノヌクレオチドおよび／またはジヌクレオチドを含む。複数のゲノム領域は、少なくとも約 10 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 50 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 100 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 500 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 1000 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 5000 個の別個のゲノム領域、少なくとも約 1 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 5 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 10 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 50 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 100 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 200 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 300 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 400 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 500 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 1000 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 1500 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 2000 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 2500 万個の別個のゲノム領域、少なくとも約 3000 万個の別個のゲノム領域、または 3000 万個を超える別個のゲノム領域を含み得る。

30

【0104】

いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、1 つ以上の M A G E（黒色腫関連抗原）遺伝子、例えば、ヒト M A G E 遺伝子を含む。いくつかの実施形態では、ゲノムの領域は、1 つ以上の M A G E（黒色腫関連抗原）遺伝子、例えば、ヒト M A G E 遺伝子に対応する 1 つ以上のプロモーターを含む。M A G E 遺伝子（例えば、ヒト M A G E 遺伝子）は、当技術分野で既知であり、例えば、Chomez, P. et al. (2001) Cancer Res. 61: 5544-5551、および Weon, J. L. and Potts, P. R. (2015) Curr. Opin. Cell Biol. 37: 1-8 を参照されたい。例示的な M A G E 遺伝子（例えば、ヒト M A G E 遺伝子）には、限定されないが、M A G E - A 遺伝子（例えば、M A G E - A 1、M A G E - A 2、M A G E - A 2 B、M A G E - A 3、M A G E - A 4、M A G E - A 5、M A G E - A 6、M A G E - A 8、M A G E - A 9、M A G E - A 10、M A G E - A 11、および M A G E - A 12）

40

50

、MAGE-B遺伝子（例えば、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-B5、MAGE-B6、MAGE-B6B、MAGE-B10、MAGE-B16、MAGE-B17、およびMAGE-B18）、MAGE-C遺伝子（例えば、MAGE-C1、MAGE-C2、およびMAGE-C3）、およびII型MAGE遺伝子（例えば、MAGE-D1、MAGE-D2、MAGE-D3、MAGE-D4、MAGE-E1、MAGE-E2、MAGE-F1、MAGE-G1、MAGE-H1、MAGE-L2、NDN、およびNDNL2）が含まれる。

【0105】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の感度で検出される。

10

【0106】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の特異性で検出される。

【0107】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の陽性予測値（PPV）で検出される。

20

【0108】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の陰性予測値（NPV）で検出される。

30

【0109】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行は、少なくとも約0.5、少なくとも約0.6、少なくとも約0.7、少なくとも約0.75、少なくとも約0.8、少なくとも約0.85、少なくとも約0.9、少なくとも約0.95、少なくとも約0.96、少なくとも約0.97、少なくとも約0.98、または少なくとも約0.99の受信者動作特性（ROC）の曲線下面積（AUC）で検出される。

【0110】

いくつかの実施形態では、対象における腫瘍進行を評価する方法は、腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む。

40

【0111】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍非進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の感度で検出される。

【0112】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍非進行は、少なくとも約10%、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約9

50

5 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の特異性で検出される。

【0113】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍非進行は、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の陽性予測値 (PPV) で検出される。

【0114】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍非進行は、少なくとも約 10 %、少なくとも約 20 %、少なくとも約 30 %、少なくとも約 40 %、少なくとも約 50 %、少なくとも約 60 %、少なくとも約 70 %、少なくとも約 80 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 96 %、少なくとも約 97 %、少なくとも約 98 %、または少なくとも約 99 % の陰性予測値 (NPV) で検出される。

10

【0115】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍非進行は、少なくとも約 0.5、少なくとも約 0.6、少なくとも約 0.7、少なくとも約 0.75、少なくとも約 0.8、少なくとも約 0.85、少なくとも約 0.9、少なくとも約 0.95、少なくとも約 0.96、少なくとも約 0.97、少なくとも約 0.98、または少なくとも約 0.99 の受信者動作特性 (ROC) の曲線下面積 (AUC) で検出される。

20

【0116】

いくつかの実施形態では、対象は、がんを有すると診断されている。例えば、がんは、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを含むがこれらに限定されない、1つ以上の種類のものであり得る。

【0117】

いくつかの実施形態では、方法は、対象の決定された腫瘍進行に基づいて、対象の腫瘍を治療するために治療有効用量の治療を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、治療は、外科手術、化学療法、治療剤、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤による治療を含む。

30

【0118】

対象の腫瘍進行または腫瘍非進行を評価して、対象におけるがんの診断、がんの予後、がんの再発、または腫瘍進行もしくは退行の兆候を決定することができる。加えて、1つ以上の臨床転帰は、腫瘍進行または腫瘍非進行評価またはモニタリング (例えば、2つ以上の時点の間の腫瘍進行または腫瘍非進行状態の差異) に基づいて割り当てられ得る。かかる臨床転帰は、1つ以上の種類の腫瘍を含むがんを有する対象を診断すること、1つ以上の種類およびステージの腫瘍を含むがんを有する対象を診断すること、対象についてがんを有する対象を予後診断すること (例えば、治療の臨床経過を示すこと (例えば、外科手術、化学療法、治療剤、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、もしくはチェックポイント阻害剤、または他の治療)、別の臨床経過方針を示すこと (例えば、治療しない、処方された時間間隔基盤などの継続的なモニタリング、現在の治療の停止、別の治療への切り替え)、または対象の予想される生存期間を示すことを含む得る。

40

【0119】

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行を評価する方法は、第1の複数のCNAを第2の複数のCNAで処理して、CNAプロファイル変化を決定することをさらに含む。い

50

いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行を評価する方法は、第1の複数の断片長を第2の複数の断片長で処理して、断片長プロファイル変化を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行を評価する方法は、少なくとも部分的に、CNAプロファイル変更および断片長プロファイル変更に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、対象の腫瘍進行を評価する方法は、少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍進行を検出することをさらに含む。例えば、腫瘍進行は、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が予め決定された基準を満たすかに基づいて決定され得る（例えば、少なくとも事前に決定された閾値である、事前に決定された閾値を超える、多くても事前に決定された閾値である、または事前に決定された閾値未満である）。予め決定された閾値は、1つ以上の基準対象（例えば、特定の腫瘍型を有することが知られている患者、特定のステージの特定の腫瘍型を有することが知られている患者、またはいかなるがんも示さない健常な対象）から取得されるか、またはそれに由来する1つ以上の基準試料に対して腫瘍進行または腫瘍非進行評価を実施して、基準対象から取得されるか、またはそれに由来する基準試料の腫瘍進行または腫瘍非進行に基づいて、好適な予め決定された閾値を特定することによって生成され得る。

10

【0120】

予め決定された閾値は、所望の感度、特異性、陽性予測値（PPV）、陰性予測値（NPV）、または対象の腫瘍進行もしくは腫瘍非進行状態を評価する精度に基づいて調整され得る。例えば、対象の腫瘍進行または腫瘍非進行状態を評価する高い感度が所望される場合、予め決定された閾値がより低く調整され得る。代替的に、対象の腫瘍進行または腫瘍非進行状態を評価する高い特異性が所望される場合、予め決定された閾値がより高く調整され得る。予め決定された閾値は、1つ以上の種類の腫瘍を含むがんの1つ以上の基準対象から取得されるか、またはそれに由来する評価において、偽陽性（FP）と偽陰性（FN）との間の所望のバランスを達成するように調整され得る。

20

【0121】

いくつかの実施形態では、腫瘍進行または腫瘍非進行を評価する方法は、第2の後続の時点で評価を繰り返すことをさらに含む。第2の時点は、第1の時点と比較した腫瘍進行または腫瘍非進行評価の好適な比較のために選択され得る。第2の時点の例は、外科的切除後の期間、治療投与中、もしくは治療の有効性をモニターするために対象におけるがんを治療するための治療投与後の期間、または対象における残存疾患もしくはがんの再発をモニターするための治療後の対象においてがんが検出されない後続の期間に対応し得る。

30

【0122】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、2つ以上の別個の時点での状態の差異（例えば、腫瘍進行または腫瘍非進行状態）を決定することを含む。時点間の状態の差異（例えば、初期時点での状態と後続または現在の時点での状態との比較）を使用して、例えば、腫瘍進行、退行、再発、または安定性状態を示すことができる。いくつかの実施形態では、例えば、腫瘍進行、退行、再発、または安定性状態を表すために、経時的な状態の差異がプロットされ得る。例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍進行または腫瘍非進行を評価する方法は、第1の腫瘍進行／腫瘍非進行状態と第2の腫瘍進行／腫瘍非進行状態との間の差異を決定することをさらに含む。いくつかの実施形態では、差異は、対象の腫瘍の進行または退行を示す。代替的に、または組み合わせで、方法は、コンピュータプロセッサによって、第1および第2の時点の関数としての第1の腫瘍進行／腫瘍非進行状態および第2の腫瘍進行／腫瘍非進行状態のプロットを生成することをさらに含み得る。いくつかの実施形態では、プロットは、対象の腫瘍の進行または退行を示す。例えば、コンピュータプロセッサは、x軸上の2つ以上の腫瘍進行または腫瘍非進行状態に対応するデータの収集時間に対応する時間に対するy軸上の2つ以上の腫瘍進行／腫瘍非進行状態のプロットを生成することができる。

40

【0123】

第1の腫瘍進行／非進行状態と第2の腫瘍進行／非進行状態との間で上述のように決定

50

またはプロットされた経時的な腫瘍状態の差異は、対象における腫瘍の進行、退行、再発、または安定性状態を示し得る。例えば、後続の腫瘍進行／非進行状態（例えば、第2の状態）が、初期の腫瘍進行／非進行状態（例えば、第1の状態）よりも大きい場合、この差異は、例えば、腫瘍進行、対象における腫瘍に対する治療の非効率性、進行中の治療に対する腫瘍の耐性、対象における他の部位への腫瘍の転移、または対象における残存疾患もしくはがんの再発を示し得る。後続の腫瘍進行／非進行状態（例えば、第2の状態）が初期の腫瘍進行／非進行状態（例えば、第1の状態）よりも小さい場合、この差異は、例えば、腫瘍退縮、対象における腫瘍の外科的切除の有効性、対象における腫瘍に対する治療の有効性、または対象における残存疾患もしくはがんの再発の欠如を示し得る。

【0124】

腫瘍進行または腫瘍非進行状態を評価したおよび／またはモニタリングした後、1つ以上の臨床転帰は、腫瘍進行または腫瘍非進行状態の評価またはモニタリング（例えば、2つ以上の時点の間の腫瘍進行または腫瘍非進行状態の差異）に基づいて割り当てられ得る。かかる臨床転帰は、1つ以上の種類の腫瘍を含むがんを有する対象を診断すること、1つ以上の種類およびステージの腫瘍を含むがんを有する対象を診断すること、対象についてがんを有する対象を予後診断すること（例えば、治療の臨床経過を示すこと（例えば、外科手術、化学療法、治療剤、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、もしくはチェックポイント阻害剤、または他の治療）、または対象内の腫瘍cDNAの起源を同定すること、別の臨床経過方針を示すこと（例えば、治療しない、処方された時間間隔基盤などの継続的なモニタリング、現在の治療の停止、別の治療への切り替え）、または対象の予想される生存期間を示すことを含み得る。

【0125】

治療

本開示の特定の態様は、例えば、1つ以上の治療剤による治療に関する。例えば、いくつかの実施形態では、治療は、外科手術、化学療法、治療剤、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤による治療を含むことができる。治療の例示的かつ非限定的な記載が本明細書に提供される。

【0126】

例えば、治療は、細胞傷害性剤または細胞増殖抑制剤が使用され得る。例示的な細胞傷害性剤には、抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、挿入剤、シグナル伝達経路を妨害することができる薬剤、およびアポトーシスを促進する薬剤、ならびに放射線照射が含まれる。さらに他の実施形態では、方法は、免疫調節剤、例えば、IL-1、2、4、6、もしくは12、またはインターフェロナルファもしくはガンマ、またはGM-CSFなどの免疫細胞増殖因子と組み合わせて使用することができる。

【0127】

いくつかの実施形態では、治療は、免疫療法または免疫調節療法、例えば、化合物系、抗体系、または細胞系免疫療法であり得る。免疫療法の例には、チェックポイント阻害剤、がんワクチン、細胞系療法、T細胞受容体（TCR）系療法、アジュバント免疫療法、サイトカイン免疫療法、または腫瘍溶解性ウイルス療法が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がん免疫療法には、低分子、核酸、ポリペプチド、炭水化物、毒素、細胞系、または結合剤治療剤が含まれる。がん免疫療法の例は、以下により詳細に記載されているが、限定することを意図するものではない。

【0128】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、チェックポイント阻害剤、がんワクチン、細胞系療法、T細胞受容体（TCR）系療法、補助免疫療法、サイトカイン免疫療法、お

10

20

30

40

50

よび腫瘍溶解性ウイルス療法のうちの1つ以上を含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法には、低分子、核酸、ポリペプチド、炭水化物、毒素、細胞系、または結合剤治療剤が含まれる。がん免疫療法の例は、以下でより詳細に記載されているが、限定することを意図するものではない。いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、免疫系の1つ以上の状況を活性化して、本開示の新抗原を発現する細胞（例えば、腫瘍細胞）を攻撃する。本開示のがん免疫療法は、単剤療法として、または医学的判断の対象となる任意の組み合わせまたは数の2つ以上を含む組み合わせアプローチでの使用が企図されている。任意のがん免疫療法（任意に、単剤療法として、または本明細書に記載の別のがん免疫療法もしくは他の治療剤と組み合わせで）が、本明細書に記載の方法のいずれかで使用され得る。
【0129】

10

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、がんワクチンを含む。腫瘍に指向する免疫応答を促進するための様々なアプローチを利用する一連のがんワクチンが試験されている（例えば、Emens L A, Expert Opin Emerg Drugs 13(2):295-308(2008)、およびUS20190367613を参照されたい）。アプローチは、腫瘍に対するB細胞、T細胞、またはプロフェッショナル抗原提示細胞の応答を強化するように設計されている。がんワクチンの例示的な種類には、DNA系ワクチン、RNA系ワクチン、ウイルス形質導入ワクチン、ペプチド系ワクチン、樹状細胞ワクチン、腫瘍溶解性ウイルス、全腫瘍細胞ワクチン、腫瘍抗原ワクチンなどが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、予防的または治療的であり得る。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、ペプチド系ワクチン、核酸系ワクチン、抗体系ワクチン、または細胞系ワクチンとして製剤化される。例えば、ワクチン組成物は、カチオン性脂質製剤中のネイキッドcDNA、リポペプチド（例えば、Vitiello, A. et al, J. Clin. Invest. 95:341, 1995）、ネイキッドcDNAまたはペプチド、カプセル化、例えば、ポリ(DL-ラクチド-co-グリコリド)（「PLG」）ミクロスフェア中（例えば、Eldridge, et al, Molec. Immunol. 28:287-294, 1991、Alonso et al, Vaccine 12:299-306, 1994、Jones et al, Vaccine 13:675-681, 1995）、免疫刺激複合体（ISCOMS）に含まれるペプチド組成物（例えば、Takahashi et al, Nature 344:873-875, 1990、Hu et al, Clin. Exp. Immunol. 113:235-243, 1998）、または複数の抗原ペプチドシステム（MAP）（例えば、Tam, J. P., Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A. 85:5409-5413, 1988、Tam, J. P., J. Immunol. Methods 196:17-32, 1996）を含むことができる。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、ペプチド系ワクチン、または核酸がポリペプチドをコードする核酸系ワクチンとして製剤化される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、抗体系ワクチンとして製剤化される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、細胞系ワクチンとして製剤化される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、ペプチドがんワクチンであり、いくつかの実施形態では、個別化ペプチドワクチンである。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、多価長ペプチド、マルチペプチド、ペプチド混合物、ハイブリッドペプチド、またはペプチドパルス樹状細胞ワクチンである（例えば、Yamada et al, Cancer Sci, 104:14-21, 2013を参照されたい）。いくつかの実施形態では、かかるがんワクチンは、抗腫瘍応答を増強する。
【0130】

20

30

40

いくつかの実施形態では、がんワクチンは、無症候性または最小限の症候性の転移性去勢抵抗性（ホルモン抵抗性）前立腺がんの治療に承認されている、シプロイセル-T（Provengé（登録商標）、Dendreon/Valeant Pharmaceuticals）、ならびに黒色腫の切除不能な皮膚、皮下、および結節性病変の治療のために承認されている遺伝子組み換え腫瘍溶解性ウイルス療法である、タリモジーンラハーパーレベック（Imlygic（登録商標）、BioVex/Amgén、以前はT-V

50

ECとして知られていた)から選択される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、腫瘍溶解性ウイルス療法、例えば、Pexastimogene devacirepvec (PexaVec/JX-594、SillaJen/以前はJennerex Biotherapeutics)、肝細胞がん(NCT02562755)および黒色腫(NCT00429312)に対して、GM-CSFを発現するように操作されたチミジンキナーゼ(TK-)欠損ワクシニアウイルス;Pelareorep(Reolysin(登録商標)、Oncolytics Biotech)、結腸直腸がん(NCT01622543);前立腺がん(NCT01619813);頭頸部扁平上皮がん(NCT01166542);膵臓腺癌(NCT00998322);および非小細胞肺癌(NSCLC)(NCT00861627)を含む多くのがんにおいて、RAS活性化されていない細胞で複製しないレオウイルス(レオウイルス)のバリエーション;Enadenotucirev(NG-348、PsiOxus、以前はColoAd1として知られていた)、卵巣がん(NCT02028117);結腸直腸がん、膀胱がん、頭頸部扁平上皮がん、および唾液腺がんなどの転移性または進行性上皮腫瘍(NCT02636036)において、全長CD80およびT細胞受容体CD3タンパク質と特異的な抗体断片を発現するように操作されたアデノウイルス;ONCOS-102(Targovax/以前はOncos)、黒色腫(NCT03003676);および腹膜疾患、結腸直腸がんまたは卵巣がん(NCT02963831)においてGM-CSFを発現するように操作されたアデノウイルス;GL-ONC1(GLV-1h68/GLV-1h153、GeneLux GmbH)、腹膜癌腫症(NCT01443260)、卵管がん、卵巣がん(NCT02759588)でそれぞれ研究された、ベーターガラクトシダーゼ(ベーターgal)/ベーターグルコロニダーゼまたはベーターgal/ヒトヨウ化ナトリウム共輸送体(hNIS)を発現するように操作されたワクシニアウイルス;またはCG0070(Cold Genesys)、膀胱がん(NCT02365818)においてGM-CSFを発現するように操作されたアデノウイルス;抗gp100;STINGVAX;GVAX;DCVaxL;およびDNX-2401から選択される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、JX-929(SillaJen/以前はJennerex Biotherapeutics)、プロドラッグ5-フルオロシトシンを細胞傷害性剤5-フルオロウラシルに変換することができるシトシンデアミナーゼを発現するように操作されたTKおよびワクシニア増殖因子欠損ワクシニアウイルス;TGO1およびTGO2(Targovax/以前はOncos)、治療が困難なRAS変異を標的としたペプチド系免疫療法剤;TILT-123(TILT Biotherapeutics)、Ad5/3-E2F-デルタ24-hTNF α -IRES-hIL20と命名されている操作されたアデノウイルス;VSV-GP(ViraTherapeutics)、抗原特異的CD8⁺T細胞応答を生じるように設計された抗原を発現するようにさらに操作することができる、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)の糖タンパク質(GP)を発現するように設計された水疱性口内炎ウイルス(VSV)から選択される。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、ベクター系腫瘍抗原ワクチンを含む。ベクター系腫瘍抗原ワクチンは、抗腫瘍免疫応答を刺激するための抗原の安定した供給を提供する方法として使用され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原をコードするベクターが患者に注入され(おそらく炎症性またはGM-CSFなどの他の誘引物質とともに)、インビボで細胞に取り込まれ、特定の抗原を作製し、これにより、所望の免疫応答が引き起こされる。いくつかの実施形態では、ベクターを使用して、一度に1つを超える腫瘍抗原を送達し、免疫応答を増加することができる。加えて組換えウイルス、細菌、または酵母ベクターは、それら自身の免疫応答を誘発するはずであり、それはまた、全体的な免疫応答を増強し得る。

【0131】

いくつかの実施形態では、がんワクチンは、DNA系ワクチンを含む。いくつかの実施形態では、DNA系ワクチンを利用して抗腫瘍応答を刺激することができる。抗原タンパク質をコードする直接注入されたDNAが防御免疫応答を誘発する能力は、多くの実験シ

10

20

30

40

50

システムで実証されている。抗原性タンパク質をコードするDNAを直接注入して防御免疫応答を誘発するワクチン接種は、多くの場合細胞性応答および体液性応答の両方を引き起こす。さらに、様々な抗原をコードするDNAに対する再現性のある免疫応答が、動物の生涯にわたって本質的に続くことがマウスで報告されている（例えば、Yankaukas et al. (1993) DNA Cell Biol., 12:771-776を参照されたい）。いくつかの実施形態では、遺伝子発現に必要な制御性要素に作動可能に連結されたタンパク質をコードする配列を含むプラスミド（または他のベクター）DNAは、個体（例えば、ヒト患者、非ヒト哺乳動物など）に投与される。いくつかの実施形態では、個体の細胞が投与されたDNAを取り込み、コード配列が発現される。いくつかの実施形態では、産生された抗原は、免疫応答が向けられる標的となる。

10

【0132】

いくつかの実施形態では、がんワクチンは、RNA系ワクチンを含む。いくつかの実施形態では、RNA系ワクチンを利用して抗腫瘍応答を刺激することができる。いくつかの実施形態では、RNA系ワクチンは、自己複製RNA分子を含む。いくつかの実施形態では、自己複製RNA分子は、アルファウイルス由来RNAレプリコンであり得る。自己複製RNA（または「SAM」）分子は当技術分野で周知であり、例えば、アルファウイルスに由来する複製要素を使用し、構造ウイルスタンパク質を目的のタンパク質をコードするヌクレオチド配列で置換することによって生成することができる。自己複製RNA分子は、典型的に、細胞への送達後に直接翻訳できる+鎖分子であり、この翻訳はRNA依存性RNAポリメラーゼを提供し、送達されたRNAからアンチセンス転写物およびセンス転写物の両方を産生する。したがって、送達されたRNAは、複数の娘RNAの生成につながる。これらの娘RNA、および共線的なサブゲノム転写物は、コードされたポリペプチド（すなわち、HPV抗原を含む）のインサイチュ発現を提供するためにそれ自体を翻訳し得るか、または抗原のインサイチュ発現を提供するために翻訳される、送達されたRNAと同じ意味でのさらなる転写物を提供するために転写され得る。

20

【0133】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、細胞系療法を含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、T細胞系療法を含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、養子療法、例えば、養子T細胞系療法を含む。いくつかの実施形態では、T細胞は、レシピエントに対して自家または同種異系である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD8+T細胞である。いくつかの実施形態では、T細胞は、CD4+T細胞である。養子免疫療法は、がんまたは感染症を治療するための治療アプローチを指し、細胞が腫瘍細胞に対する直接的または間接的に特異的免疫を媒介する（すなわち、免疫応答を開始する）ことを目的として、免疫細胞が宿主に投与される。いくつかの実施形態では、免疫応答は、腫瘍および／もしくは転移性細胞成長ならびに／または増殖の阻害をもたらす。関連する実施形態では、腫瘍性細胞死および／または吸収をもたらす。免疫細胞は、異なる生物／宿主（外因性免疫細胞）に由来し得るか、または対象生物から取得される細胞（自己免疫細胞）であり得る。いくつかの実施形態では、免疫細胞（例えば、自己または同種異系T細胞（例えば、制御性T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、またはガンマデルタT細胞）、NK細胞、インバリアントNK細胞、またはNKT細胞）は、遺伝子操作TCRおよび／またはキメラ抗原受容体（CAR）などの抗原受容体を発現するように遺伝子操作され得る。例えば、宿主細胞（例えば、自己または同種異系T細胞）は、がん抗原に対する抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するように修飾される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、TCRを発現するように操作されている。NK細胞は、CARを発現するようにさらに操作され得る。異なる抗原などに対する複数のCARおよび／またはTCRは、T細胞またはNK細胞などの単一の細胞型に追加することができる。いくつかの実施形態では、細胞は、1つ以上の抗原受容体をコードする遺伝子工学技術を介して導入される1つ以上の核酸／発現構築物／ベクター、およびかかる核酸の遺伝子操作産物を含む。いくつかの実施形態では、核酸は異種性であり、すなわち、典型的に、細胞または細胞から取得される試料、例えば、別の生物または細胞から取得されるものなど

30

40

50

には存在せず、これは、例えば、典型的に、操作されている細胞および／またはかかる細胞が由来する生物には見られない。いくつかの実施形態では、核酸は、天然には存在しない、例えば、自然界に見られない（例えば、キメラ）。いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団は、治療を必要としている、または免疫細胞活性の低減と関連する疾患に罹患する対象から取得され得る。したがって、細胞は、療法を必要とする対象に対して自家である。いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団は、組織適合性が一致したドナーなどのドナーから取得することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞集団は、末梢血、臍帯血、骨髓、脾臓、または免疫細胞が該対象またはドナー中に存在する他の任意の器官／組織から採取することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞は、プールされた臍帯血など、対象および／またはドナーのプールから単離することができる。いくつかの実施形態では、免疫細胞の集団が対象からとは異なるドナーから取得される場合、取得された細胞が対象に導入され得るという点で対象適合性であるという条件で、ドナーは同種異系であり得る。いくつかの実施形態では、同種異系ドナー細胞は、ヒト白血球抗原（HLA）適合性であり得るか、またはあり得ない。いくつかの実施形態では、対象に適合させるために、同種異系細胞を処理して免疫原性を低減させることができる。

10

【0134】

いくつかの実施形態では、細胞系療法は、T細胞系療法を含む。機能的な抗腫瘍エフェクタ細胞の誘導、活性化、および拡大のためのいくつかの基本的なアプローチが、過去20年間に説明されてきた。これらには、自家細胞、例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）；自家DCを使用してエキスピボで活性化されたT細胞、リンパ球、T細胞リガンドおよび活性化抗体でコーティングされた人工抗原提示細胞（APC）もしくはビーズ、または標的細胞膜を捕捉することによって単離された細胞；抗宿主腫瘍T細胞受容体（TCR）を自然に発現する同種異系細胞；「Tーボディ」として知られる抗体様腫瘍認識能力を提示する腫瘍応答性TCRまたはキメラTCR分子を発現するように遺伝子的に再プログラムまたは「リダイレクト」された非腫瘍特異的自家細胞または同種異系細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、T細胞は、血液、骨髓、リンパ、臍帯、またはリンパ器官に由来する。いくつかの態様では、細胞は、ヒト細胞である。いくつかの実施形態では、細胞は、対象から直接単離されたもの、および／または対象から単離されて凍結されたものなどの初代細胞である。いくつかの実施形態では、細胞には、T細胞または他の細胞型の1つ以上のサブセット、例えば、全T細胞集団、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞、その亜集団、例えば、機能、活性化状態、成熟度、分化の可能性、拡大、再循環、局在化、および／または持続能力、抗原特異性、抗原受容体の種類、特定の臓器もしくは区画における存在、マーカーもしくはサイトカイン分泌プロファイル、および／または分化の程度によって定義されるものが含まれる。いくつかの実施形態では、細胞は、同種異系および／または自家であり得る。いくつかの実施形態では、既製の技術などの場合、細胞は、多能性および／または多分化能性、例えば人工多能性幹細胞（iPSC）などの幹細胞である。いくつかの実施形態では、方法は、本明細書に記載されるように、対象から細胞を単離し、それらを調製、処理、培養、および／または操作し、凍結保存の前または後に、それらを同じ患者に再導入することを含む。いくつかの実施形態では、T細胞のサブタイプおよび亜集団（例えば、CD4⁺および／またはCD8⁺T細胞）は、ナイーブT（TN）細胞、エフェクタT細胞（TEFF）、メモリT細胞およびそのサブタイプ、例えば、幹細胞メモリT（TSCM）、中央メモリT（TCM）、エフェクタメモリT（TEM）、または最終分化エフェクタメモリT細胞、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、未成熟T細胞、成熟T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、粘膜関連インバリアントT（MAIT）細胞、自然発生および適応制御性T（Treg）細胞、ヘルパーT細胞、例えば、TH1細胞、TH2細胞、TH3細胞、TH17細胞、TH9細胞、TH22細胞、濾胞ヘルパーT細胞、アルファ／ベータT細胞、およびデルタ／ガンマT細胞が含まれる。いくつかの実施形態では、1つ以上のT細胞集団は、表面マーカーなどの特定のマーカーに対して陽性であるか、または特定のマーカーに対して陰性である細胞について濃縮または枯渇される。いくつかの実施形態では、かかるマーカーは、T細胞の特定の集団（例えば、非メモリ

20

30

40

50

細胞)には存在しないか、または比較的低いレベルで発現されるが、T細胞の特定の他の集団(例えば、メモリ細胞)には比較的高いレベルで存在または発現されるマーカーである。いくつかの実施形態では、T細胞は、B細胞、単球、またはCD14などの他の白血球などの非T細胞で発現するマーカーのネガティブセクションによってPBMC試料から分離される。いくつかの実施形態では、CD4⁺またはCD8⁺セクションステップは、CD4⁺ヘルパーおよびCD8⁺細胞傷害性T細胞を分離するために使用される。かかるCD4⁺およびCD8⁺集団は、1つ以上のナイーブ、メモリ、および/またはエフェクタT細胞亜集団で発現または比較的高い程度で発現されるマーカーのポジティブまたはネガティブセクションによって、亜集団にさらに分類され得る。いくつかの実施形態では、CD8⁺T細胞は、ナイーブ、セントラルメモリ、エフェクタメモリ、および/またはセントラルメモリ幹細胞について、それぞれの亜集団と関連する表面抗原に基づくポジティブまたはネガティブセクションなどによって、さらに濃縮または枯渇される。いくつかの実施形態では、T細胞は、自家T細胞である。この方法では、腫瘍試料が患者から取得され、単一細胞懸濁液が取得される。単一細胞懸濁液は、任意の好適な方式で、例えば、機械的に(例えば、gentleMACS(商標)Dissociator、Miltenyi Biotec、Auburn、Calif.を使用して腫瘍を分解する)または酵素的に(例えば、コラゲナーゼまたはDNase)取得することができる。腫瘍酵素消化物の単一細胞懸濁液は、インターロイキン-2(IL-2)で培養される。細胞は、コンフルエントになるまで(例えば、約2×10⁶個のリンパ球)、例えば、約5日~約21日、例えば、約10日~約14日で培養される。

10

20

【0135】

いくつかの実施形態では、培養されたT細胞は、プールされ、急速に拡大され得る。急速な増殖は、抗原特異的T細胞の数の増加、例えば、約10日~約14日の期間にわたって少なくとも約50倍(例えば、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、もしくは100倍、またはそれ超)の増加を提供する。いくつかの実施形態では、拡大は、当技術分野で既知であるいくつかの方法のいずれかによって達成することができる。例えば、T細胞は、支持リンパ球およびインターロイキン-2(IL-2)またはインターロイキン-15(IL-15)のいずれかの存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して急速に拡大させることができ、IL-2が特に企図される。非特異的T細胞受容体刺激には、約30ng/mlのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体(Ortho-McNeil(登録商標)、Raritan, N. J. から入手可能)が含まれる。いくつかの実施形態では、T細胞は、がんの1つ以上の抗原(エピトープまたは細胞などのその抗原性部分を含む)でインビトロで末梢血単核細胞(PBMC)を刺激することによって急速に拡大させることができ、これは、T細胞成長因子、例えば、300IU/mlのIL-2またはIL-15の存在下で、ヒト白血球抗原A2(HLA-A2)結合ペプチドなどのベクターから任意に発現させることができ、IL-2が企図される。インビボで誘導されたT細胞は、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原で再刺激することによって急速に拡大される。いくつかの実施形態では、T細胞は、例えば、照射された自家リンパ球、または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球およびIL-2で再刺激することができる。いくつかの実施形態では、自家T細胞は、自家T細胞の成長および活性化を促進するT細胞成長因子を発現するように修飾され得る。いくつかの実施形態では、好適なT細胞成長因子には、例えば、インターロイキン(IL)-2、IL-7、IL-15、およびIL-12が含まれる。修飾の好適な方法は、当技術分野で既知である。例えば、Sambrook et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. 2001、およびAusubel et al, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照されたい。いくつかの実施形態では、修飾された自家T細胞は、T細胞成長因子を高いレベルで発

30

40

50

現する。IL-12のようなT細胞成長因子コード配列は、当技術分野で容易に入手可能であり、プロモーターであり、その作動可能な結合は、T細胞成長因子コード配列への高いレベルの発現を促進する。いくつかの実施形態では、自家T細胞は、抗原ペプチド/MHC分子複合体へのより高い親和性に向けて、野生型TCRまたは変異/操作されたTCRのいずれかの標的TAAに指向する定義されたT細胞受容体(TCR)を発現するように操作され得る。いくつかの実施形態では、自家T細胞は、例えば、以下に記載されるように、CARを発現するように操作され得る。

【0136】

いくつかの実施形態では、T細胞系療法は、キメラ抗原受容体(CAR)-T系療法を含む。このアプローチは、目的の抗原と特異的に結合し、T細胞活性化のための1つ以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含む、CARの操作を伴う。次に、CARは、操作されたT細胞(CAR-T)の表面に発現し、患者に投与され、抗原を発現するがん細胞に対するT細胞特異的な免疫応答をもたらす。いくつかの実施形態では、CARは、本開示の新抗原と特異的に結合する。

10

【0137】

いくつかの実施形態では、T細胞系療法は、組換えT細胞受容体(TCR)を発現するT細胞を含む。このアプローチは、目的の抗原と特異的に結合するTCRを同定することを伴い、次に、これを使用して、患者に投与される操作されたT細胞の表面にある内因性または天然のTCRを置き換え、抗原を発現するがん細胞に対するT細胞特異的な免疫応答をもたらす。いくつかの実施形態では、組換えTCRは、本開示の新抗原と特異的に結合する。

20

【0138】

いくつかの実施形態では、T細胞系療法は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を含む。例えば、TILは、本開示の腫瘍またはがんから単離され得、次いで、インビトロで単離および拡大され得る。これらのTILのいくつかまたはすべてが、本開示の新抗原を特異的に認識し得る。いくつかの実施形態では、TILは、単離後、インビトロで本開示の1つ以上の新抗原に曝露される。次に、TILが患者に投与される(任意に、1つ以上のサイトカインまたは他の免疫刺激物質と組み合わせて)。

【0139】

いくつかの実施形態では、細胞系療法は、ナチュラルキラー(NK)細胞系療法を含む。ナチュラルキラー(NK)細胞は、様々な腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、ならびに骨髄および胸腺の一部の正常細胞に対して自発的な細胞傷害性を有するリンパ球の亜集団である。NK細胞は、形質転換細胞およびウイルス感染細胞に対する初期の自然免疫応答の重要なエフェクタである。NK細胞は、ヒト末梢血のリンパ球の約10%を構成する。リンパ球が、インターロイキン2(IL-2)の存在下で培養されると、強い細胞傷害反応性が発達する。NK細胞は、それらのサイズが大きく、それらの細胞質に特徴的なアズール顆粒が存在する、大型顆粒リンパ球として知られるエフェクタ細胞である。NK細胞は、骨髄、リンパ節、脾臓、扁桃腺、胸腺で分化して成熟する。NK細胞は、ヒトのCD16、CD56、CD8などの特定の表面マーカーによって検出され得る。NK細胞は、T細胞抗原受容体、汎TマーカーCD3、または表面免疫グロブリンB細胞受容体を発現しない。いくつかの実施形態では、NK細胞は、当技術分野で周知である方法による、ヒト末梢血単核細胞(PBMC)、非刺激性白血球除去産物(PBSC)、ヒト胚性幹細胞(hESC)、人工多能性幹細胞(iPSC)、骨髄、または臍帯血に由来する。いくつかの実施形態では、臍帯CBは、NK細胞を誘導するために使用される。いくつかの実施形態では、NK細胞は、NK細胞のエクスピボ増殖の前述の方法によって単離および増殖される(Spanholtz et al, 2011, Shah et al, 2013)。いくつかの実施形態では、CB単核細胞は、フィコール密度勾配遠心分離によって分離され、IL-2および人工抗原提示細胞(aAPC)を含むバイオリアクタで培養される。7日後、細胞培養物は、CD3を発現する任意の細胞が枯渇し、さらに7日間再培養される。細胞は、再びCD3が枯渇され、CD56⁺/CD3細胞またはNK細胞のパーセン

30

40

50

テージを決定するために特徴付けされる。いくつかの実施形態では、臍帯C Bは、C D 3 4⁺細胞を単離し、S C F、I L-7、I L-15、およびI L-2を含む培地で培養することによってC D 5 6⁺/C D 3細胞に分化させることでN K細胞を誘導するために使用される。

【0140】

いくつかの実施形態では、細胞系療法は、樹状細胞系療法、例えば、樹状細胞ワクチンを含む。いくつかの実施形態では、D Cワクチンは、特定のT細胞免疫を誘導することができる抗原提示細胞を含み、患者またはドナーから採取される。いくつかの実施形態では、次に、D Cワクチンは、患者の体内でT細胞が生成されるペプチド抗原にインビトロで曝露することができる。いくつかの実施形態では、次に、抗原が負荷された樹状細胞が、患者に注入される。いくつかの実施形態では、必要に応じて、免疫化は、複数回繰り返され得る。樹状細胞を採取、拡大、および投与するための方法は、当技術分野で既知であり、例えば、W O 2 0 1 9 / 1 7 8 0 8 1を参照されたい。樹状細胞ワクチン（例えば、シプロイセル-T、A P C 8 0 1 5およびP R O V E N G E（登録商標）としても知られている）は、1つ以上のがん特異的抗原、例えば、患者の免疫系に対する本開示の新抗原を提示するA P Cとして機能する樹状細胞の投与を伴うワクチンである。いくつかの実施形態では、ワクチンは、本開示の1つ以上の新抗原に曝露された樹状細胞を含む。いくつかの実施形態では、ワクチンは、例えば、M H CクラスIを介して、本開示の1つ以上の新抗原を提示する樹状細胞を含む。いくつかの実施形態では、樹状細胞は、レシピエントに対して自家または同種異系である。

10

20

【0141】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、T C R系療法を含む。いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、本開示の新抗原と特異的に結合する1つ以上のT C RまたはT C R系生物学的製剤の投与を含む。例えば、T C R系療法は、本開示の新抗原と特異的に結合するT C Rまたはその細胞外部分（例えば、M H CクラスIを介して細胞表面に提示されるように）、ならびにT細胞表面タンパク質もしくは受容体と特異的に結合する抗体または抗体断片（例えば、抗C D 3抗体または抗体断片）などの免疫細胞（例えば、T細胞）と結合する部分を含み得る。

【0142】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、アジュバント免疫療法を含む。アジュバント免疫療法は、自然免疫系の構成要素を活性化する1つ以上の薬剤、例えば、T L R 7経路を標的とするH I L T O N O L（登録商標）（イミキモド）の使用を含む。

30

【0143】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、サイトカイン免疫療法を含む。サイトカイン免疫療法は、免疫系の構成要素を活性化する1つ以上のサイトカインの使用を含む。例としては、アルデスロイキン（P R O L E U K I N（登録商標）；インターロイキン-2）、インターフェロンアルファ-2 a（R O F E R O N（登録商標）-A）、インターフェロンアルファ-2 b（I N T R O N（登録商標）-A）、およびペグインターフェロンアルファ-2 b（P E G I N T R O N（登録商標））が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0144】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、腫瘍溶解性ウイルス療法を含む。腫瘍溶解性ウイルス療法は、遺伝子修飾ウイルスを使用して、がん細胞内で複製して殺傷し、免疫応答を刺激する抗原（例えば、本開示の新抗原）の放出をもたらす。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原を発現する複製能力のある腫瘍溶解性ウイルスは、任意の天然に存在する（例えば、「フィールド源」からの）または修飾された複製能力のある腫瘍溶解性ウイルスを含む。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ウイルスは、腫瘍抗原を発現することに加えて、がん細胞に対するウイルスの選択性を増加するために修飾され得る。いくつかの実施形態では、複製能力のある腫瘍溶解性ウイルスには、ミオウイルス科、サイフォウイルス科、ポドウイルス科、テシビリダエ、コルチコウイルス科、プラズマウイルス科、リ

50

ポスリックスウイルス科、フセロウイルス科、ポキシイリドウイルス科、イリドウイルス科、フィコドナウイルス科、バキュロウイルス科、ヘルペスウイルス科、アドノウイルス科、パポーバウイルス科、ポリドナウイルス科、イノウイルス科、マイクロウイルス科、ジェミニウイルス科、サーコウイルス科、パルボウイルス科、ヘパドナウイルス科、レトロウイルス科、シクトウイルス科、レオウイルス科、ビルナウイルス科、パラミクソウイルス科、ラブドウイルス科、フィロウイルス科、オルトミクソウイルス科、ブニヤウイルス科、アレナウイルス科、レビウイルス科、ピコルナウイルス科、セキウイルス科、コモウイルス科、ポティウイルス科、カリシウイルス科、アストロウイルス科、ノダウイルス科、テトラウイルス科、トンバスウイルス科、コロナウイルス科、グラビウイルス科、トガウイルス科、およびバルナウイルス科のメンバーである腫瘍溶解性ウイルスが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、複製能力のある腫瘍溶解性ウイルスには、アデノウイルス、レトロウイルス、レオウイルス、ラブドウイルス、ニューカッスル病ウイルス（NDV）、ポリオーマウイルス、ワクシニアウイルス（VacV）、単純ヘルペスウイルス、ピコルナウイルス、コクサッキーウイルス、およびパルボウイルスが含まれる。いくつかの実施形態では、腫瘍抗原を発現する複製腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、ウイルスのがん選択性を増加するために、1つ以上の機能的遺伝子を欠くように操作され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、チミジンキナーゼ（TK）活性を欠くように操作される。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、ワクシニアウイルス成長因子（VGF）を欠くように操作され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、VFGおよびTKの両方の活性を欠くように操作され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、E3L、K3L、B18R、またはB8Rなどの宿主インターフェロン（IFN）応答の回避に関与する1つ以上の遺伝子を欠くように操作され得る。いくつかの実施形態では、複製腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、Western Reserve、Copenhagen、Lister、またはWyeth株であり、機能的なTK遺伝子を欠く。いくつかの実施形態では、腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、機能的なB18Rおよび／またはB8R遺伝子を欠く、Western Reserve、Copenhagen、Lister、またはWyeth株である。いくつかの実施形態では、組み合わせの腫瘍抗原を発現する複製腫瘍溶解性ワクシニアウイルスは、例えば、腫瘍内、腹腔内、静脈内、動脈内、筋肉内、皮内、頭蓋内、皮下、または鼻腔内投与を介して、対象に局所的または全身的に投与され得る。

10

20

30

【0145】

いくつかの実施形態では、がん免疫療法は、チェックポイント阻害剤を含む。当技術分野で既知であるように、チェックポイント阻害剤は、少なくとも1つの免疫チェックポイントタンパク質を標的とし、免疫応答の制御を変更し、例えば、免疫応答を下方調整または阻害する。免疫チェックポイントタンパク質には、例えば、CTLA4、PD-L1、PD-1、PD-L2、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、CEACAM、LAIR1、CD80、CD86、CD276、VTCN1、MHCクラスI、MHCクラスII、GALS、アデノシン、TGFR、CSF1R、MICA／B、アルギナーゼ、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、LAG-3、BTLA、IDO、OX40、およびA2aRが含まれる。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントの制御に関与する分子には、PD-1（CD279）、PD-L1（B7-H1、CD274）、PD-L2（B7-CD、CD273）、CTLA-4（CD152）、HVEM、BTLA（CD272）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、LAG-3（CD223）、TIM-3（HAVCR2）、CEACAM、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、GAL9、VISTA（PD-1H）、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4、TGFRベータ、A2AR、GITR（CD357）、CD

40

50

80 (B7-1)、CD86 (B7-2)、CD276 (B7-H3)、VTCNI (B7-H4)、MHCクラスI、MHCクラスII、GALS、アデノシン、TGFR、B7-H1、OX40 (CD134)、CD94 (KLRD1)、CD137 (4-1BB)、CD137L (4-1BBL)、CD40、IDO、CSF1R、CD40L、CD47、CD70 (CD27L)、CD226、HLA2、ICOS (CD278)、ICOSL (CD275)、LIGHT (TNFSF14、CD258)、NKG2a、NKG2d、OX40L (CD134L)、PVR (NECL5、CD155)、SIRPα、MICA/B、および／またはアルギナーゼが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、例えば、T細胞活性化および／または抗がん免疫応答を増強するために、免疫細胞機能を負に制御するチェックポイントタンパク質の活性を減少させ、他の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、例えば、T細胞活性化および／または抗がん免疫応答を増強するために、免疫細胞機能を正に制御するチェックポイントタンパク質の活性を増加させる。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、抗体である。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、抗体である。チェックポイント阻害剤の例には、PD-L1軸結合アンタゴニスト（例えば、抗PD-L1抗体、例えば、アテゾリズマブ (MPDL3280A)）、共阻害分子に指向するアンタゴニスト（例えば、CTLA4アンタゴニスト（例えば、抗CTLA4抗体））、TIM-3アンタゴニスト（例えば、抗TIM-3抗体）、もしくはLAG-3アンタゴニスト（例えば、抗LAG-3抗体）、またはそれらの任意の組み合わせが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、低分子、リガンドまたは受容体の組換え型などの薬物を含み、または特に、ヒト抗体などの抗体である（例えば、国際特許公開第2015016718号、Pardoll, Nat Rev Cancer, 12 (4): 252-64, 2012を参照されたく、両方が参照により本明細書に組み込まれる）。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイントタンパク質またはその類似体の既知の阻害剤を使用することができ、特に、キメラ化、ヒト化、またはヒト型の抗体を使用することができる。

10

20

30

40

50

【0146】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、PD-L1軸結合アンタゴニスト、例えば、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト、またはPD-L2結合アンタゴニストである。PD-1（プログラム死1）は、当技術分野では「プログラム細胞死1」、「PDCD1」、「CD279」、および「SLEB2」とも称される。例示的なヒトPD-1は、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q15116に示される。PD-L1（プログラム死リガンド1）は、当技術分野では「プログラム細胞死1リガンド1」、「PDCD1LG1」、「CD274」、「B7-H」、および「PDL1」とも称される。例示的なヒトPD-L1は、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q9NZQ7.1に示される。PD-L2（プログラム死リガンド2）は、当技術分野では「プログラム細胞死1リガンド2」、「PDCD1LG2」、「CD273」、「B7-DC」、「Btdc」、および「PDL2」とも称される。例示的なヒトPD-L2は、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q9BQ51に示される。いくつかの事例では、PD-1、PD-L1、およびPD-L2は、ヒトPD-1、PD-L1、およびPD-L2である。

【0147】

いくつかの事例では、PD-1結合アンタゴニストは、PD-1のそのリガンド結合パートナーとの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-1リガンド結合パートナーは、PD-L1および／またはPD-L2である。別の事例では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1のその結合リガンドとの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-L1結合パートナーは、PD-1および／またはB7-1である。別の事例では、PD-L2結合アンタゴニストは、PD-L2のそのリガンド結合パートナーとの結合を阻害する分子である。特定の態様では、PD-L2結合リガンドパートナーは、PD-1である。アンタゴニストは、抗体、その抗原結合断片、免疫アドヘシン、融合

タンパク質、またはオリゴペプチドであり得る。いくつかの実施形態では、PD-1 結合アンタゴニストは、低分子、核酸、ポリペプチド（例えば、抗体）、炭水化物、脂質、金属、または毒素である。

【0148】

いくつかの事例では、PD-1 結合アンタゴニストは、例えば、以下に記載されるような、抗PD-1 抗体（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体）である。いくつかの事例では、抗PD-1 抗体は、MDX-1 106（ニボルマブ）、MK-3475（ペムブロリズマブ）、MEDI-0680（AMP-514）、PDR001、REGN2810、MGA-012、JNJ-63723283、BI 754091、およびBGB-108からなる群から選択される。MDX-1 106-04、ONO-4538、BMS-936558、またはニボルマブとしても知られるMDX-1 106は、WO2006/121168に記載されている抗PD-1 抗体である。ペムブロリズマブまたはランブロリズマブとしても知られるMK-3475は、WO2009/114335に記載されている抗PD-1 抗体である。いくつかの事例では、PD-1 結合アンタゴニストは、免疫アドヘシン（例えば、定常領域（例えば、免疫グロブリン配列のFc領域）と融合されたPD-L1またはPD-L2の細胞外またはPD-1 結合部分を含む免疫アドヘシンである。いくつかの事例では、PD-1 結合アンタゴニストは、AMP-224である。B7-DCIgとしても知られるAMP-224は、WO2010/027827およびWO2011/066342に記載されているPD-L2-Fc融合可溶性受容体である。

【0149】

いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、抗PD-1 抗体は、ニボルマブ（CAS登録番号：946414-94-4）である。ニボルマブ（Bristol-Myers Squibb/Ono）は、MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558、およびOPDIVO（登録商標）としても知られており、WO2006/121168に記載されている抗PD-1 抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1 抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

【0150】

(a) 重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有し、

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQA
PGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLF
LQMNSLRAEDTAVYYCATND D YWGQGT LVT VSSASTKGPS
VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DH
KPSNTKVDKRVESKYGP P C P C P A P E F L G G P S V F L F P P K P
KDTLMISRTP EVTCVVVDV S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A
KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL
LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLY
SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG（
配列番号1）、

【0151】

(b) 軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有する：

【0152】

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A R F S G S G S G T D F T L T I S S L E
P E D F A V Y Y C Q Q S S N W P R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P
P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S
Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q
G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号2)。

【0153】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号1および配列番号2からの6つのHVR配列を含む(例えば、配列番号1からの3つの重鎖HVRおよび配列番号2からの3つの軽鎖HVR)。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号1からの重鎖可変ドメインおよび配列番号2からの軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0154】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ペムブロリズマブ(CAS登録番号: 1374853-91-4)である。ペムブロリズマブ(Merck)は、MK-3475、Merck 3475、ランブロリズマブ、KEYTRUDA(登録商標)、およびSCH-900475としても知られており、WO2009/114335に記載されている抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

(a) 重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有し、

20

Q V Q L V Q S G V E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y Y M Y W V R Q A
P G Q G L E W M G G I N P S N G G T N F N E K F K N R V T L T T D S S T T T A
Y M E L K S L Q F D D T A V Y Y C A R R D Y R F D M G F D Y W G Q G T T V T V S
S A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V
S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K
T Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P P C P A P E F L G G P S
V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V
D G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y
K C K V S N K G L P S S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S Q E E M T
K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D
S D G S F F L Y S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K
S L S L S L G (配列番号3)

30

(b) 軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有する:

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T L S C R A S K G V S T S G Y S Y L H W Y
Q Q K P G Q A P R L L I Y L A S Y L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S
S L E P E D F A V Y Y C Q H S R D L P L T F G G G T K V E I K R T V A A P S V F
I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V
T H Q G L S S P V T K S F N R G E C (配列番号4)。

40

【0155】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号3および配列番号4からの6つのHVR配列を含む(例えば、配列番号3からの3つの重鎖HVRおよび配列番号4からの3つの軽鎖HVR)。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、配列番号3からの重鎖可変ドメインおよび配列番号4からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0156】

50

抗PD-1抗体の他の例には、MEDI-0680 (AMP-514; AstraZeneca)、PDR001 (CAS登録番号1859072-53-9; Novartis)、REGN2810 (LIBTAYO (登録商標) またはセミプリマブ-rwlc; Regeneron)、BGB-108 (BeiGene)、BGB-A317 (BeiGene)、BI 754091、JS-001 (Shanghai Junshi)、STI-A1110 (Sorrento)、INCSHR-1210 (Incyte)、PF-06801591 (Pfizer)、TSR-042 (ANB011としても知られている; Tesaro/AnaptysBio)、AM0001 (ARMO Biosciences)、ENUM 244C8 (Enumeral Biomedical Holdings)、ENUM 388D4 (Enumeral Biomedical Holdings) が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、チスレリズマブ (BGB-A317)、BGB-108、STI-A1110、AM0001、BI 754091、シンチリマブ (IBI308)、セトレリマブ (JNJ-63723283)、トリパリマブ (JS-001)、カムレリズマブ (SHR-1210、INCSHR-1210、HR-301210)、MEDI-0680 (AMP-514)、MGA-012 (INCMGA 0012)、ニボルマブ (BMS-936558、MDX1106、ONO-4538)、スパルタリズマブ (PDR001)、ペムブロリズマブ (MK-3475、SCH 900475)、PF-06801591、セミプリマブ (REGN-2810、REGEN2810)、ドスタリマブ (TSR-042、ANB011)、FITC-YT-16 (PD-1結合ペプチド)、APL-501もしくはCBT-501もしくはジェノリムズマブ (GB-226)、AB-122、AK105、AMG 404、BCD-100、F520、HLX10、HX008、JTX-4014、LZM009、Sym021、PSB205、AMP-224 (PD-1を標的とする融合タンパク質)、CX-188 (PD-1プロボディ)、AGEN-2034、GLS-010、ブディガリマブ (ABBV-181)、AK-103、BAT-1306、CS-1003、AM-0001、TILT-123、BH-2922、BH-2941、BH-2950、ENUM-244C8、ENUM-388D4、HAB-21、HEISCOI 11-003、IKT-202、MCLA-134、MT-17000、PEGMP-7、PRS-332、RXI-762、STI-1110、VXM-10、XmAb-23104、AK-112、HLX-20、SSI-361、AT-16201、SNA-01、AB122、PD1-PIK、PF-06936308、RG-7769、CAB PD-1 Abs、AK-123、MEDI-3387、MEDI-5771、4H1128Z-E27、REMD-288、SG-001、BY-24.3、CB-201、IBI-319、ONCR-177、Max-1、CS-4100、JBI-426、CCC-0701、CCX-4503、またはそれらの誘導体を含む。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、ペプチドまたは低分子化合物である。いくつかの実施形態では、PD-1結合アンタゴニストは、AUNP-12 (Pierre Fabre/Aurigene) である。いくつかの実施形態では、PD-1軸結合アンタゴニストは、Guzik et al., Molecules (2019) May 30; 24 (11) に記載されている、低分子PD-1軸結合アンタゴニストを含む。本明細書で提供される方法で使用するための他のPD-1阻害剤は、米国特許第8,735,553号、同第8,354,509号、および同第8,008,449号に記載されているように当技術分野で既知である。

【0157】

いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-1を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、PD-L1およびVISTAまたはPD-L1およびTIM3を阻害する低分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、CA-170 (AUPM-170としても知られている) である。本明細書のいずれかの事例では、単離抗PD-L1抗

10

20

30

40

50

体は、ヒトPD-L1、例えば、UniProtKB/Swiss-Prot受入番号Q9NZQ7.1に示されているヒトPD-L1、またはそのバリエーションと結合することができる。いくつかの実施形態では、PD-L1結合アンタゴニストは、低分子、核酸、ポリペプチド（例えば、抗体）、炭水化物、脂質、金属、または毒素である。

【0158】

いくつかの事例では、PD-L1結合アンタゴニストは、例えば、以下に記載されるような、抗PD-L1抗体である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、PD-L1とPD-1との間、および／またはPD-L1とB7-1との間の結合を阻害することが可能である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、および（Fab'）2断片からなる群から選択される抗体断片である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、ヒト抗体である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、ヒト抗体である。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体は、YW243.55.S70、MPDL3280A（アテゾリズマブ）、MDX-1105、およびMEDI4736（デュルバルマブ）、およびMSB0010718C（アベルマブ）からなる群から選択される。抗体YW243.55.S70は、WO2010/077634に記載されている抗PD-L1である。MDX-1105は、BMS-936559としても知られており、WO2007/005874に記載されている抗PD-L1抗体である。MEDI4736（デュルバルマブ）は、WO2011/066389およびUS2013/034559に記載されている抗PD-L1モノクローナル抗体である。本開示の方法に有用な抗PD-L1抗体の例、およびその製造方法は、PCT特許出願第WO2010/077634号、WO2007/005874、WO2011/066389、米国特許第8,217,149号、およびUS2013/034559に記載されている。いくつかの実施形態では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、アテゾリズマブ、アベルマブ、デュルバルマブ（imfinzi）、BGB-A333、SHR-1316（HTI-1088）、CK-301、BMS-936559、エンバフォリマブ（KN035、ASC22）、CS1001、MDX-1105（BMS-936559）、LY3300054、STI-A1014、FAZ053、CX-072、INCB086550、GNS-1480、CA-170、CK-301、M-7824、HTI-1088（HTI-131、SHR-1316）、MSB-2311、AK-106、AVA-004、BB-1081、CA-327、CBA-0710、CBT-502、FPT-155、IKT-201、IKT-703、10-103、JS-003、KD-033、KY-1003、MCLA-145、MT-5050、SNA-02、BCD-135、APL-502（CBT-402またはTQB2450）、IMC-001、KD-045、INBRX-105、KN-046、IMC-2102、IMC-2101、KD-005、IMM-2502、89Zr-CX-072、89Zr-DFO-6E11、KY-1055、MEDI-1109、MT-5594、SL-279252、DSP-106、Gensci-047、REMD-290、N-809、PRS-344、FS-222、GEN-1046、BH-29xx、FS-118、またはそれらの誘導体を含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、

(a) 重鎖可変領域は、それぞれ、GFTFSDSWIH（配列番号5）、AWISPYGGSTYYADSVKG（配列番号6）、およびRHWPGGFDY（配列番号7）のHVR-H1、HVR-H2、およびHVR-H3配列を含み、

(b) 軽鎖可変領域は、それぞれ、RASQDVSTAVA（配列番号8）、SASFLYS（配列番号9）、およびQQYLYHPAT（配列番号10）のHVR-L1、HVR-L2、およびHVR-L3配列を含む。

【0160】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブおよびTECENTRI

Q（登録商標）（CAS登録番号：1422185-06-5）としても知られている、MPDL3280Aである。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

（a）重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有し、EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSS（配列番号11）、

10

（b）軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有する：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF L YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGGTKVEIKR（配列番号12）。

【0161】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

（a）重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有し、EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEHALHNHYTQKSLSLSPG（配列番号13）、

20

（b）軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有する：DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF L YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC（配列番号14）。

30

40

【0162】

いくつかの事例では、重鎖および軽鎖配列を含む単離抗PD-L1抗体が提供され、軽鎖配列は、配列番号14のアミノ酸配列と少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、少なくとも90%、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%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。いくつかの事例では、重鎖および軽鎖配列を含む単離抗PD-L1抗体が

50

提供され、重鎖配列は、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、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 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。いくつかの事例では、重鎖および軽鎖配列を含む単離抗 P D - L 1 抗体が提供され、軽鎖配列は、配列番号 14 のアミノ酸配列と少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、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 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有し、重鎖配列は、配列番号 13 のアミノ酸配列と少なくとも 85 %、少なくとも 86 %、少なくとも 87 %、少なくとも 88 %、少なくとも 89 %、少なくとも 90 %、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 %、または少なくとも 99 % の配列同一性を有する。

10

【0163】

さらに特定の態様では、抗体は、ヒトまたはマウスの定常領域をさらに含む。さらに別の態様では、ヒト定常領域は、lg G 1、lg G 2、lg G 2、lg G 3、および lg G 4 からなる群から選択される。さらに特定の態様では、ヒト定常領域は、lg G 1 である。さらに別の態様では、マウス定常領域は、lg G 1、lg G 2 A、lg G 2 B、および lg G 3 からなる群から選択される。さらに別の態様では、マウス定常領域は、lg G 2 A である。さらに特定の態様では、抗体は、低減した、または最小限のエフェクタ機能を有する。さらに特定の態様では、最小限のエフェクタ機能は、「エフェクタ低下 Fc 変異」またはグリコシル化に起因する。さらに別の事例では、エフェクタ低下 Fc 変異は、定常領域における N 297 A または D 265 A / N 297 A 置換である。

20

【0164】

いくつかの事例では、単離抗 P D - L 1 抗体は、非グリコシル化されている。抗体のグリコシル化は、典型的に、N 結合型または O 結合型のいずれかである。N 結合型とは、アスパラギン残基の側鎖との炭水化物部分の結合を指す。X がプロリン以外の任意のアミノ酸である、トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン、アスパラギン側鎖との炭水化物部分の酵素的結合の認識配列である。したがって、ポリペプチドにおいてこれらのトリペプチド配列のいずれかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作製される。O 結合型グリコシル化とは、糖 N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの 1 つがヒドロキシアミノ酸、最も典型的にはセリンまたはスレオニンと結合することを指すが、5-ヒドロキシプロリンまたは 5-ヒドロキシリジンも使用され得る。抗体からのグリコシル化部位の除去は、上述のトリペプチド配列（N 結合型グリコシル化部位の場合）のうちの 1 つが除去されるようにアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成される。変更は、グリコシル化部位内のアスパラギン、セリン、またはスレオニン残基を別のアミノ酸残基で置換することによって行うことができる（例えば、グリシン、アラニンまたは保存的置換）。

30

【0165】

いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、アベルマブ（C A S 登録番号：1537032-82-8）である。M S B 0010718 C としても知られるアベルマブは、ヒトモノクローナル I g G 1 抗 P D L 1 抗体（M e r c k K G a A, P f i z e r）である。いくつかの実施形態では、抗 P D L 1 抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

40

【0166】

(a) 重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、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 100 % の配列同一性を有し、E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F

50

T F S S Y I M M W V R Q A P G K G L E W V S S I Y P S G G I T F Y A D T V K G R
F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R I K L G T V T T V
D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C
L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S
V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H
T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V
D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R
E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号15)、

10

【0167】

(b) 軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有する：Q S A L T Q P A S V S G S P G Q S I T I S C T G T S
S D V G G Y N Y V S W Y Q Q H P G K A P K L M I Y D V S N R P S G V S N R F S G
S K S G N T A S L T I S G L Q A E D E A D Y Y C S S Y T S S S T R V F G T G T K
V T V L G Q P K A N P T V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G
A V T V A W K A D G S P V K A G V E T T K P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P
E Q W K S H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S (配列番号16)。

20

【0168】

いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号15および配列番号16からの6つのHVR配列を含む(例えば、配列番号15からの3つの重鎖HVRおよび配列番号16からの3つの軽鎖HVR)。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、配列番号15からの重鎖可変ドメインおよび配列番号16からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、デュルバルマブ(CAS登録番号：1428935-60-7)である。MED14736としても知られるデュルバルマブは、WO2011/066389およびUS2013/034559に記載されている、Fc最適化ヒトモノクローナルIgG1カッパ抗PDL1抗体(MedImmune, AstraZeneca)である。いくつかの実施形態では、抗PDL1抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

30

(a) 重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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100%の配列同一性を有し、E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F
T F S R Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y V D S V K G R
F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R E G G W F G E L A
F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G
C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S
S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T
H T C P P C P A P E F E G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V
V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P
R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S
N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G (配列番号17)、

40

(b) 軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも85%、少なくとも90%、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%、

50

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 100% の配列同一性を有する：EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号 18)。

【0170】

いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、配列番号 17 および配列番号 18 からの 6 つの HVR 配列を含む (例えば、配列番号 17 からの 3 つの重鎖 HVR および配列番号 18 からの 3 つの軽鎖 HVR)。いくつかの実施形態では、抗 PDL1 抗体は、配列番号 17 からの重鎖可変ドメインおよび配列番号 18 からの軽鎖可変ドメインを含む。

10

【0171】

抗 PD-L1 抗体の他の例には、MDX-1105 (BMS-936559; Bristol Myers Squibb)、LY3300054 (Eli Lilly)、STI-A1014 (Sorrento)、KN035 (Suzhou Alphamab)、FAZ053 (Novartis)、または CX-072 (CytomX Therapeutics) が含まれるが、これらに限定されない。

【0172】

いくつかの実施形態では、PD-L1 軸結合アンタゴニストは、低分子 PD-L1 軸結合アンタゴニスト GS-4224 を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 軸結合アンタゴニストは、PCT/US2019/017721 に記載されている、低分子 PD-L1 軸結合アンタゴニストを含む。

20

【0173】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、hBAT、hBAT-1、またはピジリズマブとしても知られており、WO2009/101611 に記載されている抗体である、CT-011 である。

【0174】

いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、CTLA4 のアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、CTLA4 の低分子アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、チェックポイント阻害剤は、抗 CTLA4 抗体である。CTLA4 は、T 細胞の活性化、特に CD28 依存性 T 細胞応答を負に制御するように作用する、免疫チェックポイント分子の CD28-B7 免疫グロブリンスーパーファミリーの一部である。CTLA4 は、CD80 (B7-1) および CD86 (B7-2) などの一般的なリガンドとの結合を CD28 と競合し、CD28 よりも高い親和性でこれらのリガンドと結合する。CTLA4 活性を遮断すること (例えば、抗 CTLA4 抗体を使用する) は、CD28 を介した共刺激を増強し (T 細胞の活性化/プライミングの増加につながる)、T 細胞発達に影響を及ぼし、および/または Treg (腫瘍内 Treg など) を枯渇させると考えられている。いくつかの実施形態では、CTLA4 アンタゴニストは、低分子、核酸、ポリペプチド (例えば、抗体)、炭水化物、脂質、金属、または毒素である。

30

【0175】

いくつかの実施形態では、いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体は、イピリムマブ (YERVOY (登録商標); CAS 登録番号: 477202-00-9) である。イピリムマブは、BMS-734016、MDX-010、および MDX-101 としても知られており、WO2001/14424 に記載されている完全ヒトモノクローナル IgG1 カップ抗 CTLA4 抗体 (Bristol-Myers Squibb) である。いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体は、重鎖および軽鎖配列を含み、

40

(a) 重鎖配列は、以下の重鎖配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、

50

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 100% の配列同一性を有し、

Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G F T F S S Y T M H W V R Q A
P G K G L E W V T F I S Y D G N N K Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
L Q M N S L R A E D T A I Y Y C A R T G W L G P F D Y W G Q G T L V T V S S (配
列番号 19)、

(b) 軽鎖配列は、以下の軽鎖配列と少なくとも 85%、少なくとも 90%、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 100% の配列同一性を有する：

E I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V G S S Y L A W Y Q Q K
P G Q A P R L L I Y G A F S R A T G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E
P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P W T F G Q G T K V E I K (配列番号 20)。

【0176】

いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体は、配列番号 19 および配列番号 20 から
の 6 つの HVR 配列を含む (例えば、配列番号 19 からの 3 つの重鎖 HVR および配列番
号 20 からの 3 つの軽鎖 HVR)。いくつかの実施形態では、抗 CTLA4 抗体は、配列
番号 19 からの重鎖可変ドメインおよび配列番号 20 からの軽鎖可変ドメインを含む。

【0177】

抗 CTLA4 抗体の他の例には、APL-509、AGEN1884、および CS1002
が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害
剤には、イピリムマブ (IBI310、BMS-734016、MDX010、MDX-
CTLA4、MEDI4736)、トレメリムマブ (CP-675、CP-675, 206)、
APL-509、AGEN1884、および CS1002、AGEN1181、ア
バタセプト (オレンシア、BMS-188667、RG2077)、BCD-145、O
NC-392、ADU-1604、REGN4659、ADG116、KN044、KN
046、またはそれらの誘導体が含まれる。

【0178】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、LAG-3 阻害剤 (例えば
、抗体、抗体複合体、またはそれらの抗原結合断片) を含む。いくつかの実施形態では、
LAG-3 阻害剤は、低分子、核酸、ポリペプチド (例えば、抗体)、炭水化物、脂質、
金属、または毒素を含む。いくつかの実施形態では、LAG-3 阻害剤は、低分子を含む。
いくつかの実施形態では、LAG-3 阻害剤は、LAG-3 結合剤を含む。いくつかの
実施形態では、LAG-3 阻害剤は、抗体、抗体複合体、またはそれらの抗原結合断片を
含む。いくつかの実施形態では、LAG-3 阻害剤には、エフチラギモドアルファ (IM
P321、IMP-321、EDDP-202、EOC-202)、レマトリマブ (BM
S-986016)、GSK2831781 (IMP-731)、LAG525 (IMP
701)、TSR-033、EVIP321 (可溶性 LAG-3 タンパク質)、BI 7
54111、IMP761、REGN3767、MK-4280、MGD-013、Xm
Ab22841、INCAGN-2385、ENUM-006、AVA-017、AM-
0003、iOncitura 抗 LAG-3 抗体、Arcus Biosciences
LAG-3 抗体、Sym022、それらの誘導体、または前述のもののうちのいずれかと
競合する抗体が含まれる。

【0179】

いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は、一価および／または単一特
異性である。いくつかの実施形態では、免疫チェックポイント阻害剤は多価および／また
は多重特異性である。

【0180】

いくつかの実施形態では、免疫療法は、免疫調節分子またはサイトカインを含む。免疫
制御性プロファイルは、効率的な免疫応答を誘発し、対象における免疫のバランスをとる

10

20

30

40

50

ために必要である。いくつかの実施形態では、免疫制御性分子は、本明細書に詳述される治療のうちのいずれかに含まれる。好適な免疫制御性サイトカインの例には、インターフェロン（例えば、 $IFN\alpha$ 、 $IFN\beta$ 、および $IFN\gamma$ ）、インターロイキン（例えば、 $IL-1$ 、 $IL-2$ 、 $IL-3$ 、 $IL-4$ 、 $IL-5$ 、 $IL-6$ 、 $IL-7$ 、 $IL-8$ 、 $IL-9$ 、 $IL-10$ 、 $IL-12$ 、および $IL-20$ ）、腫瘍壊死因子（例えば、 $TNF\alpha$ および $TNF\beta$ ）、エリスロポエチン（ EPO ）、 $FLT-3$ リガンド、 $gIp10$ 、 $TCA-3$ 、 $MCP-1$ 、 MIF 、 $MIP-1\alpha$ 、 $MIP-1\beta$ 、ランテス、マクロファージコロニー刺激因子（ $M-CSF$ ）、顆粒球コロニー刺激因子（ $G-CSF$ ）、および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（ $GM-CSF$ ）、ならびにそれらの機能的断片が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ケモカイン受容体、すなわち、 CXC 、 CC 、 C 、または $CX3C$ ケモカイン受容体と結合する任意の免疫制御性ケモカインが、本発明の文脈で使用され得る。ケモカインの例には、 $MIP-3\alpha$ （ Lax ）、 $MIP-3\beta$ 、 $Hcc-1$ 、 $MPIF-1$ 、 $MPIF-2$ 、 $MCP-2$ 、 $MCP-3$ 、 $MCP-4$ 、 $MCP-5$ 、エオタキシン、 $Tarc$ 、 Elc 、 $I309$ 、 $IL-8$ 、 $GCP-2$ $G\alpha$ 、 $G\beta$ 、 $Nap-2$ 、 $Ena-78$ 、 $Ip-10$ 、 MIG 、 $I-Tac$ 、 $SDF-1$ 、および $BCA-1$ （ Blc ）、ならびにそれらの機能的断片が含まれるが、これらに限定されない。

【0181】

本明細書に記載の方法（例えば、がん免疫療法）で利用される組成物は、例えば、静脈内、筋肉内、皮下、皮内、経皮的、動脈内、腹腔内、病変内、頭蓋内、関節内、前立腺内、胸膜内、気管内、髄腔内、鼻腔内、膈内、直腸内、局所、腫瘍内、腹膜、結膜下、小胞内、粘膜、心膜内、臍内、眼内、眼窩内、経口、局所、経皮、硝子体内（例えば、硝子体内注入による）、点眼、吸入、注射、移植、注入、持続注入、直接的に標的細胞を浸漬する局所灌流、カテーテル、洗浄、クリーム、または脂質組成物を含む任意の好適な方法によって投与することができる。本明細書に記載の方法で利用される組成物はまた、全身的または局所的に投与することができる。投与方法は、様々な要因（例えば、投与される化合物または組成物、ならびに治療される状態、疾患、または障害の重症度）に応じて変化し得る。いくつかの事例では、チェックポイント阻害剤は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植、吸入、髄腔内、脳室内、または鼻腔内に投与される。投薬は、投与が短時間であるか慢性であるかに部分的に応じて、任意の好適な経路、例えば、静脈内注入または皮下注入などの注入によって行うことができる。本明細書では、様々な時点にわたる単回または複数回の投与、ボラス投与、およびパルス注入を含むがこれらに限定されない、様々な投薬スケジュールが含まれる。

【0182】

本明細書に記載のがん免疫療法（例えば、抗体、結合ポリペプチド、および／または低分子）（任意の追加の治療剤）は、良好な医療行為と一致する様式で製剤化、投薬、および投与され得る。この文脈で考慮すべき要因には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与のスケジュール、および医師に既知である他の要因が含まれる。治療剤は、必要ではないが、任意に、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤と同時に製剤化および／または投与される。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中に存在するチェックポイント阻害剤の量、障害または治療の種類、および上で考察された他の要因に依存する。これらは、概して、本明細書に記載されるのと同じ投薬量で、および投与経路で、または本明細書に記載の約1～99%の投与量で、または経験的／臨床的に適切であると決定される任意の投与量および任意の経路で使用される。

【0183】

この療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって簡単にモニターされる。例えば、一般的な提案として、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、ヒトに投与されるPD-L1軸結合アンタゴニスト抗体、抗CTLA-4抗体、抗TIM-3抗体、または抗LAG-3抗体の治療有効量は、1回以上の投与によるかにかかわらず、患者の体重の約0.

0.1～約50 mg/kgの範囲にあるであろう。いくつかの事例では、使用される抗体は、例えば、毎日、毎週、2週間ごと、3週間ごと、または毎月、約0.01 mg/kg～約45 mg/kg、約0.01 mg/kg～約40 mg/kg、約0.01 mg/kg～約35 mg/kg、約0.01 mg/kg～約30 mg/kg、約0.01 mg/kg～約25 mg/kg、約0.01 mg/kg～約20 mg/kg、約0.01 mg/kg～約15 mg/kg、約0.01 mg/kg～約10 mg/kg、約0.01 mg/kg～約5 mg/kg、または約0.01 mg/kg～約1 mg/kgで投与される。いくつかの事例では、抗体は、15 mg/kgで投与される。しかしながら、他の投薬レジメンが有用であり得る。一事例では、本明細書に記載の抗PD-L1抗体は、21日サイクルの1日目（3週間ごと、q3w）に約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mg、約1400 mg、約1500 mg、約1600 mg、約1700 mg、または約1800 mgの用量でヒトに投与される。いくつかの事例では、抗PD-L1抗体MPDL3280Aは、1200 mgを3週間ごと（q3w）に静脈内投与される。用量は、注入などで、単回用量として、または複数回用量（例えば、2回または3回用量）として投与され得る。併用治療において投与される抗体の用量は、単一治療と比較して低減され得る。この療法の進行は、従来の技術によって簡単にモニターされる。

10

【0184】

いくつかの実施形態では、方法はさらに、有効量の追加の治療剤を患者に投与することを伴う。いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、外科手術、放射線療法、化学療法、抗血管新生療法、抗DNA修復療法、および抗炎症療法のうちの1つ以上を含む。いくつかの事例では、追加の治療剤は、抗腫瘍剤、化学療法剤、成長阻害剤、抗血管新生剤、放射線療法、細胞毒性剤、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。いくつかの事例では、がん免疫療法は、化学療法または化学療法剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの実施形態では、化学療法または化学療法剤は、プラチナ系薬剤（シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、およびスタラプラチンを含むが、これらに限定されない）である。いくつかの事例では、がん免疫療法は、放射線療法剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、がん免疫療法は、標的療法または標的療法剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、がん免疫療法は、別の免疫療法または免疫療法剤、例えばモノクローナル抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、追加の治療剤は、共刺激分子に指向するアゴニストである。いくつかの事例では、追加の治療剤は、共阻害分子に指向するアンタゴニストである。いくつかの事例では、がん免疫療法は、単剤療法として投与される。

20

30

【0185】

化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えば、チオテパおよびシクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えば、ブスルファン、インプロスルファン、およびピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドーパ、カルボコン、メチュレドーパ、およびウレドパ；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチルオロメラミンを含む、エチレンイミンならびにメチルアメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビゼレシン合成類似体を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、KW-2189およびCB1-TM1を含む）；エリュテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジタチン；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロマファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンハイドロクロライド、メルファラン、ノベンピチン、フェネスチリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、およびウラシルマスタード；ニトロソウレア、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロム

40

50

スチン、ニムスチン、およびラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特にカリケアマイシガンマルおよびカリケアマイシンオメガル）；ダイネミシンAを含むダイネミシン；ビスホスホネート、例えば、クロドロネート；エスペラミシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素タンパク質エンジン抗生物質発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オートラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、6-ジアゾ-5-オキソ-1-ノルロイシン、ドキシソルビシン（モルフォリノードキシソルビシン、シアノモルフォリノードキシソルビシン、2-ピロリノードキシソルビシンおよびデオキシドキシソルビシンを含む）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルビシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、およびゾルビシン；代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）；葉酸類似体、例えば、デノプテリン、プテロプテリン、およびトリメトトレキサート；プリン類似体、例えば、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、およびチオグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、およびフロクスウリジン；アンドロゲン、例えば、カルステロン、ドロスタノロンプロピオネート、エピチオスタノール、メピチオスタン、およびテストトラクトン；抗副腎剤、例えば、ミトタンおよびトリロスタン；葉酸補充剤、例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミド配糖体；アミノレブリン酸；エニルラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジクオン；エフロルニチン；エリプチニウムアセテート；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン；マイタンシノイド、例えば、マイタンシンおよびアンサミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モビダンモール；ニトラエリン；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；PSK多糖複合体；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特にT-2トキシン、ベラクリンA、ロリジンA、アンギジン）；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド（「Arac」）；シクロホスファミド；タキソイド、例えば、パクリタキセルおよびドセタキセルゲムシタビン；6-チオグアニン；メルカプトプリン；白金配位錯体、例えば、シスプラチン、オキサリプラチン、およびカルボプラチン；ピンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；ピンクリスチン；ピノレルビン；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロネート；イリノテカン（例えば、CPT-11）；トポイソメラーゼ阻害剤RFS2000；ジフルオロメチルヒロミチン（DMFO）；レチノイド、例えば、レチノイン酸；カペシタビン；カルボプラチン、プロカルバジン、プリコマイシン、ゲムシタビエン、ナベルビン、ファメシルタンパク質タンスフェラーゼ阻害剤、トランス白金、および上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸、または誘導体が含まれる。

【0186】

本開示と組み合わせることができる化学療法薬のいくつかの（非限定的な）例は、カルボプラチン（パラプラチン）、シスプラチン（プラチノール、プラチノール-AQ）、シクロホスファミド（シトキサン、ネオサール）、ドセタキセル（タキソテール）、ドキシソルビシン（アドリアマイシン）、エルロチニブ（タルセバ）、エトポシド（ベペシド）、フルオロウラシル（5-FU）、ゲムシタビン（ジェムザール）、イマチニブメシレート（グリベック）、イリノテカン（カンプトサル）、メトトレキサート（フォレックス、

メキサート、アメトブテリン)、パクリタキセル(タキソール、アブラキサン)、ソラフェニブ(ネクサバル)、スニチニブ(スーテント)、トポテカン(ハイカムチン)、ビンクリスチン(オンコビン、ビンカサルPFS)、およびビンブラスチン(ベルバン)である。がん細胞の成長および生存は、キナーゼ活性の調節解除と密接に関連しているため、補完的ながん療法の潜在的な標的の別の大きい群にはキナーゼ阻害剤が含まれる。正常なキナーゼ活性を回復し、それにより腫瘍増殖を低減させるために、広範囲の阻害剤が使用される。標的キナーゼの群には、受容体チロシンキナーゼ、例えば、BCR-ABL、B-Raf、EGFR、HER-2/ErbbB2、IGF-IR、PDGFR- α 、PDGFR- β 、cKit、Flt-4、Flt3、FGFR1、FGFR3、FGFR4、CSF1R、c-Met、RON、c-Ret、ALK、細胞質チロシンキナーゼ、例えば、c-SRC、c-YES、Abl、JAK-2、セリン/スレオニンキナーゼ、例えば、ATM、オーロラA&B、CDK、mTOR、PKCi、PLK、b-Raf、S6K、STK11/LKB1、および脂質キナーゼ、例えば、PI3K、SKIが含まれる。低分子キナーゼ阻害剤は、例えば、PHA-739358、ニロチニブ、ダサチニブ、およびPD166326、NSC 743411、ラパチニブ(GW-572016)、カネルチニブ(CI-1033)、セマキシニブ(SU5416)、バタラニブ(PTK787/ZK222584)、スーテント(SU11248)、ソラフェニブ(BAY 43-9006)およびレフルノミド(SU101)である。詳細については、例えば、Zhang et al. 2009: Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. Nature Reviews Cancer 9, 28-39を参照されたい。低分子標的療法は、概して、がん細胞内の変異、過剰発現、またはその他の重要なタンパク質の酵素ドメインの阻害剤である。著名で非限定的な例は、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブ(グリベック/グリベック)およびゲフィチニブ(イレッサ)である。

10

20

30

40

50

【0187】

いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、抗血管新生療法を含む。血管新生阻害剤は、腫瘍が生き残るために必要な血管の広範な成長(血管新生)を防止する。腫瘍細胞が増加する栄養素および酸素を満たすために促進される血管新生は、例えば、様々な分子を標的にすることで遮断され得る。本発明と組み合わせることができる血管新生媒介分子または血管新生阻害剤の非限定的な例は、可溶性VEGF(VEGFアイソフォームVEGF121およびVEGF165、受容体VEGFR1、VEGFR2および補助受容体ニューロピリン-1およびニューロピリン-2)1およびNRP-1、アンジオポエチン2、TSP-1およびTSP-2、アンジオスタチンおよび関連分子、エンドスタチン、バソスタチン、カルレチキュリン、血小板第4因子、TIMPおよびCDAI、Meth-1およびMeth-2、IFN α 、 β 、および γ 、CXCL10、IL-4、 γ -12、および γ -18、プロトロンビン(クリングルドメイン-2)、アンチトロンビンIIフラグメント、プロラクチン、VEGI、SPARC、オステオポンチン、マスピン、カンスタチン、プロリフェリン関連タンパク質、レスチン、および薬剤、例えば、ベバシズマブ、イトラコナゾール、カルボキシアミドトリアゾール、TNP-470、CM101、IFN- α 、血小板第4因子、スラミン、SU5416、トロンボスポンジン、VEGFRアンタゴニスト、血管新生抑制ステロイド+ヘパリン、軟骨由来血管新生阻害因子、マトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤、2-メトキシエストラジオール、テコガラン、テトラチオモリブデート、サリドマイド、トロンボスポンジン、プロラクチン γ 3阻害剤、リノマイド、ならびにタスキニモドである。いくつかの実施形態では、既知の治療候補には、アンジオスタチン、エンドスタチン、および血小板第4因子を含むがこれらに限定されない、天然に存在する血管新生阻害剤が含まれる。別の実施形態では、治療候補には、TNP-470、サリドマイド、およびインターロイキン-12などの内皮細胞増殖の特異的阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。さらに他の抗血管新生剤には、線維芽細胞成長因子に対する抗体、または血管内皮成長因子に対する抗体、または血小板由来成長因子に対する抗体、またはEGF、VEGF、もしくはPDGFの受容体の

他の種類の阻害剤を含むがこれらに限定されない、血管新生分子を中和するものが含まれる。いくつかの実施形態では、抗血管新生剤には、スラミンおよびその類似体、ならびにテコガランが含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、抗血管新生剤には、メタロプロテアーゼ阻害剤および血管新生抑制ステロイドを含むがこれらに限定されない、血管新生因子の受容体を中和する薬剤、または血管基底膜および細胞外マトリックスを妨害する薬剤が含まれるが、これらに限定されない。抗血管新生化合物の別の群には、インテグリン α ν β 3に対する抗体などの抗接着分子が含まれるが、これに限定されない。さらに他の抗血管新生化合物または組成物には、キナーゼ阻害剤、サリドマイド、イトラコナゾール、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、IFN- α 、IL-12、SU5416、トロンボスポンジン、軟骨由来血管新生阻害因子、2-メトキシエストラジオール、テトラチオモリブデート、トロンボスポンジン、プロラクチン、およびリノマイドが含まれるが、これらに限定されない。1つの特定の実施形態では、抗血管新生化合物は、アバスチン（登録商標）／ペバシズマブ（Genentech）などのVEGFに対する抗体である。

10

20

30

40

50

【0188】

いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、抗DNA修復療法を含む。いくつかの実施形態では、DNA損傷修復および応答阻害剤は、PARP阻害剤、RAD51阻害剤、またはCHK1、ATM、もしくはATRから選択されるDNA損傷応答キナーゼの阻害剤から選択される。いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、放射線増感剤を含む。例示的な放射線増感剤には、ミソナダゾール、メトロニダゾール、および低酸素腫瘍組織への酸素の拡散を増加させるのを助ける化合物であるトランスナトリウムクロセチンなどの低酸素放射線増感剤が含まれる。放射線増感剤はまた、塩基除去修復（BER）、ヌクレオチド除去修復（NER）、ミスマッチ修復（MMR）、相同組換え（HR）および非同源末端結合（NHEJ）を含む組換え修復、ならびに直接修復メカニズムを含む組換え修復を妨害するDNA損傷応答阻害剤であり得る。SSB修復機構には、BER、NER、またはMMR経路が含まれ、一方でDSB修復機構には、HRおよびNHEJ経路が含まれる。放射線はDNAの破壊を引き起こし、修復されない場合は致命的である。一本鎖切断は、インタクトDNA鎖を鋳型として使用して、BER、NER、およびMMR機構の組み合わせを通して修復される。SSB修復の主な経路は、ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ（PARP）と呼ばれる関連酵素のファミリーを利用するBERである。したがって、放射線増感剤は、ポリ（ADP）リボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤などのDNA損傷応答阻害剤を含むことができる。いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、DNA修復および応答経路阻害剤、PARP阻害剤（例えば、タラゾパリブ、ルカパリブ、オラパリブ）、RAD51阻害剤（RI-1）、またはDNA損傷応答キナーゼの阻害剤、例えば、CHK1（AZD7762）、ATM（KU-55933、KU-60019、NU7026、VE-821）、およびATR（NU7026）である。

【0189】

いくつかの実施形態では、追加の抗がん療法は、抗炎症剤を含む。いくつかの実施形態では、抗炎症剤は、炎症または炎症性シグナル伝達経路からのシグナル伝達を遮断、阻害、または低減する薬剤であり、いくつかの実施形態では、抗炎症剤は、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、インターフェロン（IFN）、例えば、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、IFN- γ 誘導因子（IGIF）、トランスフォーミング成長因子- β （TGF- β ）、トランスフォーミング成長因子- α （TGF- α ）、腫瘍壊死因子TNF- α 、TNF- β 、TNF-R1、TNF-R2、CD23、CD30、CD40L、EGF、G-CSF、GDNF、PDGF-BB、RANTES／CCL5、IKK、NF- κ B、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、および／または任意のその同族受容体のうちのいずれかの1つ以上の活性を阻害または低減させる。いくつかの実施形態では、

抗炎症剤は、アナキンラ（KINERET（登録商標））、リロナセプト、カナキヌマブなどのIL-1またはIL-1受容体アンタゴニストである。いくつかの実施形態では、抗炎症剤は、IL-6またはIL-6受容体アンタゴニスト、例えば、抗IL-6抗体または抗IL-6受容体抗体、例えば、トシリズマブ（ACTEMRA（登録商標））、オロキズマブ、クラザキズマブ、サリルマブ、シルクマブ、シルツキシマブ、またはALX-0061である。いくつかの実施形態では、抗炎症剤は、TNF- α アンタゴニスト、例えば、抗TNF α 抗体、例えば、インフリキシマブ（REMICADE（登録商標））、ゴリムマブ（SIMPONI（登録商標））、アダリムマブ（HUMIRA（登録商標））、セルトリズマブペゴル（CIMZIA（登録商標））、またはエタネルセプトである。

10

【0190】

いくつかの実施形態では、抗炎症剤は、コルチコステロイドである。例示的なコルチコステロイドには、コルチゾン（ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンリン酸ナトリウム、ヒドロコルチゾンコハク酸ナトリウム、ALA-CORT（登録商標）、HYDROCORT ACETATE（登録商標）、ヒドロコルチゾンホスフェートLANACORT（登録商標）、SOLU-CORTEF（登録商標））、デカドロン（デキサメタゾン、デキサメタゾン酢酸エステル、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、DEXASONE（登録商標）、DIODEX（登録商標）、HEXADROL（登録商標）、MAXIDEX（登録商標））、メチルプレドニゾロン（6-メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロン酢酸エステル、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、DURALONE（登録商標）、MEDRALONE（登録商標）、MEDROL（登録商標）、M-PREDNISOL（登録商標）、SOLU-MEDROL（登録商標））、プレドニゾロン（DELTA-CORTEF（登録商標）、ORAPRED（登録商標）、PEDDIAPRED（登録商標）、PREZONE（登録商標））、およびプレドニゾン（DELTASONE（登録商標）、LIQUID PRED（登録商標）、METICORTEN（登録商標）、ORASONE（登録商標））、およびビスホスホネート（例えば、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、およびゾレドロン酸（ZOMETAC（登録商標））が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0191】

上述のかかる併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が同じまたは別個の製剤に含まれている場合）、および別個の投与を包括し、その場合、がん免疫療法の投与は、追加の治療剤または複数の薬剤の投与の前、同時、および／または後に起こり得る。一事例では、がん免疫療法の投与および追加の治療剤の投与は、互いに約1ヶ月以内、または約1、2、もしくは3週間以内、または約1、2、3、4、5、もしくは6日間以内に起こる。

30

【0192】

理論に縛られることを望まないが、共刺激分子を促進することによって、または共阻害分子を阻害することによってT細胞刺激を増強することは、腫瘍細胞死を促進し、それによってがんの進行を治療または遅延させることができると考えられる。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、共刺激分子に指向するアゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、共刺激分子には、CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM、またはCD127が含まれる。いくつかの事例では、共刺激分子に指向するアゴニストは、CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM、またはCD127と結合するアゴニスト抗体である。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、共阻害分子に指向するアンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、共阻害分子には、CTLA-4（CD152としても知られる）、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B、またはアルギナーゼが含まれ得る。いくつかの事例では、共阻害分子に指向するアンタゴ

40

50

ニストは、CTLA-4、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B、またはアルギナーゼと結合するアンタゴニスト抗体である。

【0193】

いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、CTLA-4（CD152としても知られる）に指向するアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、イピリムマブ（MDX-010、MDX-101、またはYERVOY（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、トレメリムマブ（チシリムマブまたはCP-675, 206としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、B7-H3（CD276としても知られる）に指向するアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、MGA271と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、PD-L1軸結合アンタゴニストは、TGF- β に指向するアンタゴニスト、例えば、メテリムマブ（CAT-192としても知られている）、フレソリムマブ（GC1008としても知られている）、またはLY2157299と組み合わせて投与され得る。

10

【0194】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、キメラ抗原受容体（CAR）を発現するT細胞（例えば、細胞傷害性T細胞またはCTL）の養子移入を含む治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ドミナントネガティブTGFベータ受容体、例えばドミナントネガティブTGFベータII型受容体を含むT細胞の養子移入を含む治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、HERCREEMプロトコル（例えば、ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954）を含む治療と組み合わせて投与され得る。

20

【0195】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CD137に指向するアゴニスト（TNFRSF9、4-1 BB、またはILAとしても知られている）、例えば、活性化抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ウレルマブ（BMS-663513としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CD40に指向するアゴニスト、例えば、活性化抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CP-870893と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、OX40に指向するアゴニスト（CD134としても知られている）、例えば、活性化抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗OX40抗体（例えば、AgonOX）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CD27に指向するアゴニスト、例えば、活性化抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはC

30

40

50

TLA4アンタゴニストは、CDX-1127と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）に指向するアンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、IDOアンタゴニストは、1-メチル-D-トリプトファン（1-D-MTとしても知られている）である。

【0196】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗体薬物複合体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、抗体薬物複合体は、メルタンシンまたはモノメチルアウリスタチンE（MMAE）を含む。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗NaPi2b抗体-MMAE複合体（DNIB0600AまたはRG7599としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、トラスツズマブエムタンシン（T-DM1、ado-トラスツズマブエムタンシン、またはKADCYLA（登録商標）、Genentechとしても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、DMUC5754Aと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、エンドセリンB受容体（EDNBR）を標的とする抗体薬物複合体、例えば、MMAEと複合したEDNBRに指向する抗体と組み合わせて投与され得る。

【0197】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗血管新生剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、VEGFに指向する抗体、例えば、VEGF-Aと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ベバシズマブ（AVASTIN（登録商標）、Genentechとしても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、アンジオポエチン2（Ang2としても知られている）に対指向する抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、MED13617と組み合わせて投与され得る。

【0198】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗腫瘍剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CSF-1Rを標的とする薬剤（M-CSFRまたはCD115としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、抗CSF-1R（IMC-CS4としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、インターフェロン、例えばインターフェロンアルファまたはインターフェロンガンマと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタ

ゴニストは、ロフェロン α （組換えインターフェロンアルファ $\cdot$ 2 α としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、GM $\cdot$ CSF（組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、 γ GM $\cdot$ CSF、サルグラモスチム、またはLEUKINE（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 2（アルデスロイキンまたはPROLEUKIN（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 12と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CD20を標的とする抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、CD20を標的とする抗体は、オビヌツズマブ（GA101またはGAZYVA（登録商標）としても知られている）またはリツキシマブである。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、GITRを標的とする抗体と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、GITRを標的とする抗体は、TRX518である。

10

【0199】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、がんワクチンと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、がんワクチンは、ペプチドがんワクチンであり、いくつかの事例では、個別化ペプチドワクチンである。いくつかの事例では、ペプチドがんワクチンは、多価長ペプチド、マルチペプチド、ペプチドカクテル、ハイブリッドペプチド、またはペプチドパルス樹状細胞ワクチンである（例えば、Yamada et al., Cancer Sci., 104:14 $\cdot$ 21, 2013を参照されたい）。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、アジュバントと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、TLRアゴニスト、例えば、Poly $\cdot$ ICLC（HILTONOL（登録商標）としても知られている）、LPS、MPL、またはCpG ODNを含む治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、腫瘍壊死因子（TNF）アルファと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 1と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、HMGB1と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 10アンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 4アンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、IL $\cdot$ 13アンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、HVEAアンタゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD $\cdot$ L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ICOSアゴニストと組み合わせて、例えば、ICOS $\cdot$ L、またはICOSに指向するアゴニスト抗体の投与によ

20

30

40

50

って投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CX3CL1を標的とする治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CXCL9を標的とする治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CXCL10を標的とする治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、CCCL5を標的とする治療と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、LFA-1またはICAM1アゴニストと組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、セレクトインアゴニストと組み合わせて投与され得る。

【0200】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、標的療法と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、B-Rafの阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ベムラフェニブ（ZELBORAF（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ダブラフェニブ（TAFINLAR（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、MEK1（MAP2K1としても知られている）またはMEK2（MAP2K2としても知られている）などのMEKの阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、コビメチニブ（GDC-0973またはXL-518としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、トラメチニブ（MEKINIST（登録商標）としても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、K-Rasの阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、c-Metの阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、オナルツズマブ（MetMabとしても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、Alkの阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、AF802（CH5424802またはアレクチニブとしても知られている）と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、ホス

10

20

30

40

50

ファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) の阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、BKM120 と組み合わせて投与され得る。

【0201】

いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、イデラリシブ (GS-1101 または CAL-101 としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、ペリホシン (KRX-0401 としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、Akt の阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、MK2206 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、GSK690693 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、GDC-0941 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、mTOR の阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、シロリムス (ラパマイシン としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、テムシロリムス (CCI-779 または TORISEL (登録商標) としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、エベロリムス (RAD001 としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、リダフォロリムス (AP-23573、MK-8669、または デフォロリムス としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、OSI-027 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、AZD8055 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、INK128 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、二重 PI3K/mTOR 阻害剤と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、XL765 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、GDC-0980 と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、BEZ235 (NVP-BEZ235 としても知られている) と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1 軸結合アンタゴニストおよび／または CTLA4 アンタゴニストは、BGT226 と組み合わせて投与され得る。いく

10

20

30

40

50

つかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、GSK2126458と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、PF-04691502と組み合わせて投与され得る。いくつかの事例では、免疫チェックポイント阻害剤、例えば、PD-L1軸結合アンタゴニストおよび／またはCTLA4アンタゴニストは、PF-05212384（PKI-587としても知られている）と組み合わせて投与され得る。

【0202】

PD-L1軸結合アンタゴニストおよびCTLA4アンタゴニストは、例示的ながん免疫療法として上記で示されているが、これは限定することを意図したものではなく、本開示の任意のがん免疫療法は、本明細書に記載されている、さもなければ当技術分野で既知である（医学的判断に従う）他の治療のいずれかと組み合わせて投与することができる。

【0203】

コンピュータシステム

本開示は、本開示の方法を実施するようにプログラムされたコンピュータシステムを提供する。図2は、例えば、WGSデータを処理して、cfDNA分子のコピー数異常（CNA）および断片長を決定し、CNAを処理してCNAプロファイル変化を決定し、断片長を処理して断片長プロファイル変化を決定し、MSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々の平均メチル化割合を決定し、CpGアイランド全体にわたる平均メチル化割合プロファイルを処理して、メチル化割合プロファイルを決定し、ある時点での対象の腫瘍割合を決定し、かつ対象の腫瘍進行を検出するようにプログラムされている、または他の方法で構成されたコンピュータシステム201を示す。コンピュータシステム201は、例えば、WGSデータを処理して、cfDNA分子のコピー数異常（CNA）および断片長を決定し、CNAを処理して、CNAプロファイル変化を決定し、断片長を処理して、断片長のプロファイル変化を決定し、MSデータを処理して、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々の平均メチル化割合を決定し、CpGアイランド全体にわたる平均メチル化割合プロファイルを処理して、メチル化割合プロファイルを決定し、ある時点での対象の腫瘍割合を決定し、かつ対象の腫瘍進行を検出するためのなど、本開示の分析、計算、および生成の様々な態様を調整することができる。コンピュータシステム201は、ユーザの電子デバイス、または電子デバイスに対して遠隔に配置されたコンピュータシステムであり得る。電子デバイスは、モバイル電子デバイスであり得る。

【0204】

コンピュータシステム201は、中央処理装置（CPU、本明細書では「プロセッサ」および「コンピュータプロセッサ」も）205を含み、これは、シングルコアまたはマルチコアプロセッサ、または並列処理のための複数のプロセッサであり得る。コンピュータシステム201はまた、メモリまたはメモリ位置210（例えば、ランダムアクセスメモリ、読み取り専用メモリ、フラッシュメモリ）、電子ストレージユニット215（例えば、ハードディスク）、1つ以上の他のシステムと通信するための通信インターフェース220（例えば、ネットワークアダプタ）、ならびにキャッシュ、他のメモリ、データストレージ、および／または電子ディスプレイアダプタなどの周辺デバイス225を含む。メモリ210、ストレージユニット215、インターフェース220、および周辺デバイス225は、通信バス（実線）を介してCPU205と通信して、マザーボードを形成する。ストレージユニット215は、データを格納するためのデータストレージユニット（またはデータリポジトリ）であり得る。コンピュータシステム201は、通信インターフェース220の支持で、コンピュータネットワーク（「ネットワーク」）230に動作可能に結合することができる。ネットワーク230は、インターネット、またはインターネットと通信しているインターネットおよび／またはエクストラネットであり得る。ネットワーク230は、いくつかの事例では、電気通信および／またはデータネットワークである

。いくつかの実施形態では、ネットワーク 230 は、イーサネット（登録商標）ネットワーク、トークンリングネットワークなど；広域ネットワーク；ワイヤレス広域ネットワーク（「WWAN」）；仮想ネットワーク、例えば、仮想プライベートネットワーク（「VPN」）；インターネット；イントラネット；エクストラネット；IEEE 802.11 スイートのプロトコル、当技術分野で既知である Bluetooth（登録商標）プロトコル、および／もしくは任意の他のワイヤレスプロトコルのいずれかの下で動作するネットワークを含むがこれらに限定されないワイヤレスネットワーク；ならびに／またはこれらおよび／もしくは他のネットワークの任意の組み合わせを含むがこれらに限定されないローカルエリアネットワーク（「LAN」）を含むことができる。ネットワーク 230 は、クラウドコンピューティングなどの分散コンピューティングを可能にすることができる、1 つ以上のコンピュータサーバを含むことができる。例えば、1 つ以上のコンピュータサーバは、ネットワーク 230（「クラウド」）を介したクラウドコンピューティングが、例えば、WGS データを処理して、cfDNA 分子のコピー数異常（CNA）および断片長を決定し、CNA を処理して、CNA プロファイル変化を決定し、断片長を処理して、断片長のプロファイル変化を決定し、MS データを処理して、ゲノムの領域内の 1 つ以上の CpG アイランドの各々の平均メチル化割合を決定し、CpG アイランド全体にわたる平均メチル化割合プロファイルを処理して、メチル化割合プロファイルを決定し、ある時点での対象の腫瘍割合を決定し、かつ対象の腫瘍進行を検出するためのなど、本開示の分析、計算、および生成の様々な態様を実行することを可能にし得る。かかるクラウドコンピューティングは、例えば、Amazon（登録商標）Web Services（AWS）、Microsoft（登録商標）Azure、Google（登録商標）Cloud Platform、IBM（登録商標）クラウドなどのクラウドコンピューティングプラットフォームによって提供され得る。ネットワーク 230 は、いくつかの事例では、コンピュータシステム 201 の支持で、ピアツーピアネットワークを実装することができ、これにより、コンピュータシステム 201 と結合されたデバイスがクライアントまたはサーバとして動作することが可能となり得る。

10

20

30

40

50

【0205】

CPU 205 は、プログラムまたはソフトウェアで具体化することができる、メモリ 210 に格納された、一連の機械可読命令を実行することができる。命令は、CPU 205 によって実行され、次に、本開示の方法を実装するように CPU 205 をプログラムまたは他の方法で構成することができる。CPU 205 によって実行される動作の例には、フェッチ、デコード、実行、およびライトバックが含まれ得る。

【0206】

CPU 205 は、集積回路などの回路の一部であり得る。システム 201 の 1 つ以上の他の構成要素が、回路に含まれ得る。いくつかの事例では、回路は、特定用途向け集積回路（ASIC）、マイクロプロセッサ、コア、またはメモリチップである。CPU は、任意の種類の電子回路であり得ることを理解されたい。

【0207】

ストレージユニット 215 は、ドライバ、ライブラリ、および保存されたプログラムなどのファイルを格納することができる。ストレージユニット 215 は、ユーザデータ、例えば、ユーザプリファレンスおよびユーザプログラムを格納することができる。コンピュータシステム 201 は、いくつかの事例では、イントラネットまたはインターネットを介してコンピュータシステム 201 と通信するリモートサーバ上に配置されるなど、コンピュータシステム 201 の外部にある 1 つ以上の追加のデータストレージユニットを含むことができる。

【0208】

コンピュータシステム 201 は、ネットワーク 230 を介して 1 つ以上のリモートコンピュータシステムと通信することができる。例えば、コンピュータシステム 201 は、ユーザ（例えば、医師、看護師、管理人、患者、または対象）のリモートコンピュータシステムと通信することができる。リモートコンピュータシステムの例には、パーソナルコン

ピュータ（例えば、ポータブルPC）、スレートまたはタブレットPC（例えば、Apple（登録商標）iPad（登録商標）、Samsung（登録商標）Galaxy Tab）、電話、スマートフォン（例えば、Apple（登録商標）iPhone（登録商標）、Android（登録商標）対応デバイス、Blackberry（登録商標））、または携帯情報端末が含まれる。ユーザは、ネットワーク230を介してコンピュータシステム201にアクセスすることができる。

【0209】

本明細書に記載の方法は、例えば、メモリ210または電子ストレージユニット215などのコンピュータシステム201の電子ストレージ位置に格納された機械（例えば、コンピュータプロセッサ）実行可能コードによって実施することができる。機械実行可能または機械読み取り可能コードは、ソフトウェアの形式で提供され得る。使用中に、コードは、プロセッサ205によって実行され得る。いくつかの事例では、コードは、ストレージユニット215から取り出され、プロセッサ205による容易なアクセスのためにメモリ210に記憶され得る。いくつかの状況では、電子ストレージユニット215を排除することができる、機械実行可能命令がメモリ210に記憶される。

【0210】

コードは、コードを実行するように適合されたプロセッサを備える機械で使用するために予めコンパイルおよび構成されるか、または実行時にコンパイルされ得る。コードは、コードが予めコンパイルされるか、またはコンパイルされた様式で実行することができるように選択できるプログラミング言語で提供され得る。

【0211】

コンピュータシステム201など、本明細書で提供されるシステムおよび方法の態様は、プログラミングで具体化することができる。技術の様々な態様は、典型的に、機械（またはプロセッサ）の実行可能コードおよび／または機械可読媒体の種類で実行または具体化される関連データの形式の「製品」または「物品」と考えることができる。機械実行可能コードは、メモリ（例えば、読み取り専用メモリ、ランダムアクセスメモリ、フラッシュメモリまたはハードディスクなどの電子ストレージユニットに保存され得る。「ストレージ」タイプ媒体は、コンピュータ、プロセッサなどの有形メモリのいずれかもしくはすべて、または様々な半導体メモリ、テープドライブ、ディスクドライブなどのそれらの関連モジュールを含むことができ、これは、ソフトウェアプログラミングのためにいつでも非一時的なストレージを提供し得る。ソフトウェアのすべてまたは部分は、インターネットまたは他の様々な電気通信ネットワークを介して通信される。かかる通信は、例えば、あるコンピュータまたはプロセッサから別のものへ、例えば、管理サーバまたはホストコンピュータからアプリケーションサーバのコンピュータプラットフォームへのソフトウェアの負荷を可能とし得る。したがって、ソフトウェア要素を保持し得る別の種類の媒体には、ローカルデバイス間の物理的インターフェース、有線および光固定電話ネットワーク、ならびに様々なエアリンクで使用されるような、光、電気、および電磁波が含まれる。有線または無線リンク、光リンクなどのような波を運ぶ物理的要素も、ソフトウェアを搭載した媒体として考慮される。本明細書で使用される場合、非一時的で有形の「ストレージ」媒体に限定されない限り、コンピュータまたは機械「可読媒体」などの用語は、実行のためにプロセッサに命令を提供することに関与する任意の媒体を指す。

【0212】

したがって、コンピュータ実行可能コードなどの機械可読媒体は、有形ストレージ媒体、搬送波媒体、または物理的伝送媒体を含むがこれらに限定されない多くの形態をとることができる。不揮発性ストレージ媒体は、例えば、図面に示される、データベースなどを実装するために使用され得る、任意のコンピュータなどのストレージデバイスのいずれかなどの光または磁気ディスクを含む。揮発性ストレージ媒体には、かかるコンピュータプラットフォームのメインメモリなどのダイナミックメモリが含まれる。有形伝送媒体には、同軸ケーブル、コンピュータシステム内のバスを構成するワイヤを含む、銅線および光ファイバーが含まれる。搬送波伝送媒体は、電気もしくは電磁信号、または無線周波数（

10

20

30

40

50

R F) および赤外線 (I R) データ通信中に生成されるような音波もしくは光波の形態をとることができる。したがって、コンピュータ可読媒体の一般的な形式には、例えば、フロッピー (登録商標) ディスク、フレキシブルディスク、ハードディスク、磁気テープ、任意の他の磁気媒体、C D - R O M、D V D または D V D - R O M、任意の他の光学媒体、パンチカード紙テープ、ホールのパターンを有する任意の他の物理ストレージ媒体、R A M、R O M、P R O M、および E P R O M、F L A S H (登録商標) - E P R O M、任意の他のメモリチップまたはカートリッジ、データまたは命令を伝送する搬送波、かかる搬送波を伝送するケーブルまたはリンク、あるいはコンピュータがプログラミングコードおよび / またはデータを読み取ることができる任意の他の媒体が含まれる。これらの形式のコンピュータ可読媒体の多くは、実行のために 1 つ以上の命令の 1 つ以上のシーケンスをプロセッサに運ぶことに関与し得る。

10

【0213】

コンピュータシステム 201 は、例えば、決定された C N A および c f D N A 分子の断片長、決定された C N A プロファイル変化、決定された断片長プロファイル変化、決定された腫瘍割合、検出された対象の腫瘍進行または非進行、検出された腫瘍状態 (例えば、進行または非進行)、経時的な腫瘍進行 / 腫瘍非進行状態 (例えば、数値的またはプロットされた)、決定されたメチル化状態またはその変化などを提供するためのユーザインターフェース (U I) 240 を含む電子ディスプレイ 235 を含むか、またはそれと通信することができる。U I の例には、グラフィカルユーザインターフェース (G U I) が含まれるが、これに限定されない。G U I は、モバイルデバイス上で実行するためのウェブ系ユーザインターフェースまたはアプリケーション系ユーザインターフェースを含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0214】

本開示の方法およびシステムは、1 つ以上のアルゴリズムの方法によって実施することができる。アルゴリズムは、中央処理装置 205 による実行時にソフトウェアによって実装することができる。このアルゴリズムは、例えば、W G S データを処理して、コピー数異常 (C N A) および c f D N A 分子の断片長を決定し、C N A を処理して、C N A プロファイル変化を決定し、断片長を処理して、治療の過程で患者からの複数の試料の特定の C N A シグナルの強度の変化を定量化することによって断片長のプロファイル変化を決定し (これは、C N A に基づいて別々の試料で腫瘍割合を別々に定量化することから生じる特定のエラーモードの傾向が少ないことが示され、図 15 A および 15 B を参照されたい)、M S データを処理して、ゲノムの領域内の 1 つ以上の C p G アイランドの各々の平均メチル化割合を決定し、C p G アイランド全体にわたる平均メチル化割合プロファイルを処理して、メチル化割合プロファイルを決定し、直交データのトレーニングに基づいて、ある時点での対象の腫瘍割合を決定し、かつ対象の腫瘍進行を検出することができる。

30

【0215】

これは統計モデリング技術として記載されているが、上記のプロセスは、様々な周知の機械学習技術を修飾することによっても実行され得る。

【0216】

列挙される実施形態

40

以下の列挙される実施形態は、本発明のいくつかの態様を代表するものである。

【0217】

1. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

第 1 の複数の無細胞 DNA (c f D N A) 分子の第 1 の全ゲノム配列決定 (W G S) データを取得することであって、第 1 の複数の c f D N A 分子が、第 1 の時点での対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第 1 の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、

第 1 の W G S データに基づいて、(i) 第 1 の複数の c f D N A 分子における第 1 の複数のコピー数異常 (C N A)、および (i i) 第 1 の複数の c f D N A 分子の第 1 の複数の断片長を決定することと、

50

第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のWGSデータに基づいて、(iii) 第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(iv) 第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【0218】

2. 第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液 (CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、実施形態1に記載の方法。

【0219】

3. 第1のWGSデータを取得することが、第1の複数のcfDNA分子を配列決定して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のWGSデータを取得することが、第2の複数のcfDNA分子を配列決定して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、実施形態1に記載の方法。

【0220】

4. 配列決定が、約25回以下の深度で実施される、実施形態3に記載の方法。

【0221】

5. 配列決定が、約10回以下の深度で実施される、実施形態3に記載の方法。

【0222】

6. 配列決定が、約8回以下の深度で実施される、実施形態3に記載の方法。

【0223】

7. 配列決定が、約6回以下の深度で実施される、実施形態3に記載の方法。

【0224】

8. 第1または第2の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、実施形態3に記載の方法。

【0225】

9. 複数のゲノム領域について第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む、実施形態1に記載の方法。

【0226】

10. 濃縮が、第1または第2の複数のcfDNA分子を増幅することを含む、実施形態9に記載の方法。

【0227】

11. 増幅が、選択的な増幅を含む、実施形態10に記載の方法。

【0228】

12. 増幅が、普遍的な増幅を含む、実施形態10に記載の方法。

【0229】

13. 濃縮が、第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む、実施形態9に記載の方法。

【0230】

10

20

30

40

50

14. 第1または第2の複数のcfDNA分子の少なくとも一部分を選択的に単離することが、複数のプローブを使用することを含み、複数のプローブの各々が、複数のゲノム領域のうちのゲノム領域の少なくとも一部分と配列相補性を有する、実施形態13に記載の方法。

【0231】

15. 少なくとも一部分が、腫瘍マーカー遺伝子座を含む、実施形態13に記載の方法。

【0232】

16. 少なくとも一部分が、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む、実施形態15に記載の方法。

【0233】

17. 複数の腫瘍マーカー遺伝子座が、The Cancer Genome Atlas (TCGA) または Catalogue of Somatic Mutations in cancer (COSMIC) から選択される1つ以上の遺伝子座を含む、実施形態16に記載の方法。

【0234】

18. 第1の複数のCNAを決定することが、第1の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含み、第2の複数のCNAを決定することが、第2の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含む、実施形態3に記載の方法。

【0235】

19. GC含量および／またはマッピング傾向について、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNAを修正することをさらに含む、実施形態18に記載の方法。

【0236】

20. 修正が、統計モデリング分析を使用することを含む、実施形態19に記載の方法。

【0237】

21. 統計モデリング分析が、LOESS回帰またはベイズモデルを含む、実施形態20に記載の方法。

【0238】

22. 複数のゲノム領域が、予め決定されたサイズを有する基準ゲノムの非重複ゲノム領域を含む、実施形態18に記載の方法。

【0239】

23. 予め決定されたサイズが、約50キロベース(kb)、約100kb、約200kb、約500kb、約1メガベース(Mb)、約2Mb、約5Mb、または約10Mbである、実施形態22に記載の方法。

【0240】

24. 複数のゲノム領域が、少なくとも約1,000個の別個のゲノム領域を含む、実施形態18に記載の方法。

【0241】

25. 複数のゲノム領域が、少なくとも約2,000個の別個のゲノム領域を含む、実施形態24に記載の方法。

【0242】

26. CNAプロファイル変化を決定することが、第1の複数のCNAおよび第2の複数のCNAを複数の基準CNA値と比較することを含み、複数の基準CNA値が、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加のcfDNA分子から取得される、実施形態1に記載の方法。

【0243】

27. 追加の対象が、がんを有しない1人以上の対象を含む、実施形態26に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0244】

28. 追加の対象が、腫瘍進行を有しない1人以上の対象を含む、実施形態26に記載の方法。

【0245】

29. 複数の基準CNA値が、第1の時点後の1つ以上の後続の時点で取得される対象の追加の体液試料を使用して取得される、実施形態26に記載の方法。

【0246】

30. 予め決定された基準を満たす第1の複数のCNAおよび第2の複数のCNAのサブセットを除外することをさらに含む、実施形態1に記載の方法。

【0247】

31. 所与のCNA値と対応する基準CNA値との間の差が、約1標準偏差以下の差を含む場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む、実施形態30に記載の方法。

【0248】

32. 所与のCNA値と対応する基準CNA値との間の差が、約2標準偏差以下の差を含む場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む、実施形態31に記載の方法。

【0249】

33. 所与のCNA値と対応する基準CNA値との間の差が、約3標準偏差以下の差を含む場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む、実施形態31に記載の方法。

【0250】

34. 所与のCNA値と対応する局所平均断片長との間のスピアマンの順位相関に基づいて、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む、実施形態30に記載の方法。

【0251】

35. スピアマンの順位相関係数（スピアマンの ρ ）が、 -0.1 未満である場合に、第1の複数のCNAまたは第2の複数のCNA値の所与のCNA値を除外することをさらに含む、実施形態34に記載の方法。

【0252】

36. ライブラリまたはゲノム位置に基づいて、第1の複数の断片長または第2の複数の断片長を正規化することをさらに含む、実施形態1に記載の方法。

【0253】

37. 第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、1を超える、1.1を超える、1.2を超える、1.3を超える、1.4を超える、1.5を超える、1.6を超える、1.7を超える、1.8を超える、1.9を超える、2を超える、3を超える、4を超える、または5を超える場合に、腫瘍状態が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、実施形態1に記載の方法。

【0254】

38. 第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、0.01未満、0.05未満、0.1未満、0.2未満、0.3未満、0.4未満、または0.5未満である場合に、対象の主要分子応答（MMR）を検出することをさらに含む、実施形態1に記載の方法。

【0255】

39. 少なくとも約50%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態1～38のいずれか1つに記載の方法。

【0256】

40. 少なくとも約70%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態39に記載の方法。

【0257】

41. 少なくとも約90%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施

10

20

30

40

50

形態 40 に記載の方法。

【0258】

42. 少なくとも約 50 % の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 1 ~ 41 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0259】

43. 少なくとも約 70 % の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 42 に記載の方法。

【0260】

44. 少なくとも約 90 % の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 43 に記載の方法。

【0261】

45. 少なくとも約 98 % の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 44 に記載の方法。

【0262】

46. 少なくとも約 50 % の陽性予測値 (PPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 1 ~ 45 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0263】

47. 少なくとも約 70 % の陽性予測値 (PPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 46 に記載の方法。

【0264】

48. 少なくとも約 90 % の陽性予測値 (PPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 47 に記載の方法。

【0265】

49. 少なくとも約 50 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 1 ~ 48 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0266】

50. 少なくとも約 70 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 49 に記載の方法。

【0267】

51. 少なくとも約 90 % の陰性予測値 (NPV) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 50 に記載の方法。

【0268】

52. 少なくとも約 0.60 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 1 ~ 51 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0269】

53. 少なくとも約 0.75 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 52 に記載の方法。

【0270】

54. 少なくとも約 0.90 の曲線下面積 (AUC) で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態 53 に記載の方法。

【0271】

55. 腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、実施形態 1 ~ 54 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0272】

56. 対象の決定された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効量の治療を投与することをさらに含む、実施形態 1 ~ 55 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0273】

57. 治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント

10

20

30

40

50

ト阻害剤を含む、実施形態 5 6 に記載の方法。

【0274】

58. 検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、実施形態 1～57 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0275】

59. 第 1 および第 2 の WGS データが、パイロ配列決定、合成による配列決定、単一分子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、超並列配列決定、鎖末端配列決定、単一分子リアルタイム配列決定、ポロニー配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、またはハイブリッド捕捉系配列決定によって取得される、実施形態 1～58 のいずれか 1 つに記載の方法。

10

【0276】

60. 第 1 および第 2 の WGS データが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、実施形態 1～59 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0277】

61. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、
(i) 第 1 の複数の無細胞 DNA (cfDNA) 分子の第 1 の全ゲノム配列決定 (WGS) データであって、第 1 の複数の cfDNA 分子が、第 1 の時点での対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第 1 の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、第 1 の全ゲノム配列決定 (WGS) データ、
および (ii) 第 2 の複数の無細胞 DNA (cfDNA) 分子の第 2 の全ゲノム配列決定 (WGS) データであって、第 2 の複数の cfDNA 分子が、第 2 の時点での対象の第 2 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第 2 の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第 2 の全ゲノム配列決定 (WGS) データを保存するように構成されたデータベースと、

20

データベースと動作可能に結合された 1 つ以上のコンピュータプロセッサであって、1 つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

第 1 の WGS データに基づいて、(i) 第 1 の複数の cfDNA 分子における第 1 の複数のコピー数異常 (CNA)、および (ii) 第 1 の複数の cfDNA 分子の第 1 の複数の断片長を決定し、

30

第 2 の WGS データに基づいて、(iii) 第 2 の複数の cfDNA 分子における第 2 の複数のコピー数異常 (CNA)、および (iv) 第 2 の複数の cfDNA 分子の第 2 の複数の断片長を決定し、

第 1 の複数の CNA を第 2 の複数の CNA と比較して、CNA プロファイル変化を決定し、

第 1 の複数の断片長および第 2 の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定し、

少なくとも部分的に、CNA プロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第 1 の時点での対象の第 1 の腫瘍割合または第 2 の時点での対象の第 2 の腫瘍割合を決定し、かつ

40

少なくとも部分的に、第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1 つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【0278】

62. 非一時的コンピュータ可読媒体であって、1 つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、

第 1 の複数の無細胞 DNA (cfDNA) 分子の第 1 の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第 1 の複数の cfDNA 分子が、第 1 の時点での対象の第 1 の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第 1 の時点は、がんを治療するよ

50

うに構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、

第1のWGSデータに基づいて、(i)第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、

第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のWGSデータに基づいて、(iii)第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化および断片長プロファイル変化に基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

【0279】

63. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【0280】

64. 第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液(CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、実施形態63に記載の方法。

【0281】

65. 第1のMSデータを取得することが、第1の複数のcfDNA分子のメチル化配

10

20

30

40

50

列決定を実施して、第 1 の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第 2 の MGS データを取得することが、第 2 の複数の cfDNA 分子のメチル化配列決定を実施して、第 2 の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、実施形態 63 に記載の方法。

【0282】

66. メチル化配列決定が、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0283】

67. メチル化配列決定が、全ゲノム酵素的メチル-seqを含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0284】

68. メチル化配列決定が、酸化的バイサルファイト配列決定、TET 支援ピリジンボラン配列決定 (TAPs)、TET 支援バイサルファイト配列決定 (TABs)、酸化的バイサルファイト配列決定 (oxBS-seq)、APOBEC 結合エピジェネティック配列決定 (ACE-seq)、メチル化 DNA 免疫沈降 (MeDIP) 配列決定、ヒドロキシメチル化 DNA 免疫沈降 (hMeDIP) 配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定 (RRBS-seq)、またはシトシン 5-ヒドロキシメチル化配列決定を含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0285】

69. メチル化配列決定が、約 25 回以下の深度で実施される、実施形態 65 に記載の方法。

【0286】

70. メチル化配列決定が、約 10 回以下の深度で実施される、実施形態 65 に記載の方法。

【0287】

71. メチル化配列決定が、約 8 回以下の深度で実施される、実施形態 65 に記載の方法。

【0288】

72. メチル化配列決定が、約 6 回以下の深度で実施される、実施形態 65 に記載の方法。

【0289】

73. 第 1 または第 2 の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0290】

74. ゲノムの領域について第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子を濃縮することをさらに含む、実施形態 65 に記載の方法。

【0291】

75. 濃縮が、第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子を増幅することを含む、実施形態 74 に記載の方法。

【0292】

76. 増幅が、選択的な増幅を含む、実施形態 75 に記載の方法。

【0293】

77. 増幅が、普遍的な増幅を含む、実施形態 75 に記載の方法。

【0294】

78. 濃縮が、第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子の少なくとも一部分を選択的に単離することを含む、実施形態 74 に記載の方法。

【0295】

79. 第 1 または第 2 の複数の cfDNA 分子の少なくとも一部分を選択的に単離することが、複数のプローブを使用することを含み、複数のプローブの各々が、ゲノムの領域

10

20

30

40

50

のうちの少なくとも一部分と配列相補性を有する、実施形態 78 に記載の方法。

【0296】

80. 少なくとも一部分が、腫瘍マーカー遺伝子座を含む、実施形態 78 に記載の方法。

【0297】

81. 少なくとも一部分が、複数の腫瘍マーカー遺伝子座を含む、実施形態 80 に記載の方法。

【0298】

82. 複数の腫瘍マーカー遺伝子座が、The Cancer Genome Atlas (TCGA) または Catalogue of Somatic Mutations in cancer (COSMIC) から選択される 1 つ以上の遺伝子座を含む、実施形態 81 に記載の方法。

【0299】

83. ゲノムの領域が、CpG アイランド、CpG ショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのビン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む、実施形態 63 に記載の方法。

【0300】

84. ゲノムの領域が、ゲノムの複数の非重複領域を含む、実施形態 63 に記載の方法。

【0301】

85. ゲノムの複数の非重複領域が、予め決定されたサイズを有する、実施形態 84 に記載の方法。

【0302】

86. 予め決定されたサイズが、約 50 キロベース (kb)、約 100 kb、約 200 kb、約 500 kb、約 1 メガベース (Mb)、約 2 Mb、約 5 Mb、または約 10 Mb である、実施形態 85 に記載の方法。

【0303】

87. ゲノムの複数の非重複領域が、少なくとも約 1,000 個の別個の領域を含む、実施形態 84 に記載の方法。

【0304】

88. ゲノムの複数の非重複領域が、少なくとも約 2,000 個の別個の領域を含む、実施形態 87 に記載の方法。

【0305】

89. 第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することが、メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加の cfDNA 分子から取得される、実施形態 63 に記載の方法。

【0306】

90. 追加の対象が、がんを有する 1 人以上の対象を含む、実施形態 89 に記載の方法。

【0307】

91. 追加の対象が、がんを有しない 1 人以上の対象を含む、実施形態 89 に記載の方法。

【0308】

92. 追加の対象が、腫瘍進行を有する 1 人以上の対象を含む、実施形態 89 に記載の方法。

【0309】

93. 追加の対象が、腫瘍進行を有しない 1 人以上の対象を含む、実施形態 89 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【0310】

94. 1つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、第1の時点後の1つ以上の後続の時点で取得される対象の追加の体液試料を使用して取得される、実施形態89に記載の方法。

【0311】

95. 第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、1を超える、1.1を超える、1.2を超える、1.3を超える、1.4を超える、1.5を超える、1.6を超える、1.7を超える、1.8を超える、1.9を超える、2を超える、3を超える、4を超える、または5を超える場合に、腫瘍状態が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、実施形態63に記載の方法。

10

【0312】

96. 第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合が、0.01未満、0.05未満、0.1未満、0.2未満、0.3未満、0.4未満、または0.5未満である場合に、対象の主要分子応答(MMR)を検出することをさらに含む、実施形態63に記載の方法。

【0313】

97. 少なくとも約50%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態63～96のいずれか1つに記載の方法。

【0314】

98. 少なくとも約70%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態97に記載の方法。

20

【0315】

99. 少なくとも約90%の感度で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態98に記載の方法。

【0316】

100. 少なくとも約50%の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態63～99のいずれか1つに記載の方法。

【0317】

101. 少なくとも約70%の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態100に記載の方法。

【0318】

102. 少なくとも約90%の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態101に記載の方法。

30

【0319】

103. 少なくとも約98%の特異性で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態102に記載の方法。

【0320】

104. 少なくとも約50%の陽性予測値(PPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態63～103のいずれか1つに記載の方法。

【0321】

105. 少なくとも約70%の陽性予測値(PPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態104に記載の方法。

40

【0322】

106. 少なくとも約90%の陽性予測値(PPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態105に記載の方法。

【0323】

107. 少なくとも約50%の陰性予測値(NPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態63～106のいずれか1つに記載の方法。

【0324】

108. 少なくとも約70%の陰性予測値(NPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態107に記載の方法。

50

【0325】

109. 少なくとも約90%の陰性予測値(NPV)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態108に記載の方法。

【0326】

110. 少なくとも約0.60の曲線下面積(AUC)で対象の状態進行を検出することをさらに含む、実施形態63~109のいずれか1つに記載の方法。

【0327】

111. 少なくとも約0.75の曲線下面積(AUC)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態110に記載の方法。

【0328】

112. 少なくとも約0.90の曲線下面積(AUC)で対象の腫瘍状態を検出することをさらに含む、実施形態111に記載の方法。

【0329】

113. 腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、実施形態63~112のいずれか1つに記載の方法。

【0330】

114. 対象の決定された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効量の第2の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態63~113のいずれか1つに記載の方法。

【0331】

115. 第2の治療薬が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む、実施形態114に記載の方法。

【0332】

116. 第1および第2の複数のcfDNA分子が、対象の免疫細胞に由来する、実施形態63~115のいずれか1つに記載の方法。

【0333】

117. 検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、実施形態63~116のいずれか1つに記載の方法。

【0334】

118. 第1および第2のWSデータが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、実施形態63~117のいずれか1つに記載の方法。

【0335】

119. 対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、実施形態1~60および63~118のいずれか1つに記載の方法。

【0336】

120. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、

(i) ゲノムの領域全体にわたる第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、第1のメチル化配列決定(MS)データ、および(ii) ゲノムの領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、

10

20

30

40

50

データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得し、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得し、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定し、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定し、かつ

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【0337】

121. 非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定し、それによって、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定することと、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

【0338】

122. 検出された腫瘍進行が、少なくとも部分的に、それぞれのメチル化割合プロファイルの1つ以上の統計モデリング分析に基づく、実施形態120に記載のコンピュータシステムまたは実施形態121に記載の非一時的コンピュータ可読媒体。

【0339】

123. 1つ以上の統計モデリング分析が、線形回帰、単純回帰、バイナリ回帰、ベイズ線形回帰、ベイズモデリング、多項回帰、ガウス過程回帰、ガウスモデリング、バイナリ回帰、ロジスティック回帰、または非線形回帰を含む、実施形態122に記載のシステ

10

20

30

40

50

ムまたは媒体。

【0340】

124. 1つ以上の統計モデリング分析が、検出された腫瘍進行を、既知の腫瘍割合を有する試料に由来するMSデータ、純粋な腫瘍試料に由来するMSデータ、または健常な試料に由来するMSデータと比較される、実施形態122または実施形態123に記載のシステムまたは媒体。

【0341】

125. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

10

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを設定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、

ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを設定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、

20

1つ以上の遺伝子座全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較することと、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を設定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【0342】

126. 第1および第2のメチル化プロファイルが、5-ヒドロキシメチルシトシン状態、5-メチルシトシンの状態、濃縮系メチル化評価、中央メチル化レベル、モードメチル化レベル、最大メチル化レベル、または最小メチル化レベルを含む、実施形態125に記載の方法。

30

【0343】

127. 第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液 (CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、実施形態125または126に記載の方法。

【0344】

128. 第1のMSデータを取得することが、第1の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のMGSデータを取得することが、第2の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、実施形態125に記載の方法。

40

【0345】

129. メチル化配列決定が、全ゲノムバイサルファイト配列決定を含む、実施形態128に記載の方法。

【0346】

130. メチル化配列決定が、全ゲノム酵素的メチル-seqを含む、実施形態128に記載の方法。

【0347】

131. メチル化配列決定が、酸化的バイサルファイト配列決定、TET支援ピリジン

50

ボラン配列決定 (T A P S)、T E T 支援バイサルファイト配列決定 (T A B S)、酸化的バイサルファイト配列決定 (o x B S - S e q)、A P O B E C 結合エピジェネティック配列決定 (A C E - s e q)、メチル化 D N A 免疫沈降 (M e D I P) 配列決定、ヒドロキシメチル化 D N A 免疫沈降 (h M e D I P) 配列決定、メチル化アレイ分析、減少表現バイサルファイト配列決定 (R R B S - S e q)、またはシトシン 5 - ヒドロキシメチル化配列決定を含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 4 8】

1 3 2. 第 1 または第 2 の複数の配列決定読み取りを基準ゲノムと整列して、それによって、複数の整列配列決定読み取りを生成することをさらに含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 4 9】

1 3 3. ゲノムの領域について第 1 または第 2 の複数の c f D N A 分子を濃縮することをさらに含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 0】

1 3 4. ゲノムの領域が、C p G アイランド、C p G ショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの 1 つ以上を含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 1】

1 3 5. ゲノムの領域が、ゲノムの複数の非重複領域を含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 2】

1 3 6. 第 1 または第 2 の腫瘍割合を決定することが、メチル化割合プロファイルを 1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、1 つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加の c f D N A 分子から取得される、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 3】

1 3 7. 第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、1 を超える、1 . 1 を超える、1 . 2 を超える、1 . 3 を超える、1 . 4 を超える、1 . 5 を超える、1 . 6 を超える、1 . 7 を超える、1 . 8 を超える、1 . 9 を超える、2 を超える、3 を超える、4 を超える、または 5 を超える場合に、腫瘍状態が、対象の腫瘍進行を含むことを検出することをさらに含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 4】

1 3 8. 第 1 の腫瘍割合または第 2 の腫瘍割合が、0 . 0 1 未満、0 . 0 5 未満、0 . 1 未満、0 . 2 未満、0 . 3 未満、0 . 4 未満、または 0 . 5 未満である場合に、対象の主要分子応答 (M M R) を検出することをさらに含む、実施形態 1 2 8 に記載の方法。

【0 3 5 5】

1 3 9. 腫瘍進行が検出されない場合に、対象の腫瘍非進行を決定することをさらに含む、実施形態 1 2 8 ~ 1 3 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 3 5 6】

1 4 0. 対象の決定された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効量の第 2 の治療薬を投与することをさらに含む、実施形態 1 2 8 ~ 1 3 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 3 5 7】

1 4 1. 第 1 および第 2 の複数の c f D N A 分子が、対象の免疫細胞に由来する、実施形態 1 2 8 ~ 1 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 3 5 8】

1 4 2. 検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、実施形態 1 2 8 ~ 1 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法。

【0 3 5 9】

10

20

30

40

50

143. 第1および第2のWSデータが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、実施形態128～142のいずれか1つに記載の方法。

【0360】

144. 対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、膵臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、実施形態128～143のいずれか1つに記載の方法。

【0361】

145. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するためのコンピュータシステムであって、

(i) ゲノムの領域全体にわたる第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、第1のメチル化配列決定 (MS) データ、および (ii) ゲノムの領域全体にわたる第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、第2のMSデータを保存するように構成されたデータベースと、

データベースと動作可能に結合された1つ以上のコンピュータプロセッサであって、1つ以上のコンピュータプロセッサが、個別にまたは集合的に、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得し、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得し、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較し、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定制し、かつ

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出するようにプログラムされている、1つ以上のコンピュータプロセッサと、を含む、コンピュータシステム。

【0362】

146. 非一時的コンピュータ可読媒体であって、1つ以上のコンピュータプロセッサによって実行されると、がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法を実施する、機械実行可能命令を含み、方法が、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、対象にがんを治療するように構成された治療薬が投与される前である、取得することと、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、

ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

10

20

30

40

50

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についてのメチル化プロファイルを決定制し、それによつて、第2のメチル化プロファイルを取得することと、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較することと、

少なくとも部分的に、それぞれのメチル化プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定制することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、非一時的コンピュータ可読媒体。

10

【0363】

147. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であつて、

第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであつて、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、

第1のWGSデータに基づいて、(i)第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常(CNA)、および(ii)第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定制することと、

ゲノムの領域全体にわたつて第1の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第1のメチル化配列決定(MS)データを取得することであつて、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

20

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定制し、それによつて、第1の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2の全ゲノム配列決定(WGS)データを取得することであつて、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

30

第2のWGSデータに基づいて、(iii)第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常(CNA)、および(iv)第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定制することと、

ゲノムの領域全体にわたつて第2の複数の無細胞DNA(cfDNA)分子の第2のMSデータを取得することであつて、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの領域内の1つ以上のCpGアイランドの各々についての平均メチル化割合を決定制し、それによつて、第2の平均メチル化割合プロファイルを取得することと、

第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定制することと、

40

第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定制することと、

1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第1の平均メチル化割合プロファイルと、1つ以上のCpGアイランド全体にわたる第2の平均メチル化割合プロファイルとを比較して、メチル化割合プロファイルを決定制することと、

少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定制することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状

50

態を検出することと、を含む、方法。

【0364】

148. がんを有する対象の腫瘍状態を評価するための方法であって、

第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の第1の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第1の時点は、がんを治療するように構成された治療薬が、対象に投与される前である、取得することと、

第1のWGSデータに基づいて、(i) 第1の複数のcfDNA分子における第1の複数のコピー数異常 (CNA)、および(ii) 第1の複数のcfDNA分子の第1の複数の断片長を決定することと、

ゲノムの領域全体にわたって第1の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第1のメチル化配列決定 (MS) データを取得することであって、第1の複数のcfDNA分子が、第1の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

第1のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第1のメチル化プロファイルを取得することと、
第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2の全ゲノム配列決定 (WGS) データを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の第2の体液試料から取得されるか、またはそれに由来し、第2の時点は、対象に治療薬が投与された後である、取得することと、

第2のWGSデータに基づいて、(iii) 第2の複数のcfDNA分子における第2の複数のコピー数異常 (CNA)、および(iv) 第2の複数のcfDNA分子の第2の複数の断片長を決定することと、

ゲノムの領域全体にわたって第2の複数の無細胞DNA (cfDNA) 分子の第2のMSデータを取得することであって、第2の複数のcfDNA分子が、第2の時点での対象の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する、取得することと、

第2のMSデータに基づいて、ゲノムの1つ以上の遺伝子座の各々についてのメチル化プロファイルを決

定し、それによって、第2のメチル化プロファイルを取得することと、
第1の複数のCNAを第2の複数のCNAと比較して、CNAプロファイル変化を決定することと、

第1の複数の断片長および第2の複数の断片長に基づいて、断片長プロファイル変化を決定することと、

1つ以上の遺伝子座全体にわたる第1のメチル化プロファイルと、1つ以上の遺伝子座全体にわたる第2のメチル化プロファイルとを比較することと、

少なくとも部分的に、CNAプロファイル変化、断片長プロファイル変化、およびそれぞれのメチル化割合プロファイルに基づいて、第1の時点での対象の第1の腫瘍割合または第2の時点での対象の第2の腫瘍割合を決定することと、

少なくとも部分的に、第1の腫瘍割合または第2の腫瘍割合に基づいて、対象の腫瘍状態を検出することと、を含む、方法。

【0365】

149. 第1および第2のメチル化プロファイルが、5-ヒドロキシメチルシトシン状態、5-メチルシトシンの状態、濃縮系メチル化評価、中央メチル化レベル、モードメチル化レベル、最大メチル化レベル、または最小メチル化レベルを含む、実施形態148に記載の方法。

【0366】

150. 第1のWGSデータおよび第1のMSデータが、同じ試料から取得される、実施形態147~149のいずれか1つに記載の方法。

【0367】

151. 第1のWGSデータおよび第1のMSデータが、異なる試料から取得される、実施形態147~149のいずれか1つに記載の方法。

10

20

30

40

50

【0368】

152. 第2のWGSデータおよび第2のMSデータが、同じ試料から取得される、実施形態147～151のいずれか1つに記載の方法。

【0369】

153. 第2のWGSデータおよび第2のMSデータが、異なる試料から取得される、実施形態147～151のいずれか1つに記載の方法。

【0370】

154. 第1または第2の体液試料が、血液、血清、血漿、硝子体、痰、尿、涙、汗、唾液、精液、粘膜排出物、粘液、脊髄液、脳脊髄液(CSF)、胸水、腹水、羊水、リンパ液からなる群から選択される、実施形態147～153のいずれか1つに記載の方法。

10

【0371】

155. 第1のWGSデータを取得することが、第1の複数のcfDNA分子を配列決定して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のWGSデータを取得することが、第2の複数のcfDNA分子を配列決定して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、実施形態147～154のいずれか1つに記載の方法。

【0372】

156. 複数のゲノム領域について第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む、実施形態147～155のいずれか1つに記載の方法。

【0373】

157. 第1の複数のCNAを決定することが、第1の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含み、第2の複数のCNAを決定することが、第2の複数の配列決定読み取りの複数のゲノム領域の各々でのCNAの定量的測定値を決定することを含む、実施形態155または156に記載の方法。

20

【0374】

158. CNAプロファイル変化を決定することが、第1の複数のCNAおよび第2の複数のCNAを複数の基準CNA値と比較することを含み、複数の基準CNA値が、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加のcfDNA分子から取得される、実施形態147～157のいずれか1つに記載の方法。

【0375】

159. 第1および第2のWGSデータが、パイロ配列決定、合成による配列決定、単一分子配列決定、ナノポア配列決定、半導体配列決定、ライゲーションによる配列決定、ハイブリダイゼーションによる配列決定、超並列配列決定、鎖末端配列決定、単一分子リアルタイム配列決定、ポロニー配列決定、コンビナトリアルプローブアンカー合成、またはハイブリッド捕捉系配列決定によって取得される、実施形態147～158のいずれか1つに記載の方法。

30

【0376】

160. 第1のMSデータを取得することが、第1の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第1の複数の配列決定読み取りを生成することを含むか、または第2のMSデータを取得することが、第2の複数のcfDNA分子のメチル化配列決定を実施して、第2の複数の配列決定読み取りを生成することを含む、実施形態147～159のいずれか1つに記載の方法。

40

【0377】

161. ゲノムの領域について第1または第2の複数のcfDNA分子を濃縮することをさらに含む、実施形態147～160のいずれか1つに記載の方法。

【0378】

162. ゲノムの領域が、CpGアイランド、CpGショア、患者特異的な部分的メチル化ドメイン、一般的な部分的メチル化ドメイン、プロモーター、遺伝子本体、等間隔のゲノム全体でのピン、および転移因子のうちの1つ以上を含む、実施形態147～161のいずれか1つに記載の方法。

50

【0379】

163. 第1または第2の腫瘍割合を決定することが、メチル化割合プロファイルを1つ以上の基準メチル化割合プロファイルと比較することを含み、1つ以上の基準メチル化割合プロファイルが、追加の対象の追加の体液試料から取得されるか、またはそれに由来する追加のcfDNA分子から取得される、実施形態147～162のいずれか1つに記載の方法。

【0380】

164. 対象の決定された腫瘍状態に基づいて、対象のがんを治療するために治療有効量の治療を投与することをさらに含む、実施形態147～163のいずれか1つに記載の方法。

【0381】

165. 治療が、外科手術、化学療法、放射線療法、標的療法、免疫療法、細胞治療、抗ホルモン剤、代謝拮抗化学療法剤、キナーゼ阻害剤、メチルトランスフェラーゼ阻害剤、ペプチド、遺伝子療法、ワクチン、プラチナ系化学療法剤、抗体、またはチェックポイント阻害剤を含む、実施形態164に記載の方法。

【0382】

166. 第1および第2の複数のcfDNA分子が、対象の免疫細胞に由来する、実施形態147～165のいずれか1つに記載の方法。

【0383】

167. 検出された腫瘍状態が、腫瘍進行、非進行、退行、または再発を示す、実施形態147～166のいずれか1つに記載の方法。

【0384】

168. 第1および第2のWSデータが、配列決定デバイスまたはコンピュータプロセッサによって取得される、実施形態147～167のいずれか1つに記載の方法。

【0385】

169. 対象が、脳がん、膀胱がん、乳がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、腎臓がん、肝胆道がん、白血病、肝臓がん、肺がん、リンパ腫、卵巣がん、脾臓がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、甲状腺がん、または尿路がんを有する、実施形態147～168のいずれか1つに記載の方法。

【0386】

170. ゲノムの領域が、1つ以上のMAGE（黒色腫関連抗原）遺伝子、例えば、ヒトMAGE遺伝子を含む、実施形態63～119、125～144、および147～169のいずれか1つに記載の方法。

【0387】

171. ゲノムの領域が、1つ以上のMAGE（黒色腫関連抗原）遺伝子、例えば、ヒトMAGE遺伝子に対応する1つ以上のプロモーターを含む、実施形態63～119、125～144、および147～169のいずれか1つに記載の方法。

【実施例】

【0388】

実施例1：進行性固形腫瘍における全ゲノム循環腫瘍DNAによる分子疾患進行の早期発見

進行性固形腫瘍を有する患者の治療応答評価は、複雑であり得、他の評価方法では、早期疾患評価のためにより高い精度が必要であり得る。現在のガイドラインは、画像化に依存し得、この画像化は、治療有効性を決定することができる前に長い期間を必要とするなどの制限が課せられ得る。本開示の方法およびシステムを使用して、全ゲノム（WG）循環腫瘍DNA（ctDNA）の連続的变化を使用して、治療過程の初期に疾患の進行を検出した。

【0389】

進行性がんを有する97人の患者のセットを登録し、新しい治療の開始の前および後に患者の各々から血液試料を収集した。血漿無細胞DNAライブラリを、WGまたはWGバ

10

20

30

40

50

イサルファイト配列決定のために調製した。c t D N A の割合の縦断的变化を定量化して、分子進行または応答をバイナリ法で同定した（例えば、「進行」または「非進行」）。研究評価項目は、第 1 の追跡画像化（F U I）および無増悪生存期間（P F S）の層別化と一致していた。

【0390】

結果は、早期分子進行を伴う患者は、早期分子進行を伴わない他の患者（ $n = 78$ ；中央値 = 263 日、ハザード比（H R）= 12.6 [95% 信頼区間（C I）5.8 ~ 27.3]、ログランク $P < 1E - 10$ 、5 人は分析から除外した）と比較して、より短い無増悪生存期間（P F S）（ $n = 14$ ；中央値 = 62 日）を示した。分子進行を伴うすべての症例を F U I によって確認し、分子進行は中央値 40 日で F U I に先行した。臨床的進行を、治療から 24 日の中央値で、54% の感度、100% の特異性で患者において同定した。

10

【0391】

c t D N A データに基づいて同定した分子進行は、追跡画像化の約 6 週間前に、高い特異性で、治療を受けている症例のがん患者において疾患進行を検出することに成功した。このアプローチは、潜在的に効果的な療法への早期の進路変更を可能にし、それにより、効果のない治療のサイクルと関連する副作用および費用を回避し得る。

【0392】

本開示の方法およびシステムは、重要な翻訳関連性を有し得る。進行性固形腫瘍の治療応答を早期に評価するためのツールは、改良が必要であり得る。本開示の方法およびシステムを使用して、W G c t D N A のベースラインおよび早期連続的評価を実施して、標準治療の臨床およびエックス線撮影評価の前に治療応答を予測した。結果は、血液系予測アプローチが、画像化の約 6 週間前に、複数の異なる腫瘍型および治療型にわたって非常に高い特異性および陽性予測値で、分子進行を確実に同定したことを示した。分子進行を伴う患者は、非進行性患者と比較して、有意に短い無増悪生存期間（P F S）を有した。加えて、腫瘍割合の大幅な量的減少は、有意な耐久性のある利益と関連していた。まとめると、これらの結果は、血液中のがんに関連する変化が臨床または画像化の変化に先行し、長期的な患者の転帰を改善し、コストを制限するために、治療経過の早期で臨床管理の変化を知らせることができることを示す。

20

【0393】

がん患者における進行性固形腫瘍の治療応答を評価するための現在の標準治療は、患者の身体検査、患者から報告された症状、および患者の定期的なエックス線腫瘍評価に基づき得る。しかしながら、疾患における微妙な変化は無症候性であることが多く、頻繁な画像診断と関連するかなりのコスト、不確実性、および患者の不安が存在するため、これらのアプローチは制限され得る。臨床試験では、応答基準が標準化され（例えば、R E C I S T、i r R E C I S T）、治療開始前のベースラインスキャンを、事前に指定された応答基準を使用した定期的な追跡画像化（F U I）と比較することで評価を導く。これらの基準は、経時的な測定信頼性、疾患部位（例えば、骨または胸水）の測定の難しさ、および偽進行（例えば、偽陽性の進行事例）と真の進行（例えば、真の陽性事例）を区別する際の課題によって制限され得る。したがって、臨床治療を管理し、患者への毒性を最小限に抑え、コストを制御するための最善の方法に関する継続的な質問を伴う新しい治療法の出現を考慮すると、治療に対する応答をモニタリングするための改善された方法が有利であり得る。ここでは、治療応答の早期評価のために、W G c t D N A の動的変化を使用して血液系アプローチを評価した。

30

40

【0394】

液体生検アッセイは、循環無細胞 D N A（c f D N A）、循環腫瘍細胞（C T C）、リボ核酸（R N A）、タンパク質、エクソソーム、ミクロビオーム、または代謝物を分析することができる。c t D N A は、アポトーシス、ネクローシス、または遠隔部位での転移および遺伝子発現を促進するための核酸分泌を伴う潜在的な活性機構を経ているがん細胞に由来する可能性があり得る。c t D N A の量は、腫瘍量および／または疾患のより進行

50

した段階と相関し得、腫瘍型、起源、転移の位置、および治療によっても影響を受け得る。c t DNA と非腫瘍 c f DNA との間にはいくつかの際立った特徴があり得る。詳細には、c f DNA と比較して、c t DNA には、腫瘍特異的な体細胞点変異、構造変動、短い断片長、偏った断片の開始および終了位置、ならびにエピジェネティックパターンにおける変化のうちの1つ以上が含まれ得る。ゲノムの一部の欠失、重複、またはより高いコピー増幅を含み得るコピー数異常 (CNA) は、ゲノム全体にわたる様々な部位で進行性疾患を有する患者で観察された構造変動の一般的な形態であり得る。さらに、CNA は、ローパス次世代配列決定 (NGS) によって患者からの c f DNA において検出可能であることが示され、進行性疾患を有する患者ではCNAがより高い割合で検出され得る。しかしながら、進行性がん患者におけるCNAの経時変化は、十分に研究されていない可能性がある。

10

【0395】

最近、進行性固形腫瘍におけるc t DNAの潜在的な臨床的有用性を評価することに大きな関心が寄せられている。例えば、腫瘍量の代替としてのc t DNAゲノム変化および変異対立遺伝子頻度の予後的価値が示され得る。アジュバント療法の設定では、外科手術後の残存c t DNA (例えば、微小残存病変を示す) は、複数の異なる腫瘍型にわたる疾患の再発と関連し得る。進行性疾患では、十分に検証された臨床用途は、既知の薬剤標的によるドライバ変異を同定することであり得る。加えて、耐性変異が血液中で同定され、臨床管理を導き得る。腫瘍応答評価のためのc t DNAの潜在的な役割は、黒色腫、非小細胞肺癌、乳がん、および前立腺がんなどの腫瘍型で評価され得、しかしながら、ルーチン的な評価のための臨床的有用性はまだ確立されていない可能性がある。

20

【0396】

ここでは、前向きに登録された進行期の汎がんコホートで、全ゲノムc f DNA分析を、疾患のルーチン的な臨床的およびエックス線撮影評価と比較して、治療過程の早期の段階で分子マーカーまたは疾患進行の指標として実施した。特定の遺伝子を分析するのとは対照的に、このアプローチは、ゲノム全体にわたるCNAおよび断片化パターン、複数の異なる腫瘍型にわたる広範で潜在的な臨床応用有する技術を利用した。さらに、患者のサブセットについては、バイサルファイト変換をアッセイの一部として実施し、このアッセイは、ゲノム全体のメチル化変化に対する洞察を提供した。血液中のがん関連シグナルの早期変化が、第1のFUI時での応答状態を予測し、シグナルにおける動的変化の程度が、様々な固形腫瘍型および治療にわたって長期的な予後情報を提供すると仮定した。

30

【0397】

対象および患者の研究試料を以下のように取得した。ここでの研究試料は、広く収集した縦断的観察研究のサブセットを表す。2017年5月~2018年12月まで、参加者 (18歳を超える) は、米国における5つの腫瘍学センター (TMPN-Cancer Care, Redondo Beach, CA; Scripps-California Cancer Associates, San Diego, CA; Sharp Memorial Hospital, San Diego, CA; Summit Cancer Centers, Post Falls, ID; Robert H. Lurie Comprehensive Cancer Center of Northwestern University, Chicago, IL) から前向きに登録され、2019年6月まで続いた (表1を参照されたい)。適格性基準には、提示時の非血液学のおよび外科的に切除不能な進行腫瘍 (ステージIII以上) の診断、医師が選択した新しい全身治療レジメンの開始、画像化による測定可能または評価可能な疾患の存在が含まれた。このコホートに含まれるためには、参加者は少なくとも2つの時点、ベースライン (時間 = T0で、治療開始前) ならびにサイクル2 (時間 = T1) および/またはサイクル3 (時間 = T2、図3Aに示す) の前の別の1つからの静脈血試料を有する必要があった。この研究は、ヘルシンキ宣言に従って実施され、Northwestern University、Sharp Memorial Hospital、およびWestern Institutional Review Boardsによって承認された。インフォ

40

50

ームドコンセントを研究に参加する前に各患者から得た。

【表 1】

	中央値 (最小-最大)	N= 92 (%)
年齢	70 (3 0 ~ 8 9)	
性別		
女性		51 (55.4)
男性		41 (44.6)
がんの種類		
肺		40 (43.5)
乳		25 (27.2)
GI		14 (15.2)
GU		6 (6.5)
黒色腫		6 (6.5)
肉腫		1 (1.1)
治療の種類		
化学療法		32 (34.8)
化学療法、抗体		10 (10.9)
免疫療法		25 (27.2)
免疫療法、化学療法		9 (9.8)
内分泌		3 (3.3)
内分泌、CDK4／6 i		7 (7.6)
単独標的		6 (6.5)
治療ライン		
1		48 (52.2)
2		23 (25.0)
3+		21 (22.8)
T 1 (日)	21 (9 ~ 4 0)	86 (93.5)
T 2 (日) *	42 (3 7 ~ 8 4)	66 (71.7)
第 1 の追跡 (日)	71 (2 6 ~ 2 0 8)	
最後の追跡 (日)	140 (3 5 ~ 6 4 5)	

* 6 0 人の参加者は両方の治療後の時点を有した

表 1：参加者の特徴。血液試料の分布および追跡期間は、2 0 1 7 年 5 月～2 0 1 9 年 6 月までの研究中の治療期間に関するものである

【 0 3 9 8 】

図 3 A ～ 3 B は、いくつかの実施形態による、臨床設定の概要を示す。図 3 A は、分子応答を評価するためのエックス線撮影応答評価と、c f D N A の潜在的な使用とを比較する図を示す。図 3 B は、研究中の患者についての画像化および採血のタイミングを示す。

【 0 3 9 9 】

応答状況の評価を以下のように実施した。参加者は、標準治療のルーチン的な臨床評価に従って決定されたように、ベースライン時および第 1 の追跡時に再び放射線学的に評価した。研究の主要評価項目は、エックス線撮影進行の証拠（例えば、固形腫瘍の応答評価基準（R E C I S T）バージョン 1. 1 によって決定される）または臨床応答評価であった。画像化による測定可能な疾患は、治療を行う医師の技術および分子応答の評価を盲検された、独立した放射線科医によって解釈された。画像化が評価できないかまたは欠落しているかのいずれかのために R E C I S T の結果を確認することができなかった場合は、臨床応答評価を使用した。臨床応答は、治療変更前の医師の転帰評価として定義し、臨床進行疾患（P D）、応答性疾患（非 P D）、安定性疾患（非 P D）、または評価するには早期すぎるとして分類した。

【 0 4 0 0 】

P F S は、治療の開始から P D の第 1 の文書化までの時間、または何らかの原因による

死亡のいずれか最初に発生した時間として定義した。生存および無増悪生存期間がない終期のわかった患者は、最後の接触日に打ち切った。患者がもはや研究の一部ではなく、その状態が不明である場合（評価不能の症例）に、患者は追跡不能とみなした。

【0401】

試料調製を以下のように実施した。各時点で、10mLの全血をStreck Cell-Free DNA採血管（BCT）に採取した。血漿を、1600xgで15分間の遠心分離、続いて収集時から7日以内に2500xgで10分間の遠心分離によって分離した。cfDNAを、Qiagen QIAmp MinElute ccfDNAキットを使用して血漿から抽出し、ライブラリ調製まで-80℃で保存した。各患者について、全ゲノム配列決定（WGS）用のKAPA HyperPrepライブラリ調整キット（n=54人の患者）またはNugen Ovation Ultralow Methyly-Seq全ゲノムバイサルファイト配列決定キット（WGBS）（n=43人の患者）を使用してライブラリを調製した。ライブラリ調製物への平均インプットcfDNAは、20ナノグラム（ng）であった。ライブラリは、イルミナHiSeqXプラットフォーム上で平均深度20回（6回～29回の範囲内）で配列決定した。

【0402】

バイオインフォマティクス法を以下のように実施した。腫瘍割合比（TFR）を測定して、CNAを使用してctDNAの変化、およびcfDNA断片長の局所的な変化を評価し、どちらも配列決定データから評価した。読み取りは、BWA、Sambamba、およびSamtoolsに基づくカスタムバイオインフォマティクスパイプラインを使用して、ヒトゲノム（GRCh37）に整列した。次に、読み取りの重複を除外し、deepToolsソフトウェアパッケージを使用してGC傾向を修正した。CNAを、ichorCNAおよびカスタムアルゴリズムに基づくパイプラインを使用して検出した。正規化された断片長は、ライブラリ内の断片長分布の中央値、および複数の影響を受けていないライブラリ全体にわたるゲノム位置を正規化することによって計算した。CNAおよび断片長のバックグラウンドシグナルは、任意の悪性腫瘍の現在または以前の診断を受けていない44人の個体から採取した健常な正常試料を使用して各配列決定プロトコルに対して確立した（表S1を参照されたい）。偽陽性検出を防ぎながらCNAの感度を最大化するために、局所平均断片長とコピー数との間のスピアマンの順位相関をCNAコールセットの不適合物として使用した。

【表2】

	中央値（最小-最大）	N=44 (%)
年齢	64 (27~82)	
性別		
女性		29 (66)
男性		15 (34)
縦断的な試料間の日数	37 (14~180)	
WGS		27 (61)
参加者ごとの時点の数		
2		27 (61)
WGBS		21 (48)
参加者ごとの時点の数		
2		15 (34)
3		6 (14)

表S1：WGSおよびWGBSの両方で処理された44人の健常な参加者を含む、健常な参加者コホートからの縦断的試料

【0403】

患者の時点間でのCNA由来のTFの推定値を直接比較することにより、時間の経過に

伴う c t D N A の変化を評価することは、読み取り深度レベルがどの構造事象に対応するかという曖昧さが存在し得るため、常に信頼できるとは限らない。例えば、2つの領域は、中性レベルが曖昧である高度に変異した腫瘍では、中性領域および複製領域、またはヘテロ接合性欠失および中性領域のいずれかとして呼ばれ得る。この課題を回避するために、複数の時点で検出された C N A を線形モデルで縦断的に比較して、T F R を定量化した。信頼できるコールを決定するために、測定された変化をシミュレートされたバックグラウンドモデルと比較し、3のZスコア閾値を超える必要があった。44人の健常な参加者からの試料の縦断的な比較（表S1）は、T F R の有意な変化を示さなかった。例えば、図8は、いくつかの実施形態による、健常な個体についての縦断的W G S データを示す。この図には、図4Aのように、最初の採血時（上）および34日後（下）で、参加者L B - S 0 0 1 2 9 についてC N A が検出されなかったことを示すゲノムワイドプロットが含まれる。いずれかの時点で腫瘍割合が確実に増加した（例えば、T F R が1より大きいこと示される）症例は、分子進行として分類した。主要分子応答（M M R）は、T F R < 0.1と定義した。

10

【0404】

統計分析を以下のように実施した。感度、特異性、陽性予測値、および陰性予測値を計算する目的で、真の陽性は、アッセイが分子進行を示し、臨床的に、または第1のF U I でのR E C I S T 1.1によってのいずれかのP Dとして評価された場合として、真の陰性は、アッセイおよび臨床評価の両方が第1の追跡でP Dを呼び出さなかった場合として定義した。偽陽性および偽陰性は、分子応答評価が第1のF U Iと一致せず、それぞれ、臨床もしくはエックス線撮影進行、または臨床もしくはエックス線撮影進行を欠く事例として定義した。これらの感度、特異性、陽性予測値、および陰性予測値のメトリックの信頼区間は、ウィルソンのスコア間隔法を使用して計算した。

20

【0405】

カプラン・マイヤー法を使用して生存曲線を作成し、ログランク検定を使用して分子進行者と非進行者との間のP F Sの差を評価した。C o x 比例ハザードモデルは、P F S に対する様々な程度の変化の影響を評価するために使用した。生存の統計分析は、R生存パッケージバージョン2.41-3を使用して実施し、他の統計分析は、P y t h o n s c i p y パッケージバージョン1.1.0を使用して決定した。

【0406】

30

患者の特徴を以下のように取得した。研究の組み入れ基準に適合し、適切な長期追跡データを有した、合計97人の進行がんを有する患者を、分析のために試料を取得し、配列決定した。ベースライン血液試料が5人の参加者の配列決定に失敗したため、それらは除外した。N G S および臨床転帰データを有する残りの92人の患者がこの分析に含まれた。年齢の中央値は70歳であり、55%が女性であった（表1を参照されたい）。参加者の約半数が一次治療を受け（52%）、25%が二次治療を受けた。患者の大多数が、肺がん（44%）または乳がん（27%）を有し、残りは、消化器がん（15%）、泌尿生殖器がん（6.5%）、黒色腫（6.5%）、および肉腫（1%）を有した。研究中、全参加者の46%が化学療法（抗体療法を伴うまたは伴わない）を受け、37%が化学療法を伴うまたは伴わずに免疫療法を受けた（n=34、表1、表S2）。第1のF U I は、治療開始後の中央値71日で発生した（図3B、26~208日の範囲）。3人の参加者は、評価不可能な画像化を有し、12週目に臨床的非P Dと評価され、2人の参加者は、治療変更前に画像化を受けておらず、治療を行う医師によって9週目および19週目に臨床P Dとして評価された。全コホートの追跡期間の中央値は、140日（35日~645日の範囲）であった。

40

【表 3 - 1】

薬剤名	薬剤分類	参加者数
アビラテロンアセテート	内分泌	1
アナストロゾール	内分泌	1
アテゾリズマブ	免疫療法	1
アテゾリズマブ、エンチノスタット	免疫療法、HDACi	1
カペシタビン	化学療法	3
カペシタビン、ベバシズマブ	化学療法、抗体	1
カペシタビン、トラスツズマブ、ゾレドロン酸、ツカチニブ	化学療法、抗体	1
カルボプラチン、ドセタキセル、ペルツズマブ、トラスツズマブ、ゾレドロン酸	化学療法、抗体	1
カルボプラチン、エトボシド	化学療法	1
カルボプラチン、ゲムシタビン	化学療法	3
カルボプラチン、nab-パクリタキセル	化学療法	1
カルボプラチン、nab-パクリタキセル、ペムプロリズマブ	免疫療法、化学療法	2
カルボプラチン、パクリタキセル	化学療法	4
カルボプラチン、パクリタキセル、ペムプロリズマブ	免疫療法、化学療法	1
カルボプラチン、ペムプロリズマブ、ペメトレキシド	免疫療法、化学療法	5
カルボプラチン、ペムプロリズマブ、ペメトレキシド、ゾレドロン酸	免疫療法、化学療法	1
カルボプラチン、ペメトレキシド	化学療法	2
カルボプラチン、ペメトレキシド、ベバシズマブ	化学療法、抗体	1
シスプラチン、エトボシド	化学療法	4
シクロホスファミド、メトトレキサート、トラスツズマブ	化学療法、抗体	1
ドセタキセル、ペルツズマブ、トラスツズマブ	化学療法、抗体	2
ドセタキセル、ゾレドロン酸	化学療法	1
エリブリン	化学療法	1
エルロチニブ	標的	1
フルベストラント、デノスマブ	内分泌、CDK4/6i	1
フルベストラント、パルボシクリブ	内分泌、CDK4/6i	2
フルベストラント、パルボシクリブ、ゾレドロン酸	内分泌、CDK4/6i	1
ゲムシタビン、シスプラチン	化学療法	1
ゲムシタビン、nab-パクリタキセル	化学療法	4
イピリムマブ、ニボルマブ	免疫療法	1
イリノテカン、5-FU	化学療法	1
ラパチニブ、トラスツズマブ	標的	1
レトロゾール	内分泌	1

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

アナストロゾール、リュープロリドアセテート、パルボシクリブ	内分泌、CDK4/6i	1
レトロゾール、パルボシクリブ	内分泌、CDK4/6i	1
レトロゾール、リボシクリブ	内分泌、CDK4/6i	1
リボソームドキシソルビシン	化学療法	2
リボソームドキシソルビシン、ゾレドロン酸	化学療法	1
nab-パクリタキセル	化学療法	2
ネラチニブ	標的	1
ニボルマブ	免疫療法	11
オララツマブ、ドキシソルビシン	化学療法、抗体	1
オキサリプラチン、5-FU、パニツムマブ	化学療法、抗体	1
パゾパニブ	標的	2
ペムプロリズマブ	免疫療法	9
ペムプロリズマブ、ゾレドロン酸	免疫療法	1
ペメトレキセド	化学療法	1
ラムシルマブ、パクリタキセル	化学療法、抗体	1
レゴラフェニブ	標的	1
ニボルマブ、ゾレドロン酸	免疫療法	1
全体集計		92

表 S 2 : 薬剤名および薬剤分類による参加者の要約を含む、研究中の治療法のリスト

【0407】

ベースライン血液試料を、すべての患者の治療開始前に収集した（図 3 B、中央値＝治療開始後 0 日、最小＝治療開始の 19 日前）。治療開始後の中央値 21 日で治療の第 2 のサイクルの前に試料 T 1 を収集し（ $n = 86$ 、9～40 日の範囲）、中央値 42 日で治療の第 3 のサイクルの前に試料 T 2 を収集して（ $n = 66$ 、37～84 日の範囲）、各患者について 1 つまたは 2 つの治療後試料を収集した。両方の治療後試料は、60 人の患者について収集した。

【0408】

図 4 A～4 E は、いくつかの実施形態による、分子進行を決定するための c t D N A の連続評価を示す。図 4 A は、患者 L S 0 3 0 1 7 8 で検出された C N A のゲノムワイドプロットを示す。T 0 ベースライン採血は、治療開始の 13 日前に収集され、T 1 は、治療開始の 21 日後に収集された。図 4 B は、正規化された断片長が C N A と比較して逆パターンを示すことを示す。図 4 C は、全体として、各ゲノム位置での正規化された断片長と推定コピー数との間に強い負の相関関係があったことを示す（Spearman の $\rho = -0.57$ 、 $P < 1E-10$ ）。図 4 D は、患者 L S 0 3 0 1 7 8 が、進行性疾患を示す画像化に先行して検出可能な、追跡時点 T 1 および T 2 で T F R の増加を有したことを示す。図 4 E は、療法に応答した患者 L S 0 3 0 0 9 3 が、部分的応答を示した後の画像化と一致して、T 1 および T 2 で T F R の著しい減少を示したことを示す。

【0409】

c t D N A の連続測定は、治療の早期に急速な変化を示した。腫瘍割合の変化を、W G 分析を使用して評価して、ベースライン試料と治療後試料との間の T F R を定量化した。T F R の実質的な変化を治療開始後早期に観察した（図 4 A～4 D）。患者 L S 0 3 0 1 7 8 は、治療の第 1 のサイクルに続く、時間 T 1 で T F R が 2.4 に急速に増加する実施例を示し、ベースラインからの大幅な増加と、それに続く時間 T 2 でのさらに大きい増加を示す（図 4 A～4 D）。この患者は、第 1 染色体（1 q）の長腕の体細胞傾向を示し、これは、乳がんにおいて最も一般的な腕レベル異常の 1 つであり得る。加えて、C N A の強いパターンは、断片化パターンによって裏付けられた（図 4 B～4 C）。逆に、患者 L

S 0 3 0 0 9 3 は、時間 T 1 で T F R の減少を示し、その後、時間 T 2 でより大きい減少を示した（図 4 E）。

【 0 4 1 0 】

試料のサブセットは、W G S および W G B S の両方を有し、これらを使用して、T F R を配列決定プロトコル全体にわたって同等に定量化することができるかを試験した。図 9 は、いくつかの実施形態による、配列決定プロトコル全体にわたる腫瘍割合の比較を示す。この図は、W G S および W G B S の両方で処理された 13 人の参加者からの 20 個の治療後試料についての結果を示す。第 1 の F U I での P D を有する患者からの 2 つの試料は、分子進行の一致した分類を有さず、T F R の測定値はコール境界に近かった。T F R 値は、W G S および W G B S の間で非常に一致しており、両方のプロトコルで分析した試料を含む完全なコホートの分析を可能にした。

10

【 0 4 1 1 】

図 5 A ～ 5 C は、いくつかの実施形態による、療法の第 1 または第 2 のサイクルが進行を予測した後の c t D N A 評価を示す。図 5 A は、第 1 の F U I（R E C I S T 1. 1 によって評価された S L D）での画像化結果と分子進行の c t D N A 評価との比較を示し、いずれかの治療後試料の T F R の確実な増加によって示される（感度 = 54 %、特異性 = 100 %、P P V = 100 %、N P V = 85 %）。脚注のある事例は、明らかな臨床的進行を示した。図 5 B は、P D または非 P D のエックス線撮影または臨床評価と比較した、T 1（左）および T 2（右）での進行者および非進行者の T F R を示し、各時点での予測性能を示す。図 5 C は、分子進行を有する患者について、分子進行の検出が、中央値 40 日（- 21 日～103 日の範囲）による標準治療画像化による進行の検出の日付に先行することを示す。

20

【 0 4 1 2 】

早期時点で腫瘍割合の変化を追跡することは、第 1 の追跡応答評価で進行が予測される。第 1 の F U I および臨床評価では、92 人の患者のうち 26 人が臨床的 P D を有し、66 人の患者が非 P D を有していた。c t D N A アッセイの予測値を評価するために、すべての患者について、分子進行の分類を第 1 の F U I での臨床評価と比較した（図 5 A）。T 1 または T 2 のいずれかで分子進行を示した 14 人の患者全員が P D を有し、同様に非 P D であった 66 人の患者のうち、分子進行を示した患者はいなかった。時点 T 1 および T 2 を含むアッセイの感度は 54 % であり、特異性は 100 % であった。感度は T 1 で 42 % であり、T 2 で 61 % であった（図 5 B）。感度と採血のタイミングとの間に統計的に有意な関係はなかった。図 10 は、いくつかの実施形態による、試料採取のタイミングおよび感度を示す。この図は、第 1 の F U I で P D を有する 26 人の参加者からの 42 個の試料についての分子進行および血液試料採取のタイミングを示す（2 試料のコルモゴロフスミルノフ検定、 $P = 0.15$ ）。分子進行が呼び出された場合、それが最初に同定された時点は、中央値 40 日による画像化による進行の検出に先行した（図 5 C）。

30

【 0 4 1 3 】

画像化と進行の分子評価との間に不一致があった第 1 の F U I での P D を有する患者 12 人のうち、3 人の患者は、確信のある C N A が検出されず、2 人の患者は、腫瘍割合に有意な変化がなく、7 人の患者は腫瘍割合が、減少した。腫瘍割合が減少した不一致の症例では、様々ながん表現型（3 つの乳がん、2 つの肺がん、1 つの腎がん、1 つの肉腫がん）、治療（4 つの化学療法、1 つの免疫療法、1 つの内分泌療法、1 つの標的療法単独）、および一連の治療（3 つの一次治療、2 つの二次治療、1 つの三次治療、および 1 つの五次治療）があった。加えて、W G S と W G B S との間で予測性能に大きい差異はなかった（表 S 3）。

40

【表 4】

患者サブセット	F U I での評価	c t DNA結果	
		分子進行	分子進行なし
すべての患者	PD 非PD	14 0	12 66
WGS	PD 非PD	11 0	11 32
WGBS	PD 非PD	3 0	1 34

表 S 3 : 配列決定プロトコルによる第 1 の F U I での分子進行および評価

【0 4 1 4】

図 6 A ~ 6 I は、いくつかの実施形態による、療法の経過における初期での分子応答評価が有利な P F S と関連していたことを示す。図 6 A は、完全なコホート ($n = 92$) が 211 日の中央値 P F S を有したことを示す。図 6 B は、T 1 または T 2 で c f D N A から検出された分子進行を有する患者 ($n = 14$ 、中央値 P F S = 62 日) が、分子進行を有しない患者と比較して有意に不良な P F S を有したことを示す ($n = 78$ 、中央値 P F S = 263 日 ; $HR = 12.6$ [95 % C I : 5.8 ~ 27.3] ; ログランク $P < 1E - 10$)。図 6 C ~ 6 D は、化学療法を伴うまたは伴わない免疫療法を受けている患者 ($n = 34$; ログランク $P = 2E - 12$) (図 6 C)、標的療法を伴うまたは伴わない化学療法を受けている患者 ($n = 42$; ログランク $P = 7E - 6$) (図 6 D) についての治療様式に基づくサブセット分析を示す。図 6 E ~ 6 F は、肺がん患者 ($n = 40$; ログランク $P = 8E - 8$) (図 6 E) および乳がん患者 ($n = 25$; ログランク $P = 3E - 4$) (図 6 F) についてのがん種に基づくサブセット分析を示す。図 6 G は、MMR を伴う患者が、分子進行に基づく予測を考慮した後、有意に長い P F S を有したことを示す ($Cox P = 0.011$)。図 6 H ~ 6 I は、応答状態 (ログランク $P = 0.4$) (図 6 H) または MMR (ログランク $P = 0.02$) (図 6 I) によって層別化された第 1 の F U I ($n = 65$) でのエックス線撮影によって決定された安定性疾患または部分的応答のいずれかを伴う患者のサブセット分析を示す。

【0 4 1 5】

治療の早期に c f D N A によって評価した分子応答パターンは P F S と関連していた。患者の全コホートの P F S 中央値は 211 日であった (図 6 A)。T 1 または T 2 のいずれかで分子進行を伴う患者 ($n = 14$) は、分子進行を伴わない患者 ($n = 78$) での 263 日と比較して、 $HR = 12.6$ (5.8 ~ 27.3 の 95 % C I ; ログランク $P = 7E - 16$) および中央値 P F S が 63 日で、より短い P F S を有した (図 6 B)。

【0 4 1 6】

アッセイの予測性能を、腫瘍起源および治療の種類に基づいて患者のサブセットで調査した。免疫療法を受けた 34 人の患者のうち、P F S は、分子進行が同定されていない患者 (中央値 167 日の追跡後に中央値 P F S に到達しなかった、ログランク $P = 2E - 12$) と比較して、分子進行を伴う患者 (中央値 P F S = 57 日) で有意に短く、コホート全体と一致していた (図 6 C)。結果は、化学療法サブセットでも同様であり、P F S の中央値は分子進行を伴う患者では 56 日、進行を伴わない患者では 212 日であった (図 6 D ; $n = 42$; ログランク $P = 7E - 6$)。

【0 4 1 7】

P F S は、肺がん (図 6 E ; ログランク $P = 8E - 8$) および乳がん (図 6 F ; ログランク $P = 3E - 4$) の 2 つの最大サブセットについての分子進行を伴う患者でも有意に短かった。これは、混合がん型の残りのサブセット (胃腸、泌尿生殖器、黒色腫、および肉腫) にも当てはまった (ログランク $P = 5E - 6$)。図 11 は、いくつかの実施形態によ

る、他のがんについての分子応答評価および P F S を示す。この図は、図 6 E ~ 6 F のようにプロットされた、非肺非乳がん ($n = 27$; ログランク $P = 5 E - 6$) を示す。第 1 の F U I での進行の予測も、これらのサブセットにわたって同等の性能を示した (表 S 4) 。まとめると、これらのデータは、アッセイが複数の異なるがんの種類および治療法にわたって有効であったことを示す。

【表 5】

患者サブセット	F U I での評価	c t D N A 結果	
		分子進行	分子進行なし
免疫療法 (+/-化学療法)	PD	5	2
	非 PD	0	27
化学療法 (+/-標的療法)	PD	4	7
	非 PD	0	31
肺がん	PD	4	4
	非 PD	0	32
乳がん	PD	5	5
	非 PD	0	15
肺がんなし 乳がんなし	PD	5	3
	非 PD	0	19

10

20

表 S 4 : がんおよび治療の種類のサブセットに対する第 1 の F U I での分子進行ならびに評価

【0418】

さらに、結果は、治療経過の早期の大幅な量的低減が、改善した P F S と関連していることを示した。アッセイが分子進行を示さなかった 78 人の患者のうち、27 人の患者は、いずれかの治療後の時点で M M R を有した。特に、M M R が T 1 で同定されたすべての事例において、その時点が利用可能であれば、この所見は T 2 でも観察した ($n = 12$) 。7つの事例において、ベースラインからの T F R は、T 1 で 10 倍の減少に到達しなかったが、例えば、患者 L S 030093 (図 4 E) について、T 2 で到達した。M M R を伴う患者は、M M R を伴わず分子進行がない患者 ($n = 51$; 211 日の中央値 P F S) と比較して、より長い P F S を有した (図 6 G、P F S 中央値に達していない)。M M R は、分子進行に基づく予測 (層別化 C o x : 分子進行 $P = 4 E - 9$ 、M M R $P = 0.011$) を考慮した後、P F S を有意に予測し、長期治療効果を予測するための早期の定量的 c t D N A 動態の値を示す。

30

【0419】

次に、エックス線撮影応答モニタリングと組み合わせた M M R の予測値を評価した。第 1 の F U I でエックス線撮影進行を示さなかった患者 ($n = 65$) の場合、R E C I S T 1.1 系部分奏効対第 1 の F U I での安定性疾患は、P F S の限定された予後値を有した (図 6 H ; ログランク $P = 0.4$; H R = 0.67 [0.28 ~ 1.60 の 95% C I]) 。しかしながら、同じサブセットの中で、M M R を伴う患者は、実質的により長い P F S を有し (図 6 I ; ログランク $P = 0.02$; H R = 0.28 [0.09 ~ 0.84 の 95% C I]) 、これは、第 1 の F U I でエックス線撮影評価を調整した後も有意であった (層別化 C o x : 部分応答 $P = 0.36$ 、M M R $P = 0.016$) 。図 12 A ~ 12 B は、いくつかの実施形態による、第 1 の F U I での非 PD を有する患者についての M M R および P F S を示す。これらの図は、エックス線撮影での部分奏効 ($n = 30$) (図 12 A) または安定性疾患 ($n = 35$) (図 12 B) のすべての患者からの結果を示す。

40

【0420】

メチル化レベルの縦断的变化は、腫瘍割合変化を補完し得る。全体的な低メチル化は、腫瘍ゲノムの顕著な特徴であり得、c f D N A の全体的なメチル化レベルの増加は、それ

50

が c t D N A の減少した割合を示し得るため、非進行と関連し得る。重要なことに、全体的な低メチル化を含む、腫瘍で観察されるエピジェネティックなパターンは、c t D N A で検出され得る。療法への早期応答を同定するためのメチル化変化の可能性を評価するために、ベースラインから治療後までのゲノム全体のメチル化レベルの変化を、2人の例示的な患者について遡及的に調べた（図 7 A ~ 7 B）— 1 人は第 1 の F U I の非 P D コール（L S 0 3 0 0 8 3）を伴い、1 人は第 1 の F U I で P D コールを伴う（L S 0 3 0 0 7 8）。第 1 の F U I の臨床評価と一致して、メチル化レベルの顕著な増加が L S 0 3 0 0 8 3（図 7 A）で観察されたのに対し、L S 0 3 0 0 7 8（図 7 B）では減少が観察された。患者 L S 0 3 0 0 7 8 の場合、C N A および局所的な断片化変化（T F R = 2 . 0 1）に基づいて明確な分子進行が観察されたが、L S 0 3 0 0 8 3 では C N A は検出されなかった。

10

【 0 4 2 1 】

図 7 A ~ 7 B は、いくつかの実施形態による、メチル化が応答モニタリングについて C N A に直交性シグナルを提供し得ることを示す。これらの図は、ベースライン（黒線）および T 1 または T 2 のいずれか（オレンジ線）での患者 L S 0 3 0 0 8 3（図 7 A）および L S 0 3 0 0 7 8（図 7 B）についてのゲノムワイド 1 メガベースピンの平均メチル化レベルの分布を示す。

【 0 4 2 2 】

進行悪性腫瘍を有する患者は、治療効果を評価し、生活の質を促進し、薬物毒性を制限するために、注意深い治療モニタリングを必要とし得る。しかしながら、臨床およびエックス線撮影評価を使用する疾患モニタリングの現在の方法では、治療応答を確信的に決定するのに数ヶ月必要とし得る。ここでは、改善された全ゲノム c f D N A 分子応答アッセイの有用性を評価し、これは、ベースライン時および治療の初期サイクル中の縦断的 c t D N A 測定値を分析して、治療への応答を予測した。この技術は、100%の特異性および陽性予測値（P P V）の両方で疾患進行を予測し、このアッセイが現在の標準治療よりも 6 週間早い中央値で疾患進行を高い確信性および信頼性で予測することができたことを示す。この発見は、治療経過の早期で進行している進行腫瘍が、現在の画像化スケジュールおよび解釈によって検出され得る標的病変のサイズ、輪郭、または密度の目に見える変化のかなり前に、血液中の観察可能なシグナルとして反映され得ることを示す。

20

【 0 4 2 3 】

これらの結果は、いくつかの他の重要な発見を示す。第 1 に、血液系全ゲノム c t D N A 分子アッセイは、腫瘍特異的変異および融合の標的評価を超えて見ることにより、様々な腫瘍および治療の種類にわたって一貫して疾患の進行を予測するよう思われた。詳細には、患者数が最も多い 2 つのコホート（肺がんおよび乳がん）のサブセット分析で統計的に有意な結果が示され、これは、非肺がん患者および非乳がん患者でも集合的に観察された。同様の予測値が、化学療法または免疫療法を受けた患者を含む、異なる治療にわたって見られた。

30

【 0 4 2 4 】

これらの発見は、本開示の方法およびシステムが、特定の患者コホート（例えば、免疫療法のみで治療されたコホート）のための改善された C N A 系アプローチを表すことを示している。第 2 に、結果は、M M R を伴う患者は、変化のない患者または T F R の減少が小さい患者と比較して、より長い P F S を有したことを示し、治療に対する初期応答の程度に定量的な値があったことを示す。得られたデータでは、部分奏効対安定性疾患の R E C I S T 1 . 1 分類と比較して、P F S はアッセイによって測定された奏効の程度とより強く関連し、部分奏効対第 1 の F U I の安定性のエックス線撮影評価が、場合によっては長期予後的価値を制限し得ることを示す。M M R を同定することの追加の予後的価値は、連続 c f D N A 試料の画像化および分析を統合して、長期にわたる疾病制御の早期兆候を提供する可能性を支持する。

40

【 0 4 2 5 】

c f D N A の連続測定による分子応答モニタリングは、疾患制御および疾患進行の両方

50

の評価に潜在的な臨床的利益をもたらす。例えば、MMRが観察された場合、現在の治療レジメンが有効であるという早期の保障を使用して、臨床画像化の頻度を制限することができる。対照的に、血液系分子進行の早期予測は、腫瘍学者が効果のない治療を中止するように導き、それによって回避可能な副作用および経済的致命性を低減する。臨床決定ループを加速することにより、患者は、代替の潜在的に効果的な療法に変更する機会を与えられ得る。この評価アルゴリズムは、臨床治験を含む複数の治療ラインに従事するのに十分な性能状態を有する患者の可用性を増加し得る。さらに、血液系アッセイは、血液試料が治療の各サイクル中に定期的に収集されるため患者に好都合である。

【0426】

アッセイの特異性が非常に高く、これは高度な設定での臨床的有用性の重要な性能指標であるが、特に早期の時点での感度は、がん関連のエピジェネティックシグナルなどの他の機能を含めることによって改善され得る。例えば、患者LS030083では、ベースラインから治療後までゲノム全体のメチル化レベルが著しく増加し、第1のFUIでの非PDコールと一致したが、CNAは検出されなかった（図7A）。したがって、これらのメチル化系シグナルは、断片長およびコピー数の情報とともにアッセイに組み込まれ、低い腫瘍割合を伴う試料についてのアッセイ感度を増加し得る。しかしながら、追加の直交シグナルであっても、十分なctDNAを生成しない腫瘍（例えば、非脱落腫瘍）、治療の早期のサイクルで依然として進行していない腫瘍、ならびに／またはctDNA分析および画像化による分子進行が一致していない腫瘍からの偽陰性率が残存し得る。さらに、拡大された患者コホートを使用して、アッセイの腫瘍および治療に依存しない性質を確認することができる。さらに、予測ツールの前向き検証を実施することができる。独立した検証コホートを調査して、適応臨床治験デザインを使用した治療変更が、血液系分子応答評価を使用して異なる治療群に迅速に切り替えることにより、コストを制限し、長期的な患者の転帰を改善する方法を評価することができる。

【0427】

結論として、結果は、ローパス配列決定を用いて全ゲノムctDNAを分析する一連のモニタリングアプローチが、標準治療の臨床評価と比較して、高度な特異性およびPPVを備える臨床予測を生成することを示した。加えて、発見は複数の腫瘍および治療の種類にわたって一貫しており、ctDNA低減の程度は長期的な臨床転帰と相関していた。この非侵襲的ツールは、進行性がん患者を潜在的に効果的な療法とより正確に早期に一致させることができ、それによって効果のない治療と関連する副作用およびコストを制限する。

【0428】

実施例2：治療応答を追跡するためのcfDNAメチル化および断片長の使用

本開示の方法およびシステムを使用して、がん療法に対する患者応答を理解するために、cfDNAの断片を分析することに基づいてモデルを開発した。

【0429】

概して、腫瘍由来のcfDNA（ctDNA）の断片は、非がん性組織からのcfDNAよりも短く、ctDNAはまた、メチル化のより低い全体的なレベルを有する。したがって、この情報を使用して、コピー数異常（CNA）のコールを裏付けるモデルを開発した。

【0430】

メチル化パターンがCNAコールと一致する程度、および断片長パターンがCNAコールと一致する方法を評価した。実際には、これは、すべてのゲノムビン（例えば、ゲノムにおける500キロベース領域ごと）における平均メチル化および／または断片長と、その領域のコピー数との間の相関関係を定量化することにより、対象（例えば、患者）のライブラリごとに行った。

【0431】

正確にコールされるCNAを伴う真のがん患者では、予想された観察結果は、腫瘍のコピー数ならびに平均メチル化率および平均断片長の両方の間の反相関である。これは、コ

10

20

30

40

50

ピー数が増加している領域では（例えば、すべての非腫瘍細胞の2コピーと比較して、腫瘍のコピー数は3以上である）、血液中のcfDNAの大部分が腫瘍由来であるためである。対照的に、腫瘍が1つのコピーしか有しないゲノムの領域では、cfDNAのより小さい割合が腫瘍細胞に由来するため、より長い断片長およびメチル化が予想される。

【0432】

スピアマンのrho（または代替的に、ピアソンのRなどの相関の別の統計的検定）によって測定されるこれらの相関係数は、試料の特定のCNAコールのセットが、配列決定データにおけるノイズが原因で発生するのではなく、真に腫瘍由来であることを評価する独立したアプローチである。これにより、CNAコールの特異性が改善し、偽陽性が少なくなり、最終的には、治療に対する患者の応答または非応答の縦断的なモニタリングを実施するためのより効果的なアプローチが可能になる。

10

【0433】

したがって、本開示の方法およびシステムを使用して、cfDNAの断片長および／またはメチル化データを利用して、CNAコールの特異性を改善した。

【0434】

実施例3：cfDNAの全ゲノムおよびメチル化シグナルの組み合わせに基づく腫瘍進行のモニタリング

本開示の方法およびシステムを使用して、腫瘍進行は、cfDNA試料の全ゲノム配列決定およびメチル化認識配列決定（メチル-seq）から取得される2つのシグナルの組み合わせに基づいて実施した。例えば、腫瘍進行についての組み合わせスコアは、以下のアプローチを介した酵素的メチル-seqに基づいて計算され得る。

20

【0435】

第1に、CNA系腫瘍割合比（TFR）を決定した。これは、ベースライン時点での患者からの第1のcfDNA試料、およびその後の追跡時点での患者からの第2のcfDNA試料を分析し、次に、追跡時点から患者のベースライン時点までの読み取り深度ライブラリを比較することによって実施され得る。

【0436】

次に、第2のがん関連シグナルを、実施例4に記載されているように、メチル化分析に基づいて決定した。次に、全ゲノムおよびメチル化シグナルを、第1の追跡時点とベースライン時点との間の腫瘍割合の倍率変化の組み合わせ予測に組み合わせた。全ゲノムおよびメチル化シグナルは、ロジスティック回帰の使用、対数変換された値の加重平均（例えば、幾何平均に相当）の使用、または特定の患者のプロファイルの各測定値の推定統計精度を考慮した加重平均の使用を含む、様々な方法を使用して組み合わせることができる。

30

【0437】

簡易的な使用のために、組み合わせた比率は、正規化、スケーリング、または0～200のスケールなどの好都合なスケールでの組み合わせスコアに変換され得る。例えば、これは以下の変換を使用して実施され得る：スコア＝最大スコア／（1＋1／比率）。スコア100はベースラインスコアであり、より高いスコアが不良な転帰を示し（例えば、さらなる腫瘍進行、より低い分子応答）、より低いスコアが良好な転帰を示す（例えば、少ない腫瘍進行、またはなし、より高い分子応答）。このスコアリング評価に基づいて、患者を、分子進行、主要分子応答（MMR）、および非進行または主要分子応答なしの3つの分類のいずれかに割り当てた。

40

【0438】

分子進行（MP）を、腫瘍割合の統計的に有意な増加として定義し、一方でMMRを、ベースライン時点から追跡時点までの腫瘍割合の有意な（例えば、少なくとも10倍）減少として定義した。

【0439】

図13A～13Bは、患者コホートにおけるこれらの3つの患者カテゴリ（MP、MMR、およびMPもMMRもなし）の各々についての Kaplan-Meier 無増悪生存期間（PFS）および全生存期間（OS）プロットの例を示す。これらの図は、生存曲線が互い

50

に高度に分離されていることを示す。さらに、分子進行の予測は、高い特異性でエックス線撮影進行を予測する。

【0440】

実施例4：cfDNAのメチル化シグナルに基づく腫瘍進行のモニタリング

本開示の方法およびシステムを使用して、様々な異なるアプローチを使用して、cfDNA試料のメチル化プロファイルからがん関連シグナルを抽出し、がん関連シグナルに基づいて腫瘍進行をモニタリングすることができる。例えば、かかるアプローチは、CpGアイランド、ショア、PMD、プロモーター、遺伝子ボディ、反復要素、既知のがん遺伝子、および単一CpG部位におけるメチル化割合からのシグナルを測定することを含み得る。特に、cfDNAからのCNAデータをかかる腫瘍進行法に組み込むことは、CNAコールの直交法により、既知の腫瘍割合を有する試料のセットに対して強力な正則化を伴う線形回帰（または別の種類のモデル）を使用してメチル化腫瘍割合モデルを訓練することにより、増加した感度（全ゲノムデータを使用する場合と比較して）を伴う腫瘍進行のモニタリングを有利に改善することを示した。

10

【0441】

メチル化シグナル抽出は、がん患者からの所与のcfDNA試料の腫瘍割合、または試料が影響を受けていない対照対象からのものであるという事実がCNAパターンから確信的に決定され得る、すべてのライブラリを同定することを含み得る。

【0442】

次に、かかるライブラリごとに、ゲノム内のすべてのCpGアイランド（または代替的に、ショアまたはプロモーターなどの別のクラスの領域）の平均メチル化割合をメチル化配列決定から決定した。メチル化配列決定データは、例えば、cfDNA試料の全ゲノムバイサルファイト配列決定または酵素的メチル配列決定によって生成され得る。

20

【0443】

次に、回帰またはモデリング（例えば、線形回帰、単純回帰、バイナリ回帰、ベジアン線形回帰、多項式回帰、ガウスプロセス回帰、バイナリ回帰、ロジスティック回帰、非線形回帰など）を、好適な交差検証アプローチ（例えば、1人の参加者を除外する交差検証）を使用して、メチル化パターンに対する既知の腫瘍割合の正則化を伴って実施した。これらの結果から、cfDNA試料の腫瘍割合の予測を、本開示の方法およびシステムを使用して、メチル化パターンに基づいて生成することができる。

30

【0444】

メチル化シグナルアプローチは、CNAシグナルが低いまたは検出できない場合であっても、cfDNAにおけるメチル化割合の推定を生成する。次に、メチル化シグナルを、スコアリングのための組み合わせモデル（例えば、実施例3で記載したように）、および／または時点間での比較（例えば、ベースライン時点および1つ以上の後続の追跡時点）で使用した。

【0445】

他のアプローチを使用して、cfDNA試料からがん関連のメチル化シグナルを抽出することができる。例えば、重量を主成分分析を使用して計算することができる（例えば、第1に、最も重要な主成分は、データ中に存在する他のバリエーションに応じて、がんまたはおそらくサブシーケンス主成分と高度に関連していることが観察され得る）。別の例として、主成分分析を適用する前に、断片長に基づいて配列決定読み取りをフィルターにかけ、腫瘍由来読み取り値を強化することができる。別の例として、メチル化ハプロタイプ負荷（MHL）は、メチル化ハプロタイプ遮断で決定され得、逆MHL（MHLと同様であるが、非メチル化遮断について）が計算され得る。これらのアプローチのいずれか1つまたは組み合わせを使用して、配列決定またはメチル-seqデータからがん関連メチル化シグナルを生成することができる。これらのいずれか1つまたは組み合わせを使用して、本明細書に記載の腫瘍割合モデリングへインプットすることができる。

40

【0446】

実施例5：治療応答の予測に向けて腫瘍遺伝子発現を予測するためのcfDNAの使用

50

メチル化は、遺伝子発現の制御に強力な役割を果たし得る。一般に、遺伝子プロモーター領域のメチル化が、遺伝子発現を抑制することが観察され得る。一例として、がんにおける異常なメチル化の側面は、通常の高いレベルのがん遺伝子プロモーターメチル化の損失であり、これは、がん遺伝子の過剰発現をもたらし、したがって、よりがん性状態をもたらす。特に、MAGE（メラノーマ関連抗原）ファミリーの遺伝子は、多くのがんの種類におけるこの異常なメチル化の典型的なものである。したがって、液体生検による対象のcfDNAのメチル化状態の分析を介して遺伝子過剰発現を試験する能力は、かかる過剰発現されたがん遺伝子のうちの1つを標的とする薬剤候補が開発されている場合などに有利であり得る。

【0447】

本開示の方法およびシステムを使用して、目的の遺伝子の腫瘍および健常な組織にわたって平均化された総メチル化レベルを、対象の生物学的試料の液体生検分析を介して測定した。MAGE遺伝子の事例では、メチル化レベルが、精巣以外のすべての正常な成人組織で恒常的に高いことが知られている。したがって、低減したメチル化がMAGEプロモーターで観察された場合、これは対象の腫瘍を示す可能性が高い。図14A～14Cは、3つのMAGE遺伝子（MAGEA1、MAGEA3、およびMAGEA4）で観察されたメチル化の強い平均減少の例を示す。図14A～14Cに見られるように、メチル化の強い平均減少が、複数の患者の3つの異なるMAGE遺伝子で観察され、これは、ゲノム全体の低メチル化レベルを超えていた。この結果は、血液中に十分な循環腫瘍DNA（ctDNA）（例えば、腫瘍由来のcfDNA）を有する患者の場合、正常組織でメチル化が抑制された一連の遺伝子があることを示す。この遺伝子のセットについて、腫瘍における低メチル化および発現は、本開示の方法およびシステムを使用して、分析および測定することができる。

【0448】

全体として、腫瘍細胞は、MAGEのプロモーターなどの生殖細胞系発現遺伝子の異常な低メチル化を示し、それが過剰発現を引き起こし、それによってがん患者の結果、転帰、および予後の不良をもたらす得る。本開示の方法およびシステムを使用して、これらの遺伝子の低メチル化を検出し、これにより、液体生検を介して（例えば、腫瘍組織生検または他の侵襲的アッセイを必要とせずに）これらの遺伝子を標的とする標的療法の個別選択が可能となる。

【0449】

本開示の方法およびシステムは、1つ以上のアルゴリズムの方法によって実施することができる。アルゴリズムは、中央処理装置205による実行時にソフトウェアによって実装することができる。このアルゴリズムは、例えば、治療の経過にわたって患者からの複数の試料における特定のCNAシグナルの強度の変化を定量化することによって、WGSデータを処理して、cfDNA分子のコピー数異常（CNA）および断片長を決定し、CNAを処理して、CNAプロファイル変化を決定し、断片長を処理して、断片長プロファイル変化を決定することができる。図15Aおよび15Bに示されるように、かかるアプローチは、CNAに基づいて別々の試料中の腫瘍割合を別々に定量化することから生じる特定のエラーモードの傾向をより少なくすることができる。

【0450】

本発明の好ましい実施形態が本明細書に示され、記載されてきたが、かかる実施形態が例としてのみ提供されることは当業者には明らかであろう。本発明は、本明細書内で提供される特定の実施例によって限定されることを意図するものではない。本発明は、前述の明細書を参照して記載されてきたが、本明細書の実施形態の記載および図面は、限定的な意味で解釈されることを意図するものではない。多数の変形、変更、および置換が、本発明から逸脱することなく、ここで当業者に着想されるであろう。さらに、本発明のすべての態様は、様々な条件および変数に依存する、本明細書に記載の特定の描写、構成、または相対的な比率に限定されないことを理解されたい。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する様々な代替物が、本発明を実施する際に使用され得ることが理解されるべきであ

10

20

30

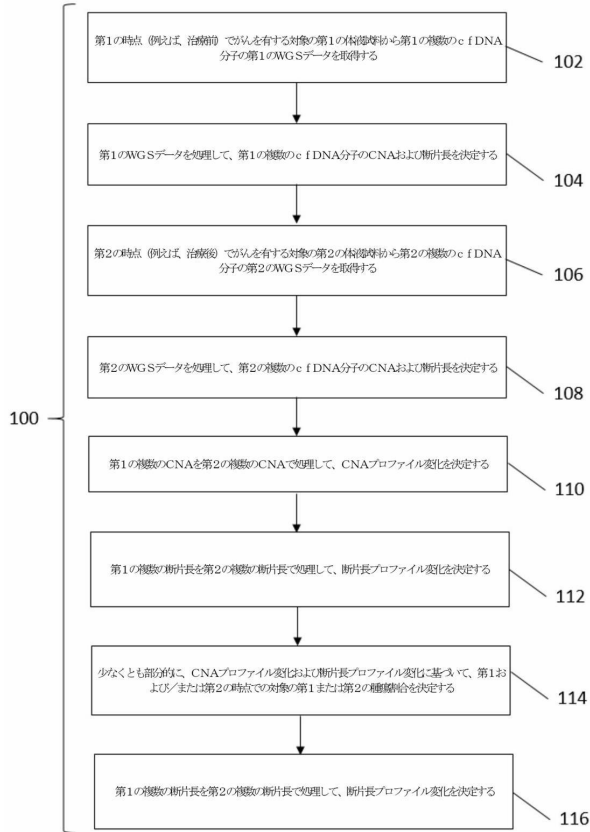
40

50

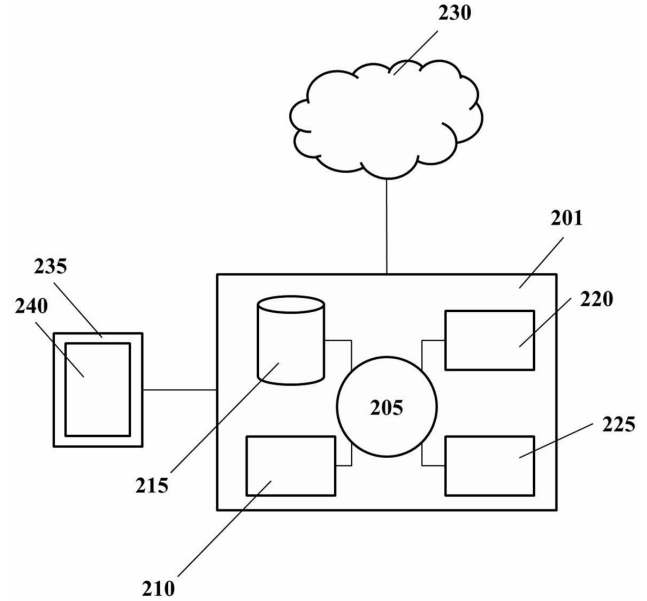
る。したがって、本発明は、任意のかかる代替物、修正、変形、または同等物も網羅するものとして考慮される。以下の特許請求の範囲は、本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造、ならびにそれらの同等物が、それによって網羅されることが意図される。

【図面】

【図 1】



【図 2】

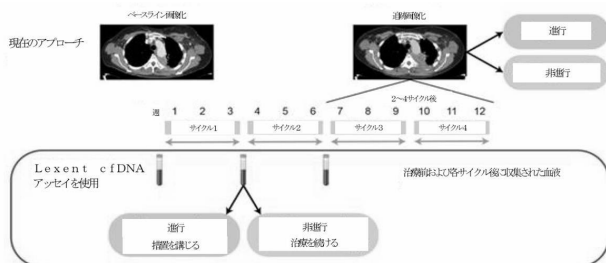


10

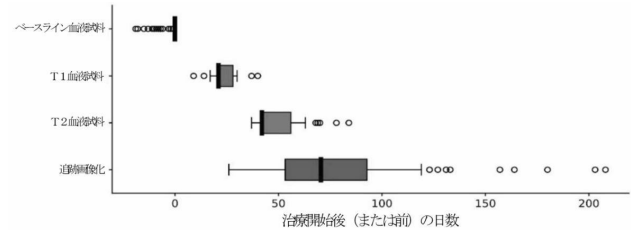
20

30

【図 3 A】



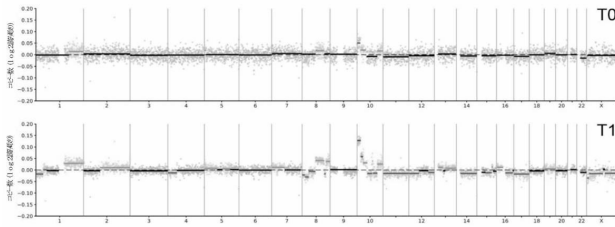
【図 3 B】



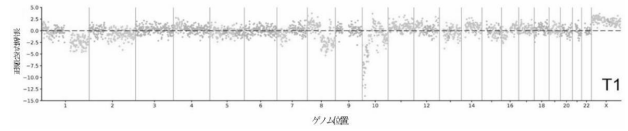
40

50

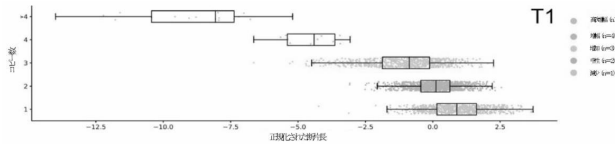
【図 4 A】



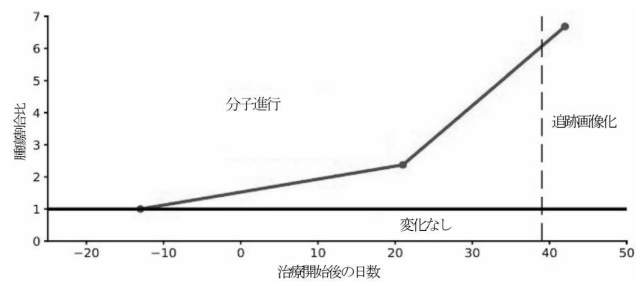
【図 4 B】



【図 4 C】

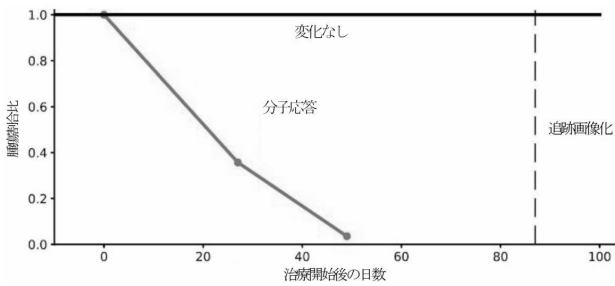


【図 4 D】

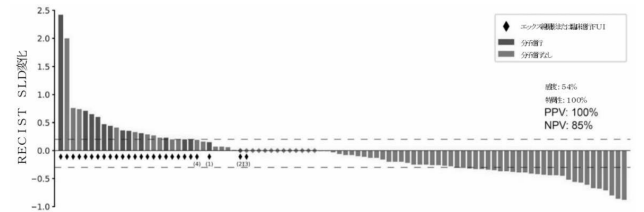


10

【図 4 E】



【図 5 A】



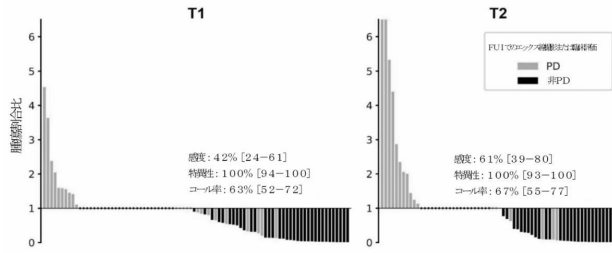
20

30

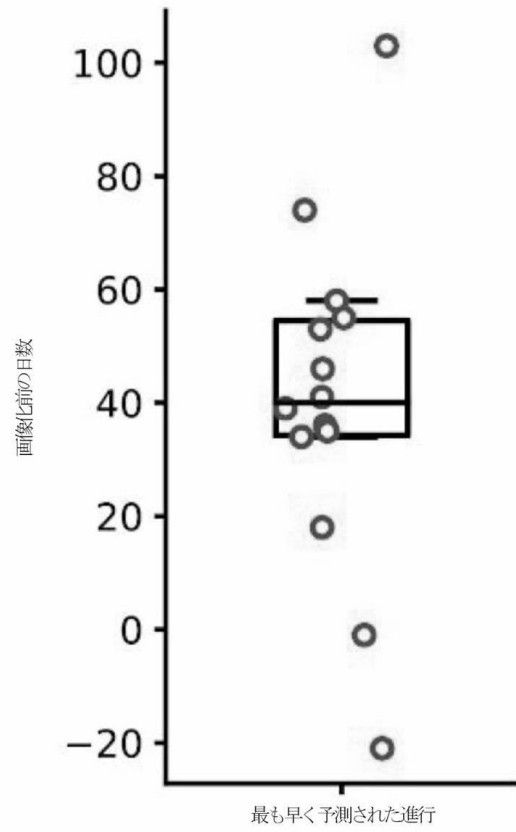
40

50

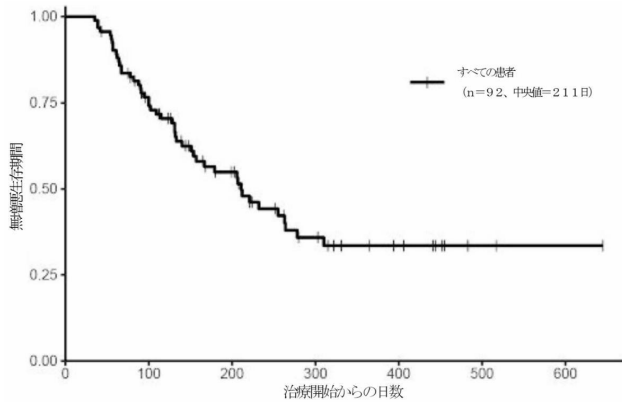
【図 5 B】



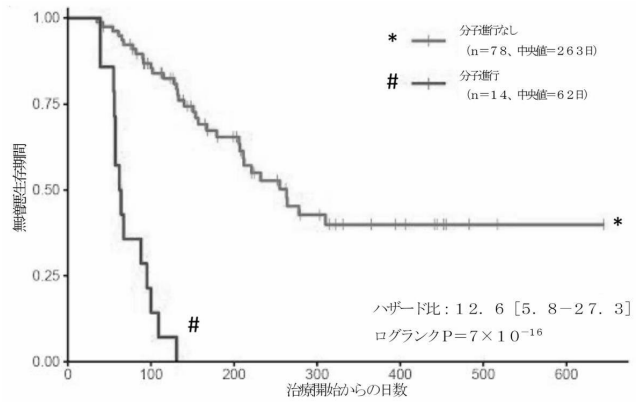
【図 5 C】



【図 6 A】



【図 6 B】



10

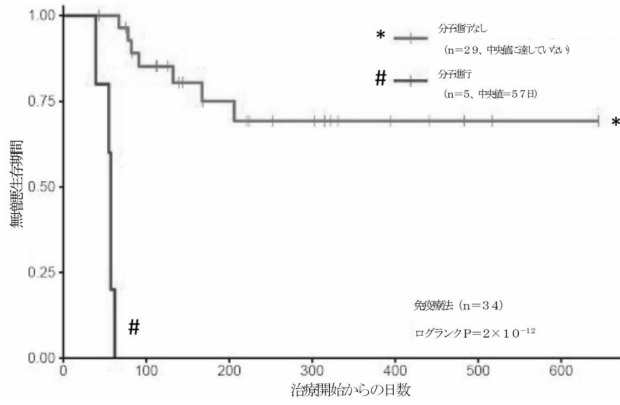
20

30

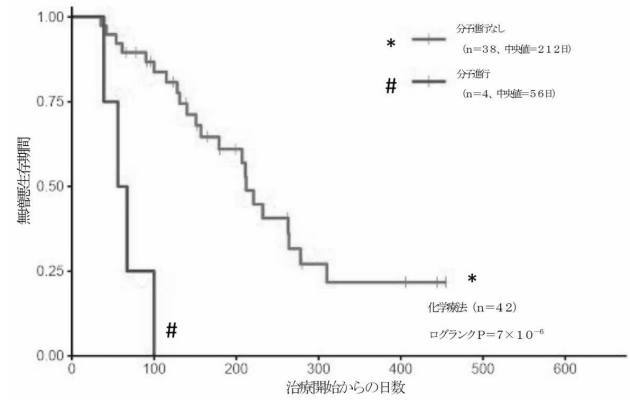
40

50

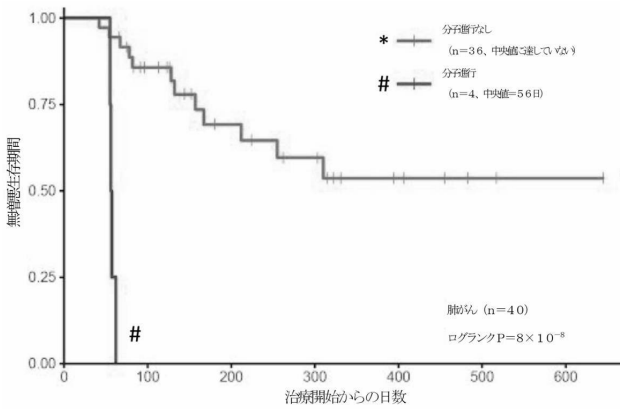
【図 6 C】



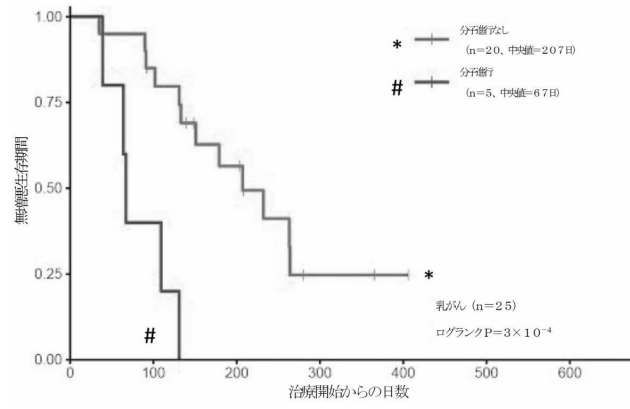
【図 6 D】



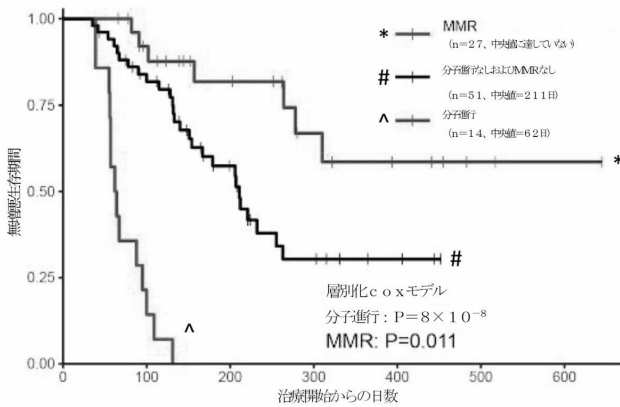
【図 6 E】



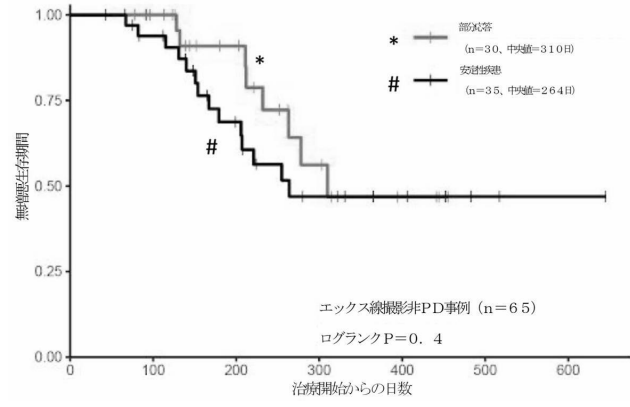
【図 6 F】



【図 6 G】



【図 6 H】



10

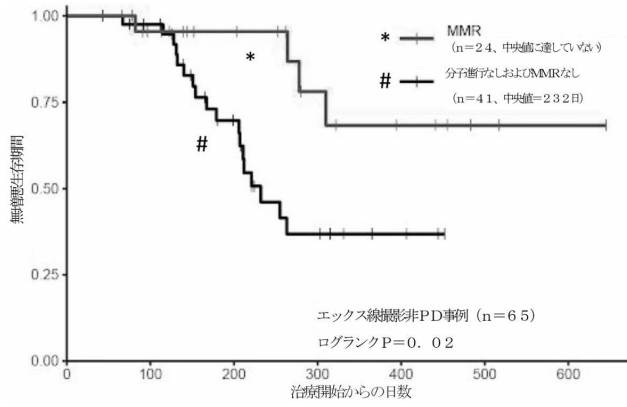
20

30

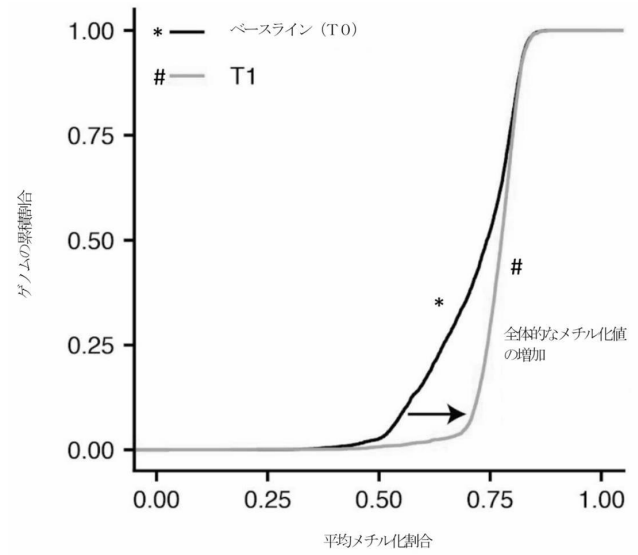
40

50

【図 6 I】

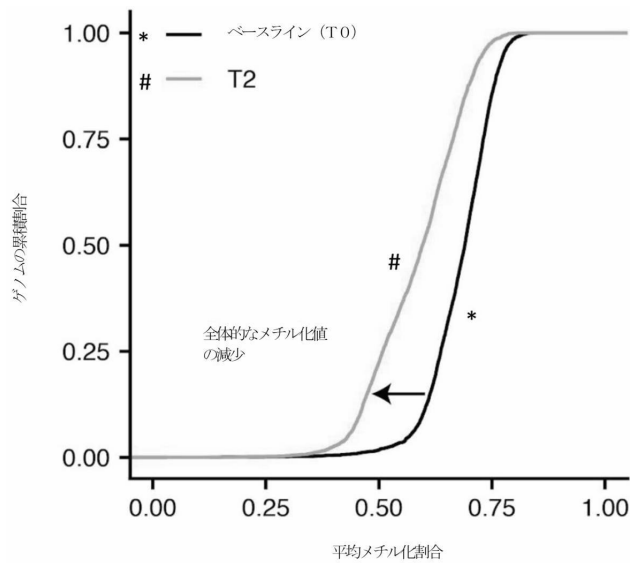


【図 7 A】

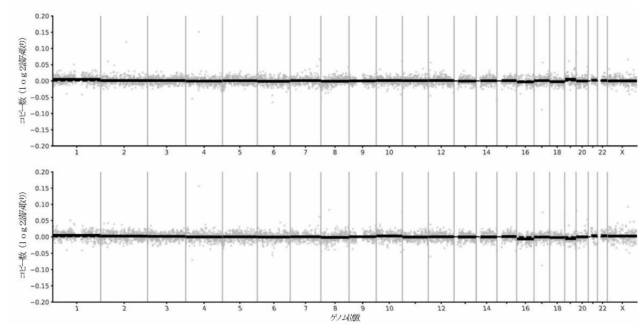


10

【図 7 B】



【図 8】



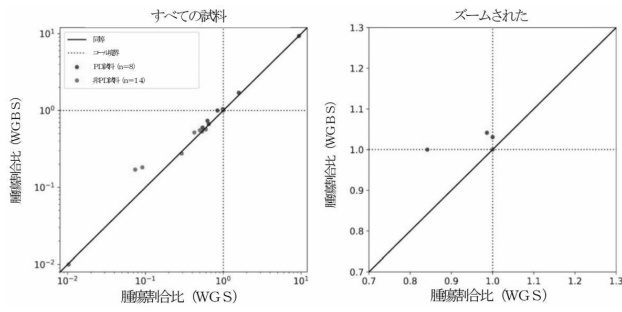
20

30

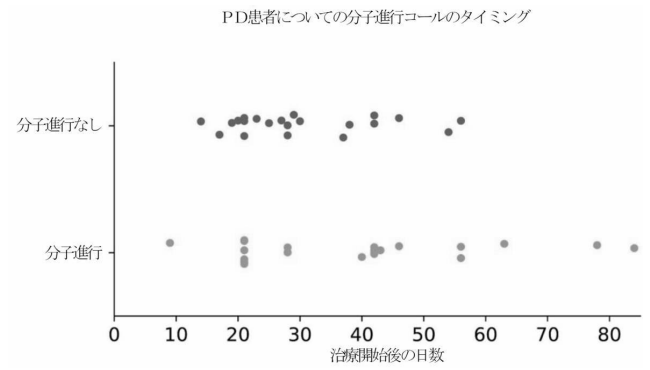
40

50

【図 9】

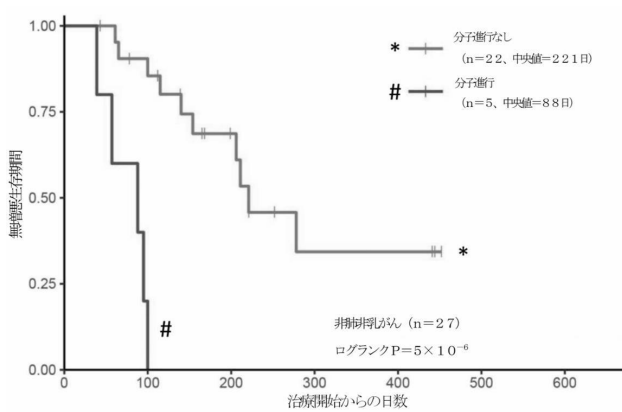


【図 10】

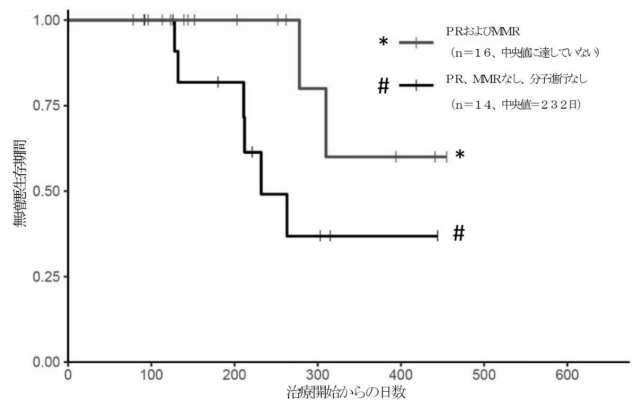


10

【図 11】

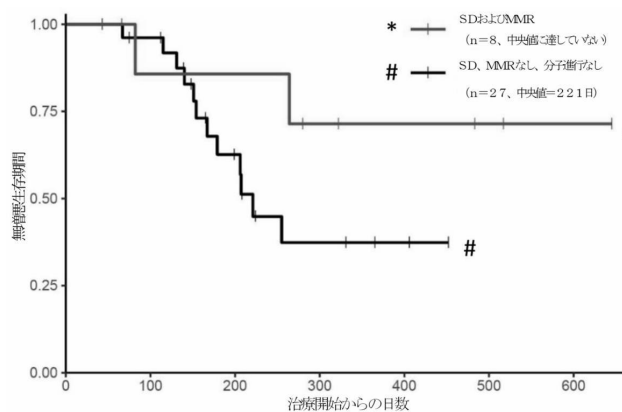


【図 12 A】

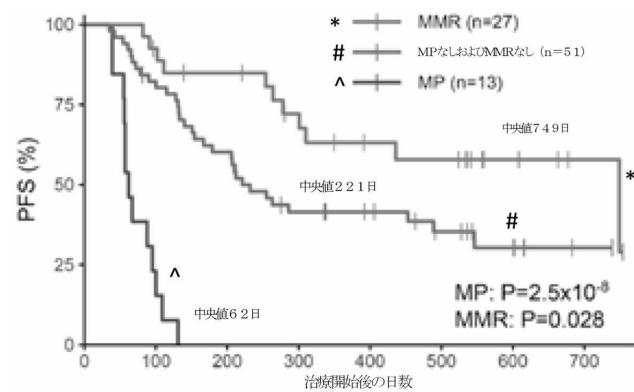


20

【図 12 B】



【図 13 A】

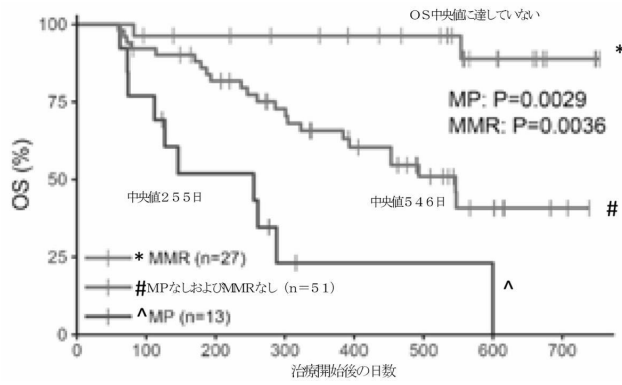


30

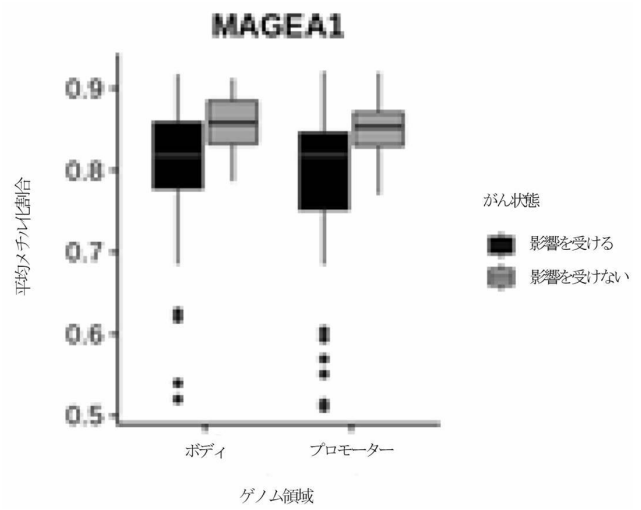
40

50

【図 1 3 B】

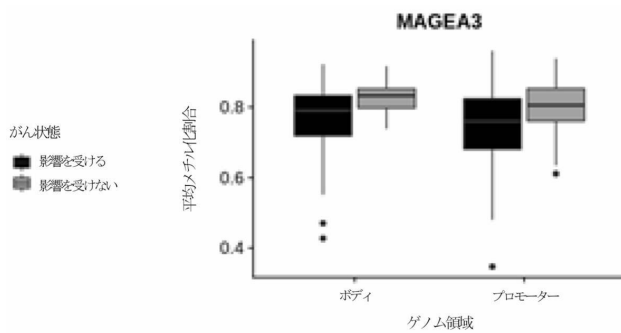


【図 1 4 A】

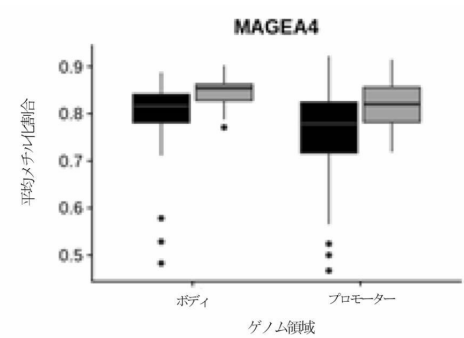


10

【図 1 4 B】



【図 1 4 C】



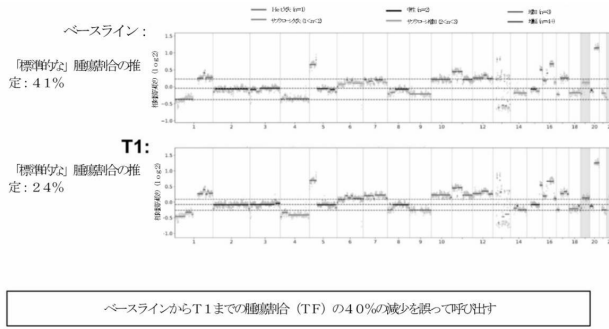
20

30

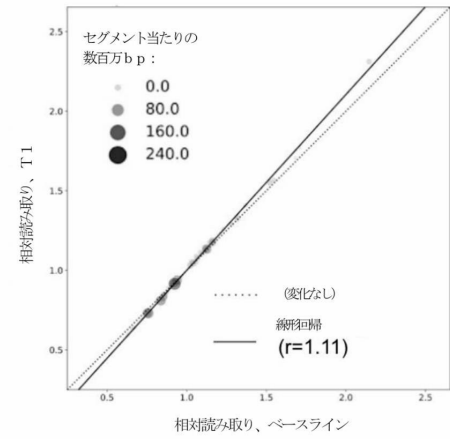
40

50

【図 15 A】



【図 15 B】



ベースラインからT1までのTFの11%の増加を同定する

10

【配列表】

2023508947000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC - C12Q 1/6886; C12Q 1/6869; G16B 20/10; G16B 30/10; G16B 20/00 (2021.01)

CPC - C12Q 1/6886; C12Q 1/6869; C12Q 2600/112; G16B 20/10; G16B 30/10; G16B 20/00; C12Q 2600/156; C12Q 2600/154

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	DAVIS et al. Early assessment of molecular progression and response by whole-genome circulating tumor DNA in advanced solid tumors. 2 August 2019 [online]. [Retrieved on 4 May 2021]. Retrieved from the internet: <URL: https://www.medrxiv.org/content/10.1101/19002550v2.full.pdf > Especially [all pages refer to pages in PDF]: abstract, pg 4 para 2, pg 5 para 3-4, pg 6 para 1, pg 7 para 5, pg 9 para 2, pg 14 fig 2A, B, C, E, pg 17 fig 5, pg 21 suppl table 2.	1-8, 26-38, (39-41)/(1-8,26-38), 63-67, 69-73, 89-96, (97-99)/(63-67,69-73,89-96), 147, (150,151)/147
Y	US 2019/0371428 A1 (SEQUENOM, INC.) 5 December 2019 (05.12.2019). Especially para [0023], [0031], [0059], [0060], [0066], [0137], [0138], [0140], [0210], [0335], [0341], claims 1-2.	9-25, (39-41)/(9-25), 61, 62, 68, 74-88, (97-99)/(68,74-88), 125-139, 145, 146, 148-149, 150/(148,149), 151/(148-150)
Y	WO 2017/212428 A1 (REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 14 December 2017 (14.12.2017). Especially para [0031], [0089], [00116], [00163].	9-25, (39-41)/(9-25), 61, 62, 74-82, 84-88, (97-99)/(74-82,84-88)
Y	ZHAI et al. Methylation of RASSF1A and CDH13 genes in individualized chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer. Asian Pac J Cancer Prev. 2014, Vol 15, No 12, Pages 4925-4928. Especially abstract, pg 4926 col 1 para 4.	68, (97-99)/68, 83, (97-99)/83, 120-123, 131, 139/131, 145, 146
		125-139, 145, 146, 148-149, 150/(148,149), 151/(148-150)

☐ 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

10 May 2021

Date of mailing of the international search report

AUG 06 2021

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Lee Young

Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. ☒ forming part of the international application as filed:

☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.

☐ on paper or in the form of an image file.

b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

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.: 42-60, 100-119, 124, 140-144, 152-169
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:
-----Go to Extra Sheet for continuation-----

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.:

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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (2)) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

Continuation of Box III: Observations where Lack of Unity 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 1-41, 61, 62, 147, 148, 149-151 drawn to a method, computer system and non-transitory computer readable medium for assessing tumor status of a subject, based on copy number aberrations and fragment lengths of cell free DNA (cfDNA) molecules in a subject.

Group II: 63-99, 120-123, 147, (150-151)(in part) drawn to a method, computer system and non-transitory computer readable medium for assessing tumor status of a subject, based on average methylation fraction profile derived from a plurality of CpG islands average methylation fraction.

Group III: 125-139, 145, 146, 148, 149, (150-151)(in part) drawn to a method, computer system and non-transitory computer readable medium for assessing tumor status of a subject, based on a methylation profile for one or more loci (e.g., tumor marker loci such as BRCA2, EGFR, etc.).

The inventions listed as Groups I-III do not relate to a single general inventive concept 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 determining copy number aberrations (CNAs) and fragment lengths of cell-free DNA (cfDNA) molecules, not required by Group II or III.

Group II has the special technical feature of determining an average methylation fraction profile derived from a plurality of CpG islands average methylation fraction, not required by Groups I or III.

Group III has the special technical feature of determining a methylation profile for one or more loci (e.g., tumor marker loci such as BRCA2, EGFR, etc.; see instant application para [0010]), not required by Groups I or II.

Common Technical Features:

1. Groups I and II share independent claim 147.

2. Groups I and III share independent claim 148.

3. Groups I-III share the common technical feature of a computer system and non-transitory computer readable medium for assessing tumor status of a subject.

However, said common technical feature does not represent a contribution over the prior art, and is previously disclosed by the publication titled "Early assessment of molecular progression and response by whole-genome circulating tumor DNA in advanced solid tumors" by Davis et al. (hereinafter "Davis") [published online at MedRxiv 2 August 2019 PDF pg 1-20 and available online at: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/19002550v2.full.pdf>], in view of the publication titled "Methylation of RASSF1A and CDH13 genes in individualized chemotherapy for patients with non-small cell lung cancer" by Zhai et al. (hereinafter "Zhai") [published in Asian Pac J Cancer Prev. 2014, Vol 15, No 12, Pages 4925-4928] and WO 2017/212428 A1 to The Regents of the University of California (hereinafter "UCalifornia").

-----continued in next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

-----continued from previous sheet-----

As to common technical feature #1, claim 147, Davis discloses a method for assessing tumor status of a subject with cancer, comprising:

obtaining first whole genome sequencing (WGS) data of a first plurality of cell-free DNA (cfDNA) molecules, wherein the first plurality of cfDNA molecules is obtained or derived from a first bodily fluid sample of the subject at a first timepoint, wherein the first timepoint precedes a therapeutic configured to treat the cancer is administered to the subject (abstract; "97 patients with advanced cancer were enrolled, and blood was collected before and after initiation of a new treatment. Plasma cell-free DNA libraries were prepared for either WG or WG bisulfite sequencing. Longitudinal changes in the fraction of cfDNA were quantified to identify molecular progression or response in a binary manner");

determining, based on the first WGS data, (i) a first plurality of copy number aberrations (CNAs) in the first plurality of cfDNA molecules and (ii) a first plurality of fragment lengths of the first plurality of cfDNA molecules (PDF pg 5 para 4; "Tumor fraction ratio (TFR) was measured to assess changes in cfDNA using CNAs and local changes in cfDNA fragment length, both assessed from sequencing data. Reads were aligned to the human genome (GRCh37)"; PDF pg 14 fig 2A,B,C; "Figure 2. Serial assessment of cfDNA to determine molecular progression. A. The genome-wide plots of CNAs detected for patient LS030178. The T0 baseline blood draw was collected 13 days before the start of treatment, and T1 was collected 21 days after the start of treatment. B. Normalized fragment length exhibit the reverse pattern compared to CNAs. C. Overall there was a strong negative correlation between the normalized fragment length at each genomic position and the inferred copy number");

obtaining first methylation sequencing (MS) data of a first plurality of cell-free DNA (cfDNA) molecules across a region of a genome, wherein the first plurality of cfDNA molecules is obtained or derived from a bodily fluid sample of the subject at the first timepoint (PDF pg 9 para 2; Longitudinal changes in methylation levels may complement tumor fraction changes Global hypomethylation is a hallmark of tumor genomes (17, 48), and an increase in global methylation levels in cfDNA might be associated with non-progression as it would indicate a decreased proportion of cfDNA. Importantly, the epigenetic patterns observed in tumors, including overall global hypomethylation can be detected in cfDNA (45,46). To assess the potential of methylation changes for identifying early response to therapy, the change in genome-wide methylation levels from baseline to post-treatment was examined retrospectively for two example patients (Figure 5)---one with a nonPD call (LS030083) at first FUI and one with a PD call at first FUI (LS030078). Consistent with the clinical assessment at first FUI, a marked increase in methylation levels was observed for LS030083 (Figure 5A), while a decrease was observed in LS030078 (Figure 5B). For patient LS030078, a clear molecular progression was observed based on CNAs and local fragmentation changes (TFR=2.01), while no CNAs were detectable in LS030083") determining, based on the first MS data, an average methylation fraction for each of one or more CpG islands in the region of the genome, thereby obtaining a first average methylation fraction profile (PDF pg 9 para 2; PDF pg 17 fig 5; "Figure 5. Methylation may provide an orthogonal signal to CNAs for response monitoring. A-B.. Distribution of average methylation levels in genome-wide 1 megabase bins for patient.(A)LS030083 and (B) LS030078 at baseline (black line) and either T1 or T2 (orange line)");

obtaining second whole genome sequencing (WGS) data of a second plurality of cell-free DNA (cfDNA) molecules, wherein the second plurality of cfDNA molecules is obtained or derived from a second bodily fluid sample of the subject at a second timepoint, wherein the second timepoint is subsequent to administration of the therapeutic to the subject (abstract);

determining, based on the second WGS data, (iii) a second plurality of copy number aberrations (CNAs) in the second plurality of cfDNA molecules (PDF pg 6 para 1; "CNAs detected at multiple time points were compared longitudinally with a linear model to quantify TFR"; PDF pg 14 fig 2A; "Figure 2. Serial assessment of cfDNA to determine molecular progression. A. The genome-wide plots of CNAs detected for patient LS030178. The T0 baseline blood draw was collected 13 days before the start of treatment, and T1 was collected 21 days after the start of treatment. B. Normalized fragment length exhibit the reverse pattern compared to CNAs. C. Overall there was a strong negative correlation between the normalized fragment length at each genomic position and the inferred copy number");

obtaining second MS data of a second plurality of cell-free DNA (cfDNA) molecules across the region of the genome, wherein the second plurality of cfDNA molecules is obtained or derived from a bodily fluid sample of the subject at the second timepoint (PDF pg 5 para 4);

determining, based on the second MS data, an average methylation fraction for each of one or more CpG islands in the region of the genome, thereby obtaining a second average methylation fraction profile (PDF pg 9 para 2);

comparing the first plurality of CNAs with the second plurality of CNAs to determine a CNA profile change (PDF pg 6 para 1; "CNAs detected at multiple time points were compared longitudinally with a linear model to quantify TFR"; PDF pg 14 fig 2A; "Figure 2. Serial assessment of cfDNA to determine molecular progression. A. The genome-wide plots of CNAs detected for patient LS030178. The T0 baseline blood draw was collected 13 days before the start of treatment, and T1 was collected 21 days after the start of treatment");

determining a fragment length profile change based on the first plurality of fragment lengths and the second plurality of fragment lengths (PDF pg 14 fig 2B,C);

comparing the first average methylation fraction profile across the one or more CpG islands and the second average methylation fraction profile across the one or more CpG islands to determine a methylation fraction profile (PDF pg 9 para 2; PDF pg 17 fig 5);

determining a first tumor fraction of the subject at the first timepoint or a second tumor fraction of the subject at the second timepoint (PDF pg 14 fig 2E; "Patient LS030093, who responded to therapy, showed a marked decrease in TFR at T1 and T2", based at least in part on the CNA profile change (PDF pg 14 fig 2A), the fragment length profile change (PDF pg 14 fig 2B,C), and the respective methylation fraction profiles (PDF pg 9 para 2; PDF pg 17 fig 5); and

detecting a tumor status of the subject based at least in part on the first tumor fraction or the second tumor fraction (PDF pg 14 fig 2E; "Patient LS030093, who responded to therapy, showed a marked decrease in TFR at T1 and T2").

-----continued on next sheet-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 20/66976

-----continued from previous sheet-----

As to common technical feature #2, claim 148, the claim is identical to claim 147, and is therefore defeated by Davis, as above, with the exception of the following claim limitations:

-----determining, based on the first MS data, a methylation profile for each of one or more loci of the genome, thereby obtaining a first methylation profile

-----determining, based on the second MS data, a methylation profile for each of one or more loci of the genome, thereby obtaining a second methylation profile

-----comparing the first methylation profile across the one or more loci and the second methylation profile across the one or more loci.

However, Zhai discloses determining, based on the first MS data, a methylation profile for each of one or more loci of the genome, thereby obtaining a first methylation profile (abstract; "This study aimed to evaluate the methylation of RASSF1A and CDH13 gene promoter regions as a marker for monitoring chemotherapeutic efficacy with personalized medicine for patients with NSCLC, in the hope of providing a new direction for NSCLC individualized chemotherapy... The rate of RASSF1A and CDH13 gene methylation in 42 cases of NSCLC patients was significantly higher than in 40 healthy control"), determining, based on the second MS data, a methylation profile for each of one or more loci of the genome, thereby obtaining a second methylation profile (abstract; "After the chemotherapy, the hyper-methylation of RASSF1A and CDH13 genes in PR group and SD group decreased significantly ($p < 0.05$), and was significantly different from that in PD group ($p < 0.05$), but not as compared with healthy controls ($P > 0.05$)") comparing the first methylation profile across the one or more loci and the second methylation profile across the one or more loci (abstract; "With chemotherapy, RASSF1A and CDH13 promoter region methylation rate in 42 cases of patients showed a declining trend. Conclusions: The methylation level of RASSF1A and CDH13 gene promoter region can reflect drug sensitivity of tumors to individualized treatment").

As to common technical feature #3, UCalifornia discloses a computer system and non-transitory computer readable medium for assessing tumor status of a subject (Claim 19; "19. A computer program product including a non-transitory computer-readable medium having instructions configured for cancer detection and tissue-of-origin identification, which, when executed by a processor of a computing system, cause the processor to perform the steps of: receiving an instruction to access data of a cell free DNA (cfDNA) methylation profile of a patient stored in the non-transitory computer-readable medium").

As the common technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered common special technical features that would otherwise unify the groups. The inventions lack unity with one another.

Therefore, Groups I-III lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Item 4-(cont.): Claims 42-60, 100-119, 124, 140-144, 152-169 are multiple dependent claims and are not drafted according to the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

=====

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	45/06 (2006.01)	A 6 1 K	45/06	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02	
A 6 1 K	35/12 (2015.01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/00	H
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 1 2 Q	1/6886(2018.01)	A 6 1 K	39/395	E
C 1 2 Q	1/6806(2018.01)	C 1 2 Q	1/6886	Z
		C 1 2 Q	1/6806	Z

,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,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(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,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,
LY,MA,MD,ME,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,VN,WS,ZA,ZM,Z
W

弁護士 山本 健策

(72)発明者

ロバートソン, アレックス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ピーターマン, ニール

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

ランバート, ニコル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

テツカン, ハルク

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

スリヴァス, ロヒト

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94402, サン マテオ, ダブリュー 3アールディー アベ
ニュー 146, アpartment 1

(72)発明者

ジョージ, ピーター

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者

クロース, ジェイソン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02141, ケンブリッジ, セカンド ストリート 150,
レクセント バイオ, インコーポレイテッド 気付

F ターム (参考)

4B029 AA07 BB20 FA12 FA15
4B063 QA01 QA19 QQ42 QR08 QR58 QS28 QS36 QX02
4C084 AA01 AA17 AA20 BA03 MA02 NA05 ZB26 ZB27 ZC75
4C085 AA03 AA13 AA14 BB01 BB31 CC22 CC23 EE01 EE03
4C087 AA01 BB63 MA02 NA05 ZB26 ZB27 ZC75