

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7466519号
(P7466519)

(45)発行日 令和6年4月12日(2024.4.12)

(24)登録日 令和6年4月4日(2024.4.4)

(51) 國際特許分類

FI

C 1 2 Q 1/6886(2018.01)
C 1 2 Q 1/6827(2018.01)
C 1 2 Q 1/6869(2018.01)
C 1 2 Q 1/6844(2018.01)
G 1 6 B 20/20 (2019.01)

C 1 2 Q	1/6886	Z
C 1 2 Q	1/6827	Z
C 1 2 Q	1/6869	Z
C 1 2 Q	1/6844	Z
G 1 6 B	20/20	

請求項の数 15 (全81頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-503558(P2021-503558)
(86)(22)出願日	令和1年7月22日(2019.7.22)
(65)公表番号	特表2021-531775(P2021-531775 A)
(43)公表日	令和3年11月25日(2021.11.25)
(86)国際出願番号	PCT/US2019/042882
(87)国際公開番号	WO2020/023420
(87)国際公開日	令和2年1月30日(2020.1.30)
審査請求日	令和4年7月22日(2022.7.22)
(31)優先権主張番号	62/702,280
(32)優先日	平成30年7月23日(2018.7.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)
(31)優先権主張番号	62/741,770
(32)優先日	平成30年10月5日(2018.10.5)

最終頁に続く

(73)特許権者	515059083 ガーダント ヘルス、 インコーポレイテ ッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 4, バロ アルト, ハノーバー スト リート 3 1 0 0
(74)代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(74)代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(74)代理人	100181674 弁理士 飯田 貴敏
(74)代理人	100181641 弁理士 石川 大輔
(74)代理人	230113332

[最終頁に続く](#)

(54)【発明の名称】 腫瘍遺伝子変異量を腫瘍割合およびカバレッジによって調整するための方法およびシステム

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定する方法であって、

(a) 前記対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、

(b) 前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、

(c) 前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップであって、前記予測変異割合および／または前記予測変異割合の前記予測分布の決定が、所与の変異対立遺伝子割合(MAF)における変異が予測MAFの分布にわたって識別される確率の算出を含み、予測MAFの前記分布が、相対的MAFの予測分布から決定される、ステップと、

(d) 前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、前記対象における前記 TMB を決定するステップとを含み、前記予測結果が以下の方程式：

$$\text{観測された変異の割合} = \sum_{MAF} (P(\text{変異のコール} | MAF) \times P(MAF \text{ における変異}))$$

を使用して決定され、

式中、 P は確率であり、 MAF は変異対立遺伝子割合であり、 $P(MAF)$ は特定の MAF における変異がコールされる確率であり、かつ $P(MAF)$ における変

異)は前記MAFにおける前記変異の確率である、方法。

【請求項2】

(a) 前記観測変異カウントが、前記核酸において識別される複数の同義変異、複数の非同義変異、および／もしくは複数の非コード変異を含む、

(b) 前記観測変異カウントが、一塩基バリエント(SNV)、挿入もしくは欠失(インデル)、コピー数バリエント(CNV)、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、およびエピジェネティックバリエントからなる群から選択される複数の変異を含む、

(c) 前記観測変異カウントから、ドライバー変異および／もしくはクローン性造血由来変異が除外される、ならびに／または

(d) 前記観測変異カウントが、前記核酸において識別される複数の体細胞変異を含み、前記観測変異カウントから1つもしくは複数の既知のがんドライバーおよび／またはパッセンジャー変異が除外される、

請求項1に記載の方法。

【請求項3】

(a) 前記観測変異カウントを決定するために、所与の一塩基バリエント(SNV)または所与の挿入もしくは欠失(インデル)に関して検出限界を下回る1つもしくは複数の可能性のある変異のプールされたエビデンスを使用することを含む、

(b) 前記予測変異割合を実際の変異カウントの観測割合として使用することを含む、

(c) 前記配列情報を1つもしくは複数の参照配列と比較して、前記観測変異カウントを識別することを含み、前記参照配列が、hg19および／もしくはhg38の少なくとも部分配列を含む、ならびに／または

(d) 前記調整された結果を使用して、TMBスコアを決定することをさらに含む、
請求項1または2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】

前記腫瘍割合が、

(a) 前記核酸において識別される全ての体細胞変異の最大MAFを含む、および／または

(b) 前記試料中の全ての核酸の約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.5%未満、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、もしくは約5%未満であり、

約は25%までの変動として定義される、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

(a) 前記カバレッジを決定するために、前記核酸における所与のヌクレオチド位を含む複数の独特のcfDNA断片を識別すること、および／もしくは前記カバレッジを決定するために、前記核酸における所与のヌクレオチド位を構成する独特の細胞外遊離DNA(cfDNA)分子の数の中央値を識別することを含み、

(b) 前記カバレッジが、前記試料中に存在する前記核酸における所与のヌクレオチド位において10個から50,000個の間のcfDNA断片である、

(c) 前記予測変異割合および／もしくは前記予測変異割合の前記予測分布が、前記変異割合に関して約95%もしくはそれよりも大きな信頼区間を含む、ならびに／または

(d) 前記予測変異割合の95%信頼区間の上限を使用して、前記観測変異カウントの下限を生成することを含み、

約は25%までの変動として定義される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

(a) 予測相対的MAFの分布に前記腫瘍割合を掛けて、MAFを生成することを含む、
および／または

(b) 予測MAFの前記分布が、以下の二項比率の信頼区間を使用して算出される、

【数5】

10

20

30

40

50

$$f_{\text{上限}} = f + z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})} \text{ および}$$

$$f_{\text{下限}} = f - z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})},$$

(式中、 f は、コールされる変異の前記予測割合であり、 $n_{\text{真}}$ は、予測される実際の変異であり、これは f を考慮して観測される変異の数と等しく、 z は信頼水準であり、

(i) f が閾値 f 未満の場合、TMB は決定されない、もしくは

(ii) f が閾値 f を超える場合、TMB が決定される)

請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記相対的 MAF の前記予測分布が、対照試料データセットの 1 つまたは複数のデータセットから得られ、

(a) 前記対照試料データセットが、少なくとも約 25、少なくとも約 50、少なくとも約 100、少なくとも約 200、少なくとも約 300、少なくとも約 400、少なくとも約 500、少なくとも約 600、少なくとも約 700、少なくとも約 800、少なくとも約 900、少なくとも約 1,000、少なくとも約 5,000、少なくとも約 10,000、少なくとも約 15,000、少なくとも約 20,000、少なくとも約 25,000、少なくとも約 30,000、もしくはそれよりも多くの対照試料を含む、

(b) 前記対照試料データセットにおいて観測される最大 (max) MAF が、約 0.5%、約 1%、約 2%、約 5% もしくは約 10% を構成する、および／または

(c) 前記相対的 MAF を、以下の方程式：

$$F = 1 / (1 + (P_{50} / \text{相対的} - \text{MAF})^n)$$

(式中、 F は、累積分布関数であり、 P_{50} は、相対的 MAF の中央値であり、相対的 -MAF は相対的 MAF であり、 n は、相対的な分布の形状を当てはめるための指数である)

を使用して曲線に当てはめることを含み、

約は 2.5% までの変動として定義される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記観測変異カウントを

(a) 前記試料における予測変異割合もしくは前記予測変異割合の信頼区間の上限／下限で割って、前記調整された結果を生成すること、および／または

(b) 前記予測結果で割って、前記調整された結果を生成することを含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記調整された結果が、

(a) 変異対立遺伝子割合の範囲にわたって前記核酸において検出される複数の変異、

(b) 可能性が最も高い実際の変異カウントの予想、

(c) 可能性が最も低い実際の変異カウントの予想、および／または

(d) 調整された変異カウントであって、前記調整された変異カウントが、前記観測変異カウントよりも大きいもしくはそれと等しい、調整された変異カウントを含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記試料が前記対象から得られることを特徴とし、

(a) 前記試料が、

(i) 組織、血液、血漿、血清、喀痰、尿、精液、膿液、糞便、滑液、脊髄液、および唾液からなる群から選択される、

(ii) 組織を含む、または

(iii) 血液、血漿、および／もしくは血清を含む、

(b) 前記対象が、哺乳動物対象であり、前記哺乳動物対象が、ヒト対象である、

(c) 前記核酸が、

(i) 細胞外遊離核酸を含む、

(ii) 細胞内核酸を含む、

(iii) 循環腫瘍核酸を含む、

(iv) 循環腫瘍細胞から得られる、および／もしくは

(v) デオキシリボ核酸 (DNA) および／もしくはリボ核酸 (RNA) を含む、ならびに／または

(d) 前記方法は、前記試料中の前記核酸の少なくとも1つのセグメントを増幅させて、少なくとも1つの増幅した核酸を生成することをさらに含み、前記増幅した核酸のシーケンシングを行って、前記配列情報を生成することを含み、さらに、

(i) 前記核酸の少なくとも約50,000、約100,000、約150,000、約200,000、約250,000、約500,000、約750,000、約1,000,000、約1,500,000、約2,000,000ヌクレオチド、もしくはそれよりも多くのヌクレオチドのシーケンシングを行って、前記配列情報を生成し、ならびに／または

(ii) 前記シーケンシングが、標的化シーケンシング、イントロンシーケンシング、エキソームシーケンシング、および全ゲノムシーケンシングからなる群から選択され、約は2.5%までの変動として定義される、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

(a) 前記配列情報が、

(i) 前記対象由来の前記試料を提供するステップと、

(ii) 前記試料中の核酸を増幅させて、増幅した核酸を生成するステップと、

(iii) 前記増幅した核酸のシーケンシングを行って、前記配列情報を生成するステップと
により得られる、

(b) 前記対象由来の前記試料中の前記核酸から前記配列情報を得ることを含み、前記配列情報が、前記核酸の標的とされるセグメントから得られ、さらに前記標的とされるセグメントが、約1から約100,000の間の異なるおよび／または重複するゲノム領域を含む、

(c) 前記配列情報が、核酸シーケンサーによって生成された前記核酸の配列読み取りを含み、前記核酸シーケンサーにより前記核酸に対してパイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングを実施して、シーケンシング読み取りを生成し、

(d) 前記方法は、シーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプトームから1つまたは複数の領域を選択的に富化させるステップをさらに含み、選択的に富化された領域をシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含む、ならびに／または

(e) 前記配列情報を前記核酸の標的とされるセグメントから得て、前記標的とされるセグメントをシーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプトームから1つまたは複数の領域を選択的に富化させることによって得て、得られた標的とされるセグメントをシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含み、

約は2.5%までの変動として定義される、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

シーケンシングの前に、分子バーコードを含む1つまたは複数のアダプターを前記核酸に付着させるステップをさらに含み、

(a) 前記核酸を一意的にタグ付けする、

(b) 前記核酸を非一意的にタグ付けする、

(c) 前記アダプターが、2から1,000,000の間の分子バーコードを含む、

(d) 分子バーコードを含むアダプターを核酸の各末端にランダムに付着させることを

10

20

30

40

50

含む、

(e) 前記アダプターを前記核酸に平滑末端ライゲーションもしくは粘着末端ライゲーションによって付着させる、または

(f) 前記アダプターが、T 尾部を有するおよび／または C 尾部を有するアダプターである、

請求項 1 ～ 11 のいずれかに記載の方法。

【請求項 13】

(a) 前記配列読み取りを配列読み取りのファミリーに群分けするステップをさらに含む、各ファミリーが、前記試料中の核酸から生成された配列読み取りを含む、

(b) 前記方法の少なくとも一部が、コンピューターにより実行される、

(c) 1 つまたは複数の TMB スコアを提示する電子形式の報告書を作成するステップをさらに含む、

(d) 前記試料を TMB-High 試料に分類するステップをさらに含む、

(e) 前記試料の前記 TMB スコアが閾値 TMB スコアよりも大きい場合、前記試料を TMB-High 試料に分類し、前記試料の前記 TMB スコアが閾値 TMB スコアよりも小さい場合、前記試料を TMB-Low 試料に分類する、および／または

(f) 前記変異カウントを、表 2 に列挙されている遺伝子を含む遺伝子またはゲノム領域のセットの中で決定する、

請求項 11、または請求項 11 に従属する場合の請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

(a) 前記配列情報の少なくとも一部における免疫レパートリーの 1 つまたは複数のクローン型を識別するステップ、および

(b) 前記 TMB スコアと前記 1 つまたは複数のクローン型を相関させて、前記対象における 1 つまたは複数の新抗原オーファン免疫受容体を識別するステップをさらに含む、請求項 3、13、または請求項 3 もしくは 13 を直接または間接的に引用する請求項 4 ～ 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 TMB スコアを前記対象または医師に報告することをさらに含む、請求項 3、13、または請求項 3 もしくは 13 を直接または間接的に引用する請求項 4 ～ 12 または 14 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】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、その開示全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018 年 7 月 23 日出願の米国仮特許出願第 62/702,280 号、2018 年 10 月 5 日出願の同第 62/741,770 号、2018 年 12 月 20 日出願の同第 62/782,894 号、および 2019 年 3 月 26 日出願の同第 62/824,246 号の利益を主張し、また、その出願日に依拠するものである。

【背景技術】

【0002】

背景

腫瘍は、細胞の異常な成長である。DNA は、例えば正常細胞および／またはがん細胞が死滅した際に、細胞外遊離 DNA および／または循環腫瘍 DNA として体液中に放出されることも多い。腫瘍は良性または悪性であり得る。多くの場合、悪性腫瘍はがんと称される。

【0003】

がんは、世界的に疾患の主要な原因になっている。毎年、世界中で数千万人ががんと診断され、半数よりも多くのがんにより最終的に死亡する。多くの国で、がんは心血管疾患に次いで 2 番目に多い死因として順位付けられる。多くのがんに関して、早期検出が転帰

10

20

30

40

50

の改善に関連付けられる。

【0004】

がんは、通常、個体の正常な細胞における変異の蓄積によって引き起こされ、その少なくとも一部により、細胞分裂の不適切な制御が生じる。そのような変異は、一般に、一塩基バリエーション（SNV）、遺伝子融合、挿入および欠失（インデル）、塩基転換、転座、ならびに反転を含む。がん内の変異の数は、がんの免疫療法による影響の受けやすさの指標になり得る。

【0005】

がんは、多くの場合、腫瘍の生検、その後の細胞病理、バイオマーカーまたは細胞から抽出されたDNAの解析によって検出される。しかし、つい最近、血液または尿などの体液中の細胞外遊離核酸（例えば、循環核酸、循環腫瘍核酸、エキソソーム、アポトーシス細胞および／または壊死性細胞由来の核酸）からもがんを検出することができることが提唱された（例えば、Siravegna et al., Nature Reviews, 14: 531-548 (2017)を参照されたい）。そのような試験には、非侵襲的であり、生検およびがんの全部分からの核酸試料採取のために疑わしいがん細胞を識別することなく実施できるという利点がある。しかし、そのような試験は、体液中に放出される核酸の量が少なく変動しやすく、また、そのような流体からの核酸の解析できる形態での回収率も低く変動しやすいという事実によって複雑なものになる。これらの変動源により、試料の間での腫瘍遺伝子変異量（tumor mutation burden）（TMB）の比較の適中度が曖昧なものになり得る。

TMBは、腫瘍ゲノム内の腫瘍細胞が有する変異の測定値である。TMBは、がんと診断された、またはその徴候を有する疑いがある対象に対してがん免疫療法（I-O）による療法などの特定の型のがん療法が有益であるかどうかを評価するために使用することができるバイオマーカーの一種である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【文献】Siravegna et al., Nature Reviews, 14: 531-548 (2017)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要旨

本出願は、患者試料における腫瘍遺伝子変異量（TMB）の決定および解析において有用であり、がん処置決定のガイドに役立つ方法、コンピューター可読媒体、およびシステムを開示する。伝統的に、変異率をカウントすることによって得られるTMBは、腫瘍割合（例えば、変異対立遺伝子割合（mutant allele fraction）（MAF））および／またはカバレッジが小さい場合には、変異をコールするためのアッセイの感度が低下するので、不正確である頻度が高い。したがって、ある特定の態様では、観測TMBを、アッセイの感度の種々の尺度、例えば、腫瘍割合（所与の試料中の変異のMAFを設定する）、カバレッジ、および／または同様のものなどを考慮して調整する。そのような調整を行わなかった場合、例えば、TMB-Highであるが腫瘍割合が小さく、かつ／またはカバレッジが小さい試料は、一般には、TMB-Lowと誤って報告されることになる。そのような転帰は、そのような結果に基づいて処置の決定を行う場合、患者に対して下流で重要な意義を有し得る。したがって、本明細書に開示される調整方法および関連する態様のインプリメンテーション前には、対照試料中の平均変異カウント（mutation count）は、一般には最大（max）MAFおよびカバレッジに依存する。これらの方法および関連する態様のインプリメンテーション後には、対照または比較用試料の間の平均変異カウント（mutation count）は最大（max）MAFおよびカバレッジのどちらにも基本的に依存しない。

【0008】

本開示の単に例示的な実施形態が示され、説明されている以下の詳細な説明から本開示の追加的な態様および利点が当業者には容易に明らかになろう。理解される通り、本開示では、他のおよび異なる実施形態が可能であり、そのいくつかの詳細を、全て本開示から逸脱することなく種々の明白な点で変更することができる。したがって、図および説明は例示的性質のものであるとみなされるべきであり、制限するものとみなされるべきではない。

【0009】

ある態様では、本開示は、対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定する方法であって、（a）対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウント（mutational count）を決定するステップと、（b）核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（c）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合（mutational fraction）および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、（d）予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象におけるTMBを決定するステップとを含む方法を提供する。本明細書に開示される方法および関連するインプリメンテーションの一部の実施形態では、観測変異カウントを、これらのカウントに関連付けられる新抗原の可能性に基づいて調整する。所与の対象のハプロタイプに応じて、例えば、特定の変異または変異のクラスターが、その特定の対象において他の対象よりも新抗原性であり得る。一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、例えば、対象における処置の経過を経時的に評価またはモニタリングするために所与の対象におけるTMBを多数の時点で決定することを含む。

【0010】

別の態様では、本開示は、対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定する方法であって、（a）対象由来の試料を提供するステップと、（b）試料中の核酸を増幅させて、増幅した核酸を生成するステップと、（c）増幅した核酸のシーケンシングを行って、配列情報を生成するステップと、（d）配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、（e）核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（f）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、（g）予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象におけるTMBを決定するステップとを含む方法を提供する。

【0011】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを処置するために1つまたは複数のカスタマイズされた療法を選択する方法であって、（a）対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、（b）核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（c）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、（d）予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、（e）調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較して、対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップとを含む方法を提供する。

【0012】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを処置する方法であって、（a）対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、（b）核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（c）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップ

と、(d) 予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、(e) 調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較して、対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップと、(f) 調整された結果と比較用結果が実質的にマッチする場合に、識別されたカスタマイズされた療法の少なくとも1つを対象に施行して、それにより、対象におけるがんを処置するステップとを含む方法を提供する。

【0013】

別の態様では、本開示は、対象におけるがんを処置する方法であって、1つまたは複数のカスタマイズされた療法を対象に施行し、それにより、対象におけるがんを処置することを含み、カスタマイズされた療法が、(a) 対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、(b) 核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、(c) シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、(d) 予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、(e) 調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較するステップと、(f) 調整された結果と比較用結果が実質的にマッチする場合に、対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップとによって識別されたものである、方法を提供する。

【0014】

一部の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の同義変異、複数の非同義変異、および／または複数の非コード変異を含む。一部の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、一塩基バリエーション(SNV)、挿入または欠失(インデル)、コピー数バリエーション(CNV)、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、およびエピジェネティックバリエーションからなる群から選択される複数の変異を含む。一部の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合からドライバー変異および／または腫瘍に関連しない変異(例えば、クロン性造血由来変異-CH変異)が除外される。

【0015】

一部の実施形態では、方法は、観測変異カウントを決定するために、所与の一塩基バリエーション(SNV)または所与の挿入もしくは欠失(インデル)に関して検出限界を下回る1つまたは複数の可能性のある変異のプールされたエビデンスを使用することを含む。

【0016】

一部の実施形態では、方法は、実際の変異カウントの観測割合である予測変異割合を生成することを含む。一部の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の体細胞変異を含む。一部の実施形態では、観測変異カウントから1つまたは複数の既知のがんドライバーおよび／またはパッセンジャー変異が除外される。

【0017】

一部の実施形態では、方法は、配列情報を1つまたは複数の参照配列と比較して、観測変異カウントを識別することを含む。

【0018】

一部の実施形態では、参照配列は、hg19および／またはhg38の少なくとも部分配列を含む。

【0019】

一部の実施形態では、腫瘍割合は、核酸において識別される全ての体細胞変異の最大(maximum)変異対立遺伝子割合(MAF)を含む。一部の実施形態では、腫瘍割合は、試料中の全ての核酸の約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.5%未満、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、または約5%未満である。

【0020】

一部の実施形態では、方法は、カバレッジを決定するために、核酸における所与のヌクレオチド位を含む複数の独特の c f DNA 断片を識別することを含む。一部の実施形態では、方法は、カバレッジを決定するために、核酸における所与のヌクレオチド位を構成する独特の細胞外遊離 DNA (c f DNA) 分子の数の中央値を識別することを含む。

【0021】

一部の実施形態では、カバレッジは、試料中に存在する核酸における所与のヌクレオチド位において10個から50,000個の間の c f DNA 断片である。

【0022】

一部の実施形態では、予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布は、変異割合に関して約95%またはそれよりも大きな信頼区間を含む。一部の実施形態では、方法は、予測変異割合の95%信頼区間の上限を使用して、観測変異カウントの下限を生成することを含む。

【0023】

一部の実施形態では、方法は、所与の変異対立遺伝子割合 (MAF) における変異が予測 MAF の分布にわたって識別される確率を算出して、予測変異割合を決定することを含む。一部の実施形態では、方法は、予測相対的 MAF の分布に腫瘍割合を掛けて、MAF を生成することを含む。本明細書で使用される場合、「MAF」という用語は、割合だけに限定されず、ある特定の実施形態では、変異体分子カウントも包含し得る。一部の実施形態では、予測 MAF の分布は、以下の二項比率の信頼区間を使用して算出される：

【0024】

【数1】

$$f_{\text{上限}} = f + z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})},$$

および

【0025】

【数2】

$$f_{\text{下限}} = f - z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})},$$

(式中、f は、コールされる変異の予測割合であり、n_真 は、予測される実際の変異であり、これは f を考慮して観測される変異の数と等しく、z は信頼水準である)。一部の実施形態では、f が閾値 f_{未満} の場合、TMB は決定されない。一部の実施形態では、f が閾値 f_{未満} を超える場合、TMB が決定される。

【0026】

一部の実施形態では、方法は、以下の方程式：

【0027】

観測された変異の割合 = $\sum_{MAF} (P(\text{変異のコール} | MAF) \times P(MAF \text{ における変異}))$

【0028】

(式中、P は確率であり、MAF は変異対立遺伝子割合である) を使用して予測結果を決定することを含む。

【0029】

一部の実施形態では、相対的 MAF の予測分布は、対照試料データセットの1つまたは複数のデータセットから得られる。一部の実施形態では、対照試料データセットは、少なくとも約25、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1,000、少なくとも約5,000、少なくとも約10,000、少なくとも約15,000、少なくとも約20,000、少なくとも約25,000、少なくとも約30,000、またはそれ

10

20

30

40

50

よりも多くの対照試料を含む。一部の実施形態では、対照試料データセットに使用される対照試料は、がんの型に特異的なものおよび／または処置に特異的なものであり得る。

【0030】

一部の実施形態では、対照試料データセットにおいて観測される最大 (max) MAF は、約 0.5%、約 1%、約 2%、約 5% または約 10% を構成する。

【0031】

一部の実施形態では、方法は、相対的 MAF を、以下の方程式：

【0032】

$$F = 1 / (1 + (P_{50} / \text{相対的} - \text{MAF})^n)$$

【0033】

(式中、F は、累積分布関数であり、 P_{50} は、相対的 MAF の中央値であり、相対的 -MAF は相対的 MAF であり、n は、相対的な分布の形状を当てはめるための指数である)

を使用して曲線に当てはめることを含む。

【0034】

一部の実施形態では、方法は、試料における観測変異カウントを予測変異割合 (mutation fraction) または予測変異割合の信頼区間の上限／下限で割って、調整された結果を生成することを含む。一部の実施形態では、調整された結果は、変異対立遺伝子割合の範囲にわたって核酸において検出される複数の変異を含む。一部の実施形態では、方法は、観測変異カウントを予測結果で割って、調整された結果を生成することを含む。一部の実施形態では、調整された結果は、可能性が最も高い実際の変異カウントの予想を含む。一部の実施形態では、調整された結果は、可能性が最も低い実際の変異カウントの予想を含む。一部の実施形態では、調整された結果は、調整された変異カウントを含む。一部の実施形態では、調整された変異カウントは、観測変異カウントよりも大きいまたはそれと等しい。一部の実施形態では、調整された変異カウント／調整された結果を解析される標的ゲノム領域のサイズとエキソーム校正因子の積で割って、TMB スコアを決定する。ある特定の実施形態では、エキソーム校正因子は、少なくとも 1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、またはそれよりも大きい値であり、他の実施形態では、エキソーム校正因子は、1.0 よりも小さい値 (例えば、約 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、または 0.9) を含む。一部の実施形態では、エキソーム校正因子は、がんデータベース (例えば、TCGA など) 内の試料のエキソーム変異率から決定される。ある特定の実施形態では、考慮中の所与のがんの型に特異的なエキソーム校正因子およびエキソーム変異率をそのがんの型を有する試料から決定する。

【0035】

一部の実施形態では、方法は、試料を TMB-High 試料に分類することをさらに含む。一部の実施形態では、試料の TMB スコアが閾値 TMB スコアよりも大きい場合、試料を TMB-High 試料に分類する。試料の TMB スコアが閾値 TMB スコアよりも小さい場合、試料を TMB-Low 試料に分類する。ある特定の実施形態では、例えば、閾値 TMB スコアは、約 5、10、15、20、25、30、35、40 または別の選択された閾値であり得る。

【0036】

一部の実施形態では、方法は、対象由来の試料中の核酸から配列情報を得ることを含む。一部の実施形態では、配列情報を核酸の標的とされるセグメントから得る。一部の実施形態では、標的とされるセグメントは、約 1 から約 100,000 の間の異なるおよび／または重複するゲノム領域を含む。

【0037】

一部の実施形態では、方法は、対象由来の試料を得ることを含む。一部の実施形態では、試料は、組織、血液、血漿、血清、喀痰、尿、精液、膿液、糞便、滑液、脊髄液、および唾液からなる群から選択される。一部の実施形態では、試料は組織を含む。一部の実施

10

20

30

40

50

形態では、試料は血液、血漿、および／または血清を含む。一部の実施形態では、対象は、哺乳動物対象である。一部の実施形態では、哺乳動物対象は、ヒト対象である。一部の実施形態では、核酸は、細胞外遊離核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、細胞内核酸を含む。一部の実施形態では、核酸は、循環腫瘍核酸を含む。一部の実施形態では、核酸を循環腫瘍細胞から得る。一部の実施形態では、核酸は、デオキシリボ核酸（DNA）および／またはリボ核酸（RNA）を含む。

【0038】

一部の実施形態では、方法は、試料中の核酸の少なくとも1つのセグメントを増幅させて、少なくとも1つの増幅した核酸を生成することを含む。一部の実施形態では、方法は、増幅した核酸のシーケンシングを行って、配列情報を生成することを含む。一部の実施形態では、方法は、核酸の少なくとも約50,000、約100,000、約150,000、約200,000、約250,000、約500,000、約750,000、約1,000,000、約1,500,000、約2,000,000ヌクレオチド、またはそれよりも多くのヌクレオチドのシーケンシングを行って、配列情報を生成することを含む。一部の実施形態では、シーケンシングは、標的化シーケンシング、イントロンシーケンシング、エキソームシーケンシング、および全ゲノムシーケンシングからなる群から選択される。

【0039】

一部の実施形態では、カスタマイズされた療法是、少なくとも1つの免疫療法を含む。一部の実施形態では、免疫療法的、少なくとも1つのチェックポイント阻害抗体を含む。一部の実施形態では、免疫療法的、PD-1、PD-2、PD-L1、PD-L2、CTLA-40、OX40、B7.1、B7He、LAG3、CD137、KIR、CCR5、CD27、またはCD40に対する抗体を含む。一部の実施形態では、免疫療法的、少なくとも1つの腫瘍型に対する炎症促進性サイトカインの投与を含む。一部の実施形態では、免疫療法的、少なくとも1つの腫瘍型に対するT細胞の投与を含む。

【0040】

一部の実施形態では、がんは、胆道がん、膀胱がん、移行上皮癌、尿路上皮癌、脳がん、神経膠腫、星状細胞腫、乳癌、化生性癌、子宮頸がん、子宮頸部扁平上皮癌、直腸がん、結腸直腸癌、結腸がん、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、結腸直腸腺癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮内膜癌、子宮内膜間質肉腫、食道がん、食道扁平上皮癌、食道腺癌、眼内黒色腫、ぶどう膜黒色腫、胆嚢癌、胆嚢腺癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、移行上皮癌、尿路上皮癌、ウィルムス腫瘍、白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、肝がん、肝癌、ヘパトーマ、肝細胞癌、胆管細胞癌、肝芽腫、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、中皮腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病、末梢性T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌（NPC）、神経芽細胞腫、中咽頭がん、口腔扁平上皮癌、骨肉腫、卵巣癌、膵がん、膵管腺癌、偽乳頭状新生物、腺房細胞癌、前立腺がん、前立腺腺癌、皮膚がん、黒色腫、悪性黒色腫、皮膚黒色腫、小腸癌、胃がん、胃癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮がん、および子宮肉腫からなる群から選択される少なくとも1つの腫瘍型を含む。

【0041】

一部の実施形態では、配列情報は、核酸シーケンサーによって生成された核酸の配列読み取りを含む。一部の実施形態では、核酸シーケンサーにより核酸に対してパイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングを実施して、シーケンシング読み取りを生成する。

【0042】

一部の実施形態では、方法は、シーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプター

ムから1つまたは複数の領域を選択的に富化させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、選択的に富化された領域をシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、配列情報を核酸の標的とされるセグメントから得て、標的とされるセグメントは、シーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプトームから1つまたは複数の領域を選択的に富化させることによって得る。一部の実施形態では、方法は、得られた標的とされるセグメントをシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含む。

【0043】

一部の実施形態では、方法は、シーケンシングの前に、分子バーコードを含む1つまたは複数のアダプターを核酸に付着させるステップをさらに含む。一部の実施形態では、核酸に、一意的にバーコード付けする。一部の実施形態では、核酸に、非一意的にバーコード付けする。一部の実施形態では、アダプターは、2から1,000,000の間の分子バーコードを含む。一部の実施形態では、アダプターは、2から100の間の分子バーコードを含む。一部の実施形態では、アダプターは、2から200の間の分子バーコードを含む。一部の実施形態では、アダプターは、2から100の間の分子バーコードを含む。一部の実施形態では、方法は、分子バーコードを含むアダプターを核酸の各末端にランダムに付着させることを含む。一部の実施形態では、アダプターを核酸に平滑末端ライゲーションまたは粘着末端ライゲーションによって付着させる。一部の実施形態では、アダプターは、T尾部を有するおよび／またはC尾部を有するアダプターである。

【0044】

一部の実施形態では、方法は、配列読み取りを配列読み取りのファミリーに群分けするステップをさらに含み、各ファミリーは、試料中の核酸から生成された配列読み取りを含む。

【0045】

一部の実施形態では、前記方法の少なくとも一部をコンピューターにより実行する。一部の実施形態では、方法は、1つまたは複数のTMBスコアを提示する電子形式の報告書を作成するステップをさらに含む。

【0046】

別の態様では、本開示は、少なくとも1つの電子プロセッサによって実行されると、少なくとも、(i)対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、(ii)核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、(iii)シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、(iv)予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象における腫瘍遺伝子変異量(TMB)を決定するステップとを実施する、非一時的なコンピューターで実行可能な命令を含むコンピューター可読媒体を含む、またはそれにアクセスすることができるコントローラを含むシステムを提供する。

【0047】

一部の実施形態では、システムは、コントローラに作動可能に接続された核酸シーケンサーを含み、核酸シーケンサーは、対象由来の試料中の核酸から配列情報をもたらすように構成されている。一部の実施形態では、核酸シーケンサーは、核酸に対してパイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングを実施して、シーケンシング読み取りを生成するように構成されている。一部の実施形態では、核酸シーケンサーまたは別のシステム構成要素は、核酸シーケンサーによって生成された配列読み取りを配列読み取りのファミリーに群分けするように構成されており、各ファミリーは、試料中の核酸から生成された配列読み取りを含む。

【0048】

一部の実施形態では、システムは、コントローラに作動可能に接続されたデータベースを含み、データベースは、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果を含み、電子プロセッサは、少なくとも（v）調整された結果を1つまたは複数の比較用結果と比較するステップであって、調整された結果と比較用結果が実質的にマッチすることにより、対象に対する療法に対する予想反応が示される、ステップをさらに実施する。

【0049】

一部の実施形態では、システムは、コントローラに作動可能に接続された試料調製構成要素を含み、試料調製構成要素は、核酸シーケンサーによってシーケンシングされる試料中の核酸を調製するように構成されている。一部の実施形態では、試料調製構成要素は、試料中のゲノムまたはトランスクリプトームから領域を選択的に富化するように構成されている。一部の実施形態では、試料調製構成要素は、分子バーコードを含む1つまたは複数のアダプターを核酸に付着させるように構成されている。

【0050】

一部の実施形態では、システムは、コントローラに作動可能に接続された核酸増幅構成要素を含み、核酸増幅構成要素は、対象由来の試料中の核酸を増幅するように構成されている。一部の実施形態では、核酸増幅構成要素は、試料中のゲノムまたはトランスクリプトームから選択的に富化された領域を増幅するように構成されている。

【0051】

一部の実施形態では、システムは、コントローラに作動可能に接続された材料移動構成要素を含み、材料移動構成要素は、1つまたは複数の材料を少なくとも核酸シーケンサーと試料調製構成要素の間を移動させるように構成されている。

【0052】

別の態様では、本開示は、少なくとも1つの電子プロセッサによって実行されると、少なくとも、（i）対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、（ii）核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（iii）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、（iv）予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定するステップとを実施する、非一時的なコンピューターで実行可能な命令を含むコンピューター可読媒体を提供する。一部の実施形態では、予測変異割合を使用して調整された変異カウントを決定する。

【0053】

本明細書に開示されるシステムおよびコンピューター可読媒体を使用して実行される方法は、複数の異なる実施形態を含む。一部の実施形態では、例えば、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の同義変異、複数の非同義変異、および／または複数の非コード変異を含む。ある特定の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、一塩基バリエーション（SNV）、挿入または欠失（インデル）、コピー数バリエーション（CNV）、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、およびエピジェネティックバリエーションからなる群から選択される複数の変異を含む。他の例示的な実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合からドライバー変異および／または腫瘍に関連しない変異（例えば、クローン性造血由来変異）が除外される。必要に応じて、所与の一塩基バリエーション（SNV）または所与の挿入もしくは欠失（インデル）に関して検出限界を下回る1つまたは複数の可能性のある変異のプールされたエビデンスを使用して観測変異カウントを決定する。

【0054】

一部の実施形態では、予測変異割合を使用して調整された変異カウントを決定する。一般には、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の体細胞変異を含む。これらの実施形態の一部では、観測変異カウントから1つまたは複数の既知のがんドライバーおよび／またはパッセンジャー変異が除外される。ある特定の実施

10

20

30

40

50

形態では、観測変異カウントを、配列情報と1つまたは複数の参照配列（例えば、hg19、hg38、および／または同様のものの少なくとも部分配列）を比較することによって決定する。

【0055】

ある特定の実施形態では、腫瘍割合は、核酸において識別される全ての体細胞変異の最大変異対立遺伝子割合（MAF）を含む。一般には、腫瘍割合は、試料中の全ての核酸の約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.5%未満、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、または約5%未満である。一部の実施形態では、カバレッジを、核酸における所与のヌクレオチド位を構成する独特の細胞外遊離DNA（cfDNA）分子の数の中央値を識別することによって決定する。一部の実施形態では、例えば、カバレッジは、試料中に存在する核酸における所与のヌクレオチド位において10個から50,000個の間のcfDNA断片である。

【0056】

一部の実施形態では、予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布は、変異割合に関して約95%またはそれよりも大きな信頼区間を含む。ある特定の実施形態では、予測変異割合の95%信頼区間の上限を使用して観測変異カウントの下限を生成する。一部の実施形態では、所与の変異対立遺伝子割合（MAF）における変異が予測MAFの分布にわたって識別される確率を算出することにより、予測変異割合を決定する。必要に応じて、相対的MAFの分布に腫瘍割合を掛けることによってMAFを生成する。一部の実施形態では、予測MAFの分布は、以下の二項比率の信頼区間を使用して算出される：

【数3】

$$f_{\text{上限}} = f + z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})}$$

$$f_{\text{下限}} = f - z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})}$$

（式中、fは、コールされる変異の予測割合であり、n_真は予測される実際の変異であり、これはfを考慮して観測される変異の数と等しく、zは信頼水準である）。本明細書に開示されるシステムまたはコンピューター可読媒体のある特定のインプリメンテーションは、以下の方程式：

観測された変異の割合 = $\sum \text{MAF} (P(\text{変異のコール} | \text{MAF}) \times P(\text{MAFにおける変異}))$

（式中、Pは確率であり、MAFは変異対立遺伝子割合である）
を使用して予測結果を決定することを含む。

【0057】

ある特定の実施形態では、MAFの予測分布は、少なくとも1つの対照試料データセットにおいて観測される相対的MAFから得られる。一部の実施形態では、比較用結果は、少なくとも約25、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約300、少なくとも約400、少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900、少なくとも約1,000、少なくとも約5,000、少なくとも約10,000、少なくとも約15,000、少なくとも約20,000、少なくとも約25,000、少なくとも約30,000、またはそれよりも多くの対照試料を含む。ある特定の実施形態では、対照試料データセットにおいて対照試料は、最大MAFの約0.5%、約1%、約2%、約5%または約10%を構成する。本明細書に開示されるシステムまたはコンピューター可読媒体の一部のインプリメンテーションは、相対的MAFを、以下の方程式：

$$F = 1 / (1 + (P_{50} / \text{相対的} - \text{MAF})^n)$$

（式中、Fは、累積分布関数であり、P₅₀は、相対的MAFの中央値であり、相対的 - MAFは相対的MAFであり、nは、相対的な分布の形状を当てはめるための指数であ

る)を使用して曲線に当てはめることを含む。一部の実施形態では、観測変異カウントを試料中の予測変異割合または予測変異割合の信頼区間の上限／下限で割ることにより、調整された結果を生成する。ある特定の実施形態では、調整された結果は、変異対立遺伝子割合の範囲にわたって核酸において検出される複数の変異を含む。一部の実施形態では、観測変異カウントを予測結果で割ることにより、調整された結果を生成する。ある特定の実施形態では、調整された結果は、可能性が最も高い実際の変異カウントの予想を含む。一部の実施形態では、調整された結果は、可能性が最も低い実際の変異カウントの予想を含む。ある特定の実施形態では、調整された結果は、調整された変異カウントを含む。これらの実施形態の一部では、調整された変異カウントは、観測変異カウントよりも大きいかまたはそれと等しい。一部の実施形態では、調整された変異カウント／調整された結果を解析される標的ゲノム領域のサイズとエキソーム較正因子の積で割って、TMBスコアを決定する。ある特定の実施形態では、エキソーム較正因子は、少なくとも1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、またはそれよりも大きい値であり、他の実施形態では、エキソーム較正因子は、1.0よりも小さい値(例えば、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、または0.9)を含む。一部の実施形態では、エキソーム較正因子は、がんデータベース(例えば、TCGAなど)内の試料のエキソーム変異率から決定される。ある特定の実施形態では、考慮中の所与のがんの型に特異的なエキソーム較正因子およびエキソーム変異率をそのがんの型を有する試料から決定する。一部の実施形態では、所与の試料のTMBスコアが閾値 $TMB_{スコア}$ よりも大きい場合、試料は、一般に、TMB-High試料に分類される。対照的に、試料のTMBスコアが閾値 $TMB_{スコア}$ よりも小さい場合、試料は、一般に、TMB-Low試料に分類される。一部の実施形態では、閾値 $TMB_{スコア}$ は、例えば、約5、10、15、20、25、30、35、40または別の選択された閾値であり得る。

【0058】

別の態様では、本開示は、通信ネットワークを通じて対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸からシーケンシング情報を得る通信インターフェースと、通信インターフェースと通信するコンピューターであって、少なくとも1つのコンピュータープロセッサと、少なくとも1つのコンピュータープロセッサによって実行されると、(i)対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、(ii)核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、(iii)シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、(iv)予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象における腫瘍遺伝子変異量(TMB)を検出するステップとを含む方法を実行する、機械により実行可能なコードを含むコンピューター可読媒体とを含む、コンピューターとを含むシステムを提供する。

【0059】

一部の実施形態では、シーケンシング情報は核酸シーケンサーによってもたらされる。一部の実施形態では、核酸シーケンサーにより核酸に対してパイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングを実施して、シーケンシング読み取りを生成する。一部の実施形態では、核酸シーケンサーは、シーケンシングライブラリーに由来するクローン単一分子アレイを使用して、シーケンシング読み取りを生成するものである。一部の実施形態では、核酸シーケンサーは、シーケンシングライブラリーのシーケンシングを行って、シーケンシング読み取りを生成するためのマイクロウェルのアレイを有するチップを含む。

【0060】

一部の実施形態では、コンピューター可読媒体は、記憶装置、ハードドライブまたはコンピューターサーバーを含む。一部の実施形態では、通信ネットワークは、分散コンピュ

ーティングを行うことができる1つまたは複数のコンピューターサーバーを含む。一部の実施形態では、分散コンピューティングは、クラウドコンピューティングである。一部の実施形態では、コンピューターは、核酸シーケンサーから離れた所に位置するコンピューターサーバー上に位置する。

【0061】

一部の実施形態では、コンピューター可読媒体は、ネットワークを通じてコンピューターと通信する電子ディスプレイをさらに含み、電子ディスプレイは、(i)～(iv)が実行された際の結果を表示するためのユーザーインターフェースを含む。一部の実施形態では、ユーザーインターフェースは、グラフィカルユーザーインターフェース(GUI)またはウェブベースユーザーインターフェースである。一部の実施形態では、電子ディスプレイは、パーソナルコンピューター中である。一部の実施形態では、電子ディスプレイは、インターネット接続可能なコンピューター中である。一部の実施形態では、インターネット接続可能なコンピューターはコンピューターから離れた位置にある。一部の実施形態では、コンピューター可読媒体は、記憶装置、ハードドライブまたはコンピューターサーバーを含む。一部の実施形態では、通信ネットワークは、電気通信ネットワーク、インターネット、エクストラネット、またはイントラネットを含む。

【0062】

一部の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合から、最大(max)MAFが約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約6%未満、約7%未満、約8%未満、約9%未満、約10%未満、約15%未満、約20%未満、約25%未満または約30%未満である体細胞変異が除外される。一部の実施形態では、予測／調整された変異カウントを、エキソーム校正因子を使用して調整する。一部の実施形態では、調整された変異カウントをエキソーム校正因子で割る。

【0063】

一部の実施形態では、変異カウントを、表2に列挙されている遺伝子を含む遺伝子またはゲノム領域のセットの中で決定する。

【0064】

別の態様では、本開示は、がんを有するか、または有する疑いがある対象由来の細胞外遊離核酸分子の試料を特徴付ける方法であって、試料に対してアッセイを実施して、表2に列挙されているものから選択される少なくとも100種、200種、300種、400種、または500種の遺伝子またはゲノム領域に遺伝的バリエーションが存在するかどうかを決定するステップを含む方法を提供する。一部の実施形態では、方法を1,000種以下の遺伝子に対して実施する。一部の実施形態では、方法は、表2からのアッセイされた遺伝子のうちの少なくとも1種に遺伝的バリエーションの存在が決定された対象にがん処置を施行するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、試料から核酸分子を単離し、少なくとも100種、200種、300種、400種、または500種の遺伝子に対応する核酸分子を、少なくとも100種、200種、300種、400種、または500種の遺伝子由来のセグメントを含有するプローブを用いて富化させるステップをさらに含む。

【0065】

さらに別の態様では、本開示は、がんを有するか、またはがんを有する疑いがある対象由来の細胞外遊離DNAの試料を解析するための方法であって、表2に列挙されている遺伝子からなる群から少なくとも100種、200種、300種、400種、または500種のゲノム領域を選択的に富化させて、富化されたライブラリーを生成するステップと、前記富化されたライブラリーを増幅させ、シーケンシング反応を実施するステップと、前記ゲノム領域における遺伝子バリエーションの存在について解析するステップとを含む方法を提供する。

【0066】

本明細書に開示される方法ならびに関連するシステムおよびコンピューター可読媒体インプリメンテーションは、種々の実施形態を含む。これらの方法および関連する態様は、

一般には、試料についてのTMBスコアを生成することを含む。ある特定の適用では、サブクローン性フィルターを利用する。これらの実施形態の一部では、低MAFの体細胞変異をフィルターで取り除くことにより、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合から体細胞変異を除外する。実施形態のある特定のものでは、例えば、サブクローン性フィルターを使用して、最大(max)MAFが約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約6%未満、約7%未満、約8%未満、約9%未満、約10%未満、約15%未満、約20%未満、約25%未満または約30%未満である体細胞変異を除外する。一部の実施形態では、体細胞変異を除外する／フィルターで取り除く代わりに、体細胞変異にクローン性に基づいて重み付けを行う（すなわち、低MAF変異だけでなく、各変異にいくらかの重みを与える）。他の例示的な実施形態では、予測および／または調整された変異カウントを、エキソーム較正因子を使用して調整する。これらの実施形態の一部では、調整された変異カウントをエキソーム較正因子で割る。ある特定の実施形態では、エキソーム較正因子は、少なくとも1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09、1.10、またはそれよりも大きい値であり、他の実施形態では、エキソーム較正因子は、1.0よりも小さい値（例えば、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、または0.9）を含む。一部の実施形態では、エキソーム較正因子は、がんデータベース（例えば、TCGAなど）内の試料のエキソーム変異率から決定される。ある特定の実施形態では、考慮中の所与のがんの型に特異的なエキソーム較正因子およびエキソーム変異率をそのがんの型を有する試料から決定する。

【0067】

一部の実施形態では、最大(max)MAFを使用する以外の代替的なやり方を使用して腫瘍割合を推定する。一部の実施形態では、例えば、ゲノム領域の所定のセットのカバレッジおよび標準の最尤法を使用して腫瘍割合を推定する。ある特定の実施形態では、試料中のゲノム領域の所定のセットとコピー数の変化を有する領域のcfDNA断片サイズ分布の差異を使用して腫瘍割合を決定する。必要に応じて、生殖細胞系列および／または体細胞バリエーションのMAFを試料において観測されるコピー数の変化に対して調整することによって腫瘍割合を推定する。一般には、決定されたTMBスコアから生殖細胞系列バリエーションを除外する。一部の実施形態では、生殖細胞系列／体細胞の状態を、考慮中の候補バリエーションの近くに位置する一般的な生殖細胞系列SNPのMAFの平均値および分散を推定するベータ二項分布モデルを使用して決定する。本明細書に開示される方法および関連する態様を実行することにおける使用のために必要に応じて適合させるベータ二項分布モデルに関連する追加的な詳細は、例えば、参照により組み込まれる[2018年9月20日出願のPCT/US2018/052087]にも記載されている。さらに、カバレッジも様々な手法を使用して決定する。一部の実施形態では、カバレッジを所与の試料中の塩基1つ当たりの独特のcfDNA断片の中央値として組み入れる。これらの実施形態のある特定のものでは、例えば、モデルを塩基特異的にすることができ、この方法は、各塩基における感度を、その塩基における独特のcfDNA断片の数を使用して算出することを含む。一般には、カバレッジは、所与の塩基位置におけるcfDNA断片が少なくとも10、50、100、500、1000、5000、10,000、20,000、50,000、またはそれよりも多くというものであり得る。

【0068】

一部の実施形態では、体細胞変異のカウント（観測変異カウント）から、(i)バックグラウンドエキソーム変異率もしくはTMBを表すものではないドライバー変異など、(ii)考慮中の腫瘍ではなくクローン性造血に由来する可能性が高い変異、および／または(iii)耐性変異を除外する。一部の実施形態では、ある特定の型の体細胞変異に対して、観測変異カウントから除外するまたはフィルターで取り除く代わりに重み付けを行う。ある特定の実施形態では、クローン性造血変異を、(i)文献およびがんデータベース（例えば、COSMICなど）に基づく、血液関連がんにおいて頻繁に観測される変異のキュレートされた一覧を使用して、(ii)試料中のそれらの状況（例えば、MAF）

(例えば、同様のMAFもしくは同様のMAFの範囲における他のクローン性造血バリエーションの存在)を使用して、および／もしくは以前に試験された試料のデータベースにおけるクローン性造血変異を解析することによって、ならびに／または(iii)血液に由来する患者試料(例えば、白血球(white blood cell))中のDNAのシーケンシングを行うことによって識別する。クローン性造血(例えば、未確定の潜在能をもつクローン性造血(clonal hematopoiesis of indeterminate potential)または「CHIP」)変異は、患者の年齢、メチル化の状態、ある特定の集団における変異の富化、本明細書にも開示される腫瘍割合を推定する方法、および／または同様のものなどの他の因子に基づいて識別することもできる。ある特定の実施形態では、耐性変異を、例えば、文献およびがんデータベースに基づく、患者試料において頻繁に観測される変異のキュレートされた一覧を使用して、かつ／または、以前に試験された試料のデータベースを解析することによって識別することができる。耐性機構または任意の他のプロセスにより、多数の遺伝子の変異または遺伝子の変異のクラスターが導入され得る(例えば、結腸直腸がんにおけるKRASまたはPARP阻害剤で処置された前立腺がんにおけるBRCA1/2復帰変異)。一部の実施形態では、例えば、特定の遺伝子における変異の数が、所与のパネルにおける全体的な試料変異カウント(mutation count)および遺伝子サイズに基づいてその遺伝子における変異の予測数よりも有意に多い場合、その特定の遺伝子における少なくとも少数の変異が観測変異カウント(mutation count)から除外される。ある特定の実施形態では、体細胞変異のカウントは、利用される特定のパネルの一部として報告されていない部位におけるSNVおよびインデルも含む。

【0069】

TMBスコアは、一般には、患者が免疫療法による処置に応答するかどうかを予想するために使用される。例えば、解析された遺伝子のセットにわたってある特定の遺伝子における特定の型の変異(例えば、STK11、KEAP1、PTENなどの機能喪失)および／または患者の変異シグネチャー(例えば、患者がC>T転移などを有する)が存在することをTMBスコアと組み合わせて使用して、療法に対する応答の可能性を予想することができる。一般には、遺伝子の機能喪失／ドライバー変異が優先し、その患者は療法に応答しない。すなわち、これだけに限定されないが、STK11、KEAP1およびPTENなどのある特定の遺伝子の機能喪失が観測される場合、患者はTMBスコアとは関係なく免疫療法に応答しない可能性が高い。

【0070】

一部の実施形態では、特定の遺伝子(例えば、DNA修復系遺伝子-MLH1、MLH2 & MLH3、MSH2 & MSH3、MSH6、PMS1 & PMS2;ポリメラーゼE)の変異、および、ある特定の領域、特にDNA修復系遺伝子のプロモーター領域のメチル化の状態などのある特定の因子をTMBスコアと組み合わせて、試料をTMB-High試料またはTMB-Low試料に分類することに使用することができる。

【0071】

基本的に任意の療法または療法の組合せを、必要に応じて、所与の患者に、例えばTMBスコア、がんの型および／またはステージ分類などの特定の状況に応じて施行する。そのような療法の例としては、本明細書においてさらに例示されているまたはそうでなければ当業者に公知の多数の他の療法の中でも、免疫療法、例えば、CAR-T細胞療法、ワクチン(例えば、一般的なまたは患者新抗原特異的)、オリゴヌクレオチドもしくはベクターに基づく遺伝学的療法、アブスコパル効果介入(例えば、照射療法)、免疫療法による処置／薬物(例えば、抗TIGIT)、免疫チェックポイント阻害剤および／もしくは抗体(例えば、抗TIGIT;PD-1、PD-2、PD-L1、PD-L2、CTLA-40、OX40、B7.1、B7He、LAG3、CD137、KIR、CCR5、CD27、またはCD40に対する抗体)、ならびに／または併用療法(例えば、免疫療法+PARPi+化学療法など)が挙げられる。

【0072】

本明細書に記載の T M B 決定を必要に応じて他の評価または技法とも組み合わせて、さらに処置に関する決定を下すこともできる。これらの一部の例としては、細胞の機構的な欠陥（例えば、所与の療法薬に対する応答の欠如）を評価すること、異数性の増大を評価すること（例えば、I O 療法に対する応答の潜在的な低下を測定するために）、同様に患者の状態の他の非 T M B 特徴（例えば、年齢、ハプロタイプ、民族性、性別など）の決定、T M B スコアの決定とヒト白血球抗原（H L A）喪失を組み合わせること、H L A シーケンシング（例えば、新抗原予想のための機構として）、トランスクリプトーム、免疫レパートリーシーケンシング、および／または療法応答の欠如もしくはそのような応答の可能性を予想するための他の解析手法が挙げられる。

【0073】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるシステムおよび方法の結果を、報告書を作成するための入力として使用する。報告書は、紙形式であっても電子形式であってもよい。例えば、本明細書に開示される方法およびシステムによって得られた調整された結果をそのような報告書に直接表示することができる。その代わりにまたはそれに加えて、調整された結果に基づいた診断情報または療法推奨を報告書に含めることができる。

【0074】

本明細書に開示される方法の種々のステップ、または本明細書に開示されるシステムによって行われるステップは、同じもしくは違う時間に、同じもしくは異なる地理的位置、例えば、国において、かつ／または同じもしくは異なる人が行うことができる。

【0075】

別の態様では、本開示は、対象を免疫療法の候補に分類する方法であって、a) 対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、(b) 核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、(c) シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、(d) 予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、(e) 調整された結果を使用して T M B スコアを決定するステップと、(f) T M B スコアを閾値 T M B スコアと比較して、対象を免疫療法の候補に分類するステップとを含む方法を提供する。

【0076】

別の態様では、本開示は、少なくとも部分的にコンピューターを使用して新抗原オフアン免疫受容体情報を生成する（すなわち、ステップの一部または全部がコンピューターを使用して実施される）方法に関する。方法は、(a) がんと診断された対象から得た血液試料中の核酸から得られた配列情報をコンピューターにより受け取るステップであって、配列情報の少なくとも第1の部分が、血液試料中の細胞外遊離核酸（c f N A）から得られたシーケンシング読み取りを含み、配列情報の少なくとも第2の部分が、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップを含む。方法は、(b) 配列情報の少なくとも第1の部分から対象の腫瘍遺伝子変異量（T M B）スコアを決定するステップと、(c) 配列情報の少なくとも第2の部分における免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別するステップとも含む。さらに、方法は、(d) T M B スコアと1つまたは複数のクローン型を相関させて、対象における1つまたは複数の新抗原オフアン免疫受容体を識別し、それにより、新抗原オフアン免疫受容体情報を生成するステップも含む。

【0077】

一部の実施形態では、方法は、新抗原オフアン免疫受容体情報を使用して対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップをさらに含む。これらの実施形態のある特定のものでは、方法は、1つまたは複数のカスタマイズされた療法を対象に施行するステップをさらに含む。一部の実施形態では、方法は、配列情報の第1の部分における1つまたは複数のバリエーションを識別して、T M B スコアを決定することを含み、バリエーションは、一塩基バリエーション（S N V）、挿入または欠失（インデル）、コピー数

10

20

30

40

50

バリエーション（CNV）、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復バリエーション、およびエピジェネティックバリエーションからなる群から選択される1つまたは複数の変異を含む。これらの実施形態の一部では、反復バリエーションは、1つまたは複数のマイクロサテライトバリエーションを含む。これらの実施形態のある特定のものでは、方法は、配列情報の第2の部分における1つまたは複数の他のバリエーションを識別して、TMBスコアを決定するステップをさらに含み、他のバリエーションは、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸における1つまたは複数の体細胞変異を含む。

【0078】

別の態様では、本開示は、がんと診断された対象由来の血液試料中の多数の解析物を解析する方法に関する。方法は、（a）血液試料中の細胞外遊離核酸（cfNA）の第1のセットおよび血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞由来の核酸の第2のセットを単離するステップと、（b）T細胞受容体のアルファおよび／またはベータサブユニットの少なくとも一部をコードする核酸の第2のセットの1つまたは複数の領域を増幅させて、富化された核酸の第2のセットを生成するステップとを含む。方法は、（c）cfNAの第1のセットの1つまたは複数の領域および富化された核酸の第2のセットの1つまたは複数の領域のシーケンシングを行って、配列情報を作製するステップと、（d）配列情報から対象の腫瘍遺伝子変異量（TMB）スコアを決定するステップとも含む。さらに、方法は、（e）配列情報から免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別するステップと、（f）TMBスコアと1つまたは複数のクローン型を相関させて、対象における1つまたは複数の新抗原オーファン免疫受容体を識別し、それにより、がんと診断された対象由来の血液試料中の多数の解析物を解析するステップとも含む。

【0079】

別の態様では、本開示は、少なくとも部分的にコンピューターを使用して対象由来の血液試料中の核酸を解析する方法に関する。方法は、（a）対象由来の血液試料中の核酸から得られた配列情報をコンピューターによって受け取るステップであって、配列情報の少なくとも第1の部分が、血液試料中の細胞外遊離核酸（cfNA）から得られたシーケンシング読み取りを含み、配列情報の少なくとも第2の部分が、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップを含む。方法は、（b）配列情報の第1の部分における1つまたは複数のバリエーションおよび配列情報の第2の部分における免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別し、それにより、対象由来の血液試料中の核酸を解析するステップも含む。

【0080】

一部の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分における観測変異カウントを決定するステップと、（ii）配列情報の第1の部分における少なくともcfNAの腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、（iii）シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、（iv）予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定するステップとを含む。ある特定の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分および／または第2の部分に由来する複数の反復性核酸遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、複数の反復性核酸遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、配列情報が、反復性核酸遺伝子座の集団を含む、ステップと、（ii）所与の反復性核酸遺伝子座の部位スコアが所与の反復性核酸遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、所与の反復性核酸遺伝子座を不安定であるとコールして、複数の反復性核酸遺伝子座由来の複数の不安定な反復性核酸遺伝子座を含む反復性核酸不安定性スコアを生成するステップと、（iii）反復性核酸不安定性スコアが血液試料中の反復性核酸遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、血液試料の反復性核酸不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、血液試料の反復性核酸不安定性の状態を決定するステップとを含む。

【0081】

ある特定の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分および／または第2の部分由来の複数の反復性デオキシリボ核酸（DNA）遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、配列情報が、反復性DNA遺伝子座の集団を含む、ステップと、（ii）複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについて、所与の反復性DNA遺伝子座の部位スコアを所与の反復性DNA遺伝子座についての部位特異的訓練閾値と比較するステップと、（iii）所与の反復性DNA遺伝子座の部位スコアが所与の反復性DNA遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、所与の反復性DNA遺伝子座を不安定であるとコールして、複数の反復性DNA遺伝子座由来の複数の不安定な反復性DNA遺伝子座を含む反復性DNA不安定性スコアを生成するステップと、（iv）反復性DNA不安定性スコアが血液試料中の反復性DNA遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、血液試料の反復性DNA不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、血液試料の反復性DNA不安定性の状態を決定するステップとを含む。一部の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分および／または第2の部分由来の複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、配列情報が、マイクロサテライト遺伝子座の集団を含む、ステップと、（ii）所与の反復性核酸遺伝子座の部位スコアが所与の反復性核酸遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、所与の反復性核酸遺伝子座を不安定であるとコールして、複数の反復性核酸遺伝子座由来の複数の不安定な反復性核酸遺伝子座を含む反復性核酸不安定性スコアを生成するステップと、（iii）反復性核酸不安定性スコアが血液試料中の反復性核酸遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、血液試料の反復性核酸不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、血液試料の反復性核酸不安定性の状態を決定するステップとを含む。

【0082】

一部の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分および／または第2の部分由来の複数の反復性デオキシリボ核酸（DNA）遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、配列情報が、反復性DNA遺伝子座の集団を含む、ステップと、（ii）複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについて、所与の反復性DNA遺伝子座の部位スコアを所与の反復性DNA遺伝子座についての部位特異的訓練閾値と比較するステップと、（iii）所与の反復性DNA遺伝子座の部位スコアが所与の反復性DNA遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、所与の反復性DNA遺伝子座を不安定であるとコールして、複数の反復性DNA遺伝子座由来の複数の不安定な反復性DNA遺伝子座を含む反復性DNA不安定性スコアを生成するステップと、（iv）反復性DNA不安定性スコアが血液試料中の反復性DNA遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、血液試料の反復性DNA不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、血液試料の反復性DNA不安定性の状態を決定するステップとを含む。別の実施形態では、方法は、（i）配列情報の第1の部分および／または第2の部分由来の複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、配列情報が、マイクロサテライト遺伝子座の集団を含む、ステップと、（ii）複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれについて、所与のマイクロサテライト遺伝子座の部位スコアを所与のマイクロサテライト遺伝子座についての部位特異的訓練閾値と比較するステップと、（iii）所与のマイクロサテライト遺伝子座の部位スコアが所与のマイクロサテライト遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、所与のマイクロサテライト遺伝子座を不安定であるとコールして、複数のマイクロサテライト遺伝子座由来の複数の不安定なマイクロサテライト遺伝子座を含むマイクロサテライト不安定性スコアを生成するステップと、（iv）マイクロサテライト不安定性スコアが血液試料中のマイクロサテライト遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、血液試料のマ

10

20

30

40

50

イクロサテライト不安定性 (MSI) の状態を不安定であると分類し、それにより、血液試料のMSIの状態を決定するステップとを含む。

【0083】

一部の実施形態では、方法は、配列可変標的領域セットとエピジェネティック標的領域セットとを含む、細胞外遊離DNA (cfDNA) の標的領域の複数のセットを捕捉することを含み、それにより、捕捉されたcfDNA分子のセットが生じ、配列可変標的領域セットに対応するcfDNA分子が、エピジェネティック標的領域セットに対応するcfDNA分子よりも高い捕捉収率で捕捉されたcfDNA分子のセット内に捕捉される。ある特定の実施形態では、cfDNAは、細胞外遊離DNA (cfDNA) を含む。一部の実施形態では、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸は、mRNAおよび／またはgDNAを含む。一部の実施形態では、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸は、抗体、B細胞受容体、およびT細胞受容体からなる群から選択される免疫学的ポリペプチドの少なくとも一部をコードする。一部の実施形態では、方法は、cfDNAを血液試料の血漿画分または血清画分から得ることを含む。ある特定の実施形態では、方法は、血液試料の Buffy コート画分由来の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸を得ることを含む。

【0084】

別の態様では、本開示は、通信ネットワークを通じて対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸からシーケンシング情報を得る通信インターフェースを含むシステムに関する。システムは、通信インターフェースと通信するコンピューターであって、少なくとも1つのコンピュータープロセッサと、少なくとも1つのコンピュータープロセッサによって実行されると、(i) がんと診断された対象から得た血液試料中の核酸から得られた配列情報を受け取るステップであって、配列情報の少なくとも第1の部分が、血液試料中の細胞外遊離核酸 (cfDNA) から得られたシーケンシング読み取りを含み、配列情報の少なくとも第2の部分が、血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップと、(ii) 配列情報の少なくとも第1の部分から対象の腫瘍遺伝子変異量 (TMB) スコアを決定するステップと、(iii) 配列情報の少なくとも第2の部分における免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別するステップと、(iv) TMBスコアと1つまたは複数のクローン型を相関させて、対象における1つまたは複数の新抗原オーファン免疫受容体を識別するステップとを含む方法を実行する、機械により実行可能なコードを含むコンピューター可読媒体とを含む、コンピューターも含む。

【0085】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する付属図は、ある特定の実施形態を例示するものであり、明細書と共に、本明細書に開示される方法、コンピューター可読媒体、およびシステムのある特定の原理を説明する機能を果たす。本明細書に提示される説明は、例として含まれ、限定するものではない付属図と併せて読むとよりよく理解される。図全体を通して、文脈からそうでないことが示されない限り、同様の参照数字により同様の構成要素が識別されることが理解されよう。図面の一部または全部は、例示のために略図であり得、必ずしも示されている要素の実際の相対的なサイズまたは位置を示すものではないことも理解されよう。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図1】図1は、本発明の一部の実施形態に従ってTMBを調整する例示的な方法のステップを概略的に示すフローチャートである。

【0087】

【図2】図2は、本発明のある特定の実施形態での使用に適した例示的なシステムの概略図である。

【0088】

【図3】図3は、本開示の一実施形態に従った、同じ試験試料由来の細胞外遊離DNA解

析と免疫レパートリーのシーケンシングのための複合ワークフローを示すフローチャートである。免疫レパートリーのプロファイリングとTMB解析の集合的な結果から、免疫療法に対する応答スコアの増強がもたらされる。

【0089】

【図4】図4Aおよび4Bは、本開示の一実施形態に従ったTCR gDNAアッセイ（図4A）および免疫受容体RNAアッセイ（図4B）のための試料調製方法を示す概略図である。

【0090】

【図5】図5は、本開示の一実施形態に従った、同じ試験試料由来の細胞外遊離DNA解析と免疫レパートリーのシーケンシングのための複合ワークフローを示すフローチャートである。

10

【0091】

【図6】図6は、本明細書に開示されるTMB補正または調整方法を適用した（○）および適用していない（△）、腫瘍割合が小さく、かつカバレッジが小さい試料のTMBスコアプロットである。

【0092】

【図7】図7は、本発明の一部の実施形態に従った例示的なTMBワークフローを概略的に示すフローチャートである。

【0093】

【図8】図8Aおよび8Bは、非同義コード塩基バリエーション（SNV）と相関する変異型を示すプロットである。具体的には、図8Aは、非同義SNVと相関する同義SNVを示すプロットである（ピアソンの $r=0.90$ ；非同義SNVの数（x軸）；同義SNVの数（y軸））。図8Bは、非同義SNVと相関するインデルを示すプロットである（ピアソンの $r=0.71$ ；非同義SNVの数（x軸）；インデルの数（y軸））。図8Cは、イントロンSNVの率とエクソンSNVの率が相関することを示すプロットである（ピアソンの $r=0.89$ ；イントロンSNVの率（x軸）；エクソンSNVの率（y軸））。

20

【0094】

【図9】図9A～9Dは、大パネルアッセイの腫瘍シェディング補正により、変異カウント（mutation count）の（図9A（最大（max）MAFビン（%）（x軸）；変異カウント（mutation count）（y軸）））腫瘍シェディングおよび（図9B（分子カバレッジ（ $\times 1000$ ）（x軸）；変異カウント（mutation count）（y軸）））入力cfDNAへの依存が取り除かれ、その結果、これらの入力メトリクスにほとんど依存しないpTMBがもたらされる（図9C（最大（max）MAFビン（%）（x軸）；TMB（mut/Mb）（y軸））および9D（分子カバレッジ（ $\times 1000$ ）（x軸）；TMB（mut/Mb）（y軸）））ことを示すバイオリンプロットである。

30

【0095】

【図10】図10A（TMB（mut/Mb）（x軸）；試料の割合（%）（y軸））および10B（TMB（mut/Mb）（x軸）；腫瘍型（y軸））は、それぞれ、コホートにわたる、および腫瘍型間のTMB分布を示すプロットである。

40

【0096】

【図11】図11A（主成分（PC）1（x軸）；PC2（y軸））および11B（TMB（mut/Mb）（x軸）；民族性（y軸））は、それぞれ主成分解析（PCA）クラスタリングおよびTMBスコアを示すプロットである。

【0097】

【図12】図12は、TMBと発がん性変異の相関を示すプロットである（TMB（mut/Mb）（x軸）；ドライバー変異（y軸））。

【0098】

【図13】図13Aは、体細胞変異のクローン性および染色体不安定性がTMBランドスケープにわたって高度に変動することを示すプロットである。図13Bは、TMB-Hi

50

g h 試料のサブセットにおいて高スコアのマイクロサテライト不安定性 (M S I - H i g h) が検出されたことを示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0099】

定義

本開示をより容易に理解するために、まずある特定の用語を以下に定義する。以下の用語および他の用語についての追加的な定義が本明細書を通して記載されている場合がある。下記の用語の定義が参照により組み込まれる出願または特許における定義と相反する場合には、本出願に記載の定義がその用語の意味を理解するために使用されるべきである。

【0100】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、「1つの (a)」、「1つの (an)」、および「その (the)」という単数形は、文脈によりそうでないことが明確に規定されない限り、複数の参照対象を含む。したがって、例えば、「1つの (a) 方法」への言及は、1つまたは複数の方法、ならびに／または本明細書に記載の型のおよび／もしくは本開示を読めば当業者には明らかになるステップなどを含む。

【0101】

本明細書において使用される用語法は、特定の実施形態を説明するためだけのものであり、限定的なものではないことも理解される。さらに、別段の定義のない限り、本明細書において使用される全ての科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者に一般に理解されるものと同じ意味を有する。方法、コンピューター可読媒体、およびシステムを記載し、特許請求する際に、以下の用語法、およびそれらの文法上の変形は下記の定義に従って使用される。

【0102】

約：本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」は、目的の1つまたは複数の値または要素に適用される場合、規定された参照値または要素と同様の値または要素を指す。ある特定の実施形態では、「約」または「およそ」という用語は、別段の指定のない限り、または文脈からそうでないことが明らかでない限り、規定された参照値または要素の、いずれかの方向（より大きい方またはより小さい方）に、25%以内、20%以内、19%以内、18%以内、17%以内、16%以内、15%以内、14%以内、13%以内、12%以内、11%以内、10%以内、9%以内、8%以内、7%以内、6%以内、5%以内、4%以内、3%以内、2%以内、1%以内、またはそれ未満の%以内に入る値または要素の範囲を指す（そのような数が可能性のある値または要素の100%を超える場合を除く）。

【0103】

調整された腫瘍遺伝子変異量：本明細書で使用される場合、「調整された腫瘍遺伝子変異量」、「調整された腫瘍遺伝子変異量 (tumor mutation burden)」、または「調整された結果」は、観測変異カウントを腫瘍割合、カバレッジ、および／または別のシーケンシングパラメータが説明されるように補正したものを指す。

【0104】

投与する：本明細書で使用される場合、治療剤（例えば、免疫学的治療剤）を対象に「投与する」または「投与すること」とは、組成物を対象に与える、適用するまたは接触させることを意味する。投与は、例えば、局部、経口、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、髄腔内および皮内を含めた複数の経路のいずれかによって実現することができる。

【0105】

アダプター：本明細書で使用される場合、「アダプター」は、一般には少なくとも部分的に二本鎖であり、所与の試料核酸分子の一方または両方の末端との連結のために使用される、短い核酸（例えば、約500ヌクレオチド未満、約100ヌクレオチド未満、または約50ヌクレオチド未満の長さ）を指す。アダプターは、両末端にアダプターが隣接する核酸分子の増幅を可能にするための核酸プライマー結合性部位、および／または、種々の次世代シーケンシング (NGS) 適用などのシーケンシングに適用するためのプライマ

10

20

30

40

50

一結合性部位を含めたシーケンシングプライマー結合性部位を含み得る。アダプターは、例えばフローセル支持体に付着させたオリゴヌクレオチドなどの捕捉用プローブの結合性部位も含み得る。アダプターは、本明細書に記載の核酸タグも含み得る。核酸タグは、一般には、増幅プライマーおよびシーケンシングプライマー結合性部位に対して、核酸タグが所与の核酸分子のアンプリコンおよび配列読み取りに含まれるように位置付けられる。核酸分子のそれぞれの末端に同じまたは異なるアダプターを連結することができる。一部の実施形態では、核酸分子のそれぞれの末端に、核酸タグが異なる以外は同じアダプターを連結する。一部の実施形態では、アダプターは、一方の末端が、核酸分子との接合のために本明細書に記載の通り平滑末端化されたかまたは尾部付加された Y 形アダプターであり、核酸分子も同様に 1 つまたは複数の相補的なヌクレオチドで平滑末端化されたかまたは尾部付加されている。さらに他の実施形態例では、アダプターは、解析される核酸分子との接合のための平滑または尾部付加末端を含む鐘形アダプターである。アダプターの他の例としては、T 尾部を有するアダプターおよび C 尾部を有するアダプターが挙げられる。

10

【0106】

増幅させる：本明細書で使用される場合、「増幅させる」または「増幅」は、核酸に関しては、ポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドの一部の多数のコピーを、一般には少量のポリヌクレオチド（例えば、単一のポリヌクレオチド分子）から出発して産生させることを指し、増幅産物またはアンプリコンが一般に検出可能である。ポリヌクレオチドの増幅は、種々の化学的および酵素的プロセスを包含する。

【0107】

バーコード：本明細書で使用される場合、「バーコード」または「分子バーコード」は、核酸に関しては、分子識別子としての機能を果し得る配列を含む核酸分子を指す。例えば、一般には、次世代シーケンシング（NGS）ライブラリー調製の間に個々の「バーコード」配列を各 DNA 断片に付加し、したがって、最終的なデータ解析前に各読み取りを識別し、選別することができる。

20

【0108】

がんの型：本明細書で使用される場合、「がんの型」とは、例えば病理組織検査によって定義されるがんの型または亜型を指す。がんの型は、任意の従来の基準によって、例えば、所与の組織における発生に基づいて（例えば、血液がん、中枢神経系（CNS）、脳がん、肺がん（小細胞および非小細胞）、皮膚がん、鼻のがん、咽頭がん、肝がん、骨がん、リンパ腫、膵がん、腸がん（bowel cancer）、直腸がん、甲状腺がん、膀胱がん、腎がん、口腔がん、胃がん、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、肺がん、腸がん（intestinal cancer）、軟部組織がん、神経内分泌がん、胃食道のがん、頭頸部がん、婦人科のがん、結腸直腸がん、尿路上皮がん、固形状態のがん、異種がん、同種がん）、原発不明などに基づいて、ならびに／または同じ細胞系列のものに基づいて（例えば、癌腫、肉腫、リンパ腫、胆管細胞癌、白血病、中皮腫、黒色腫、または神経膠芽腫）、ならびに／または、Her2、CA15-3、CA19-9、CA-125、CEA、AFP、PSA、HCG、ホルモン受容体およびNMP-22などのがんマーカーを示すがんに基づいて定義することができる。がんは、ステージ（例えば、ステージ1、2、3、または4）および原発性であるか続発性であるかによって分類することもできる。

30

【0109】

細胞外遊離核酸：本明細書で使用される場合、「細胞外遊離核酸」とは、細胞内に含有されないもしくは他のやり方で細胞に結合していない核酸、または一部の実施形態では、インタクトな細胞の除去後に試料中に残っている核酸を指す。細胞外遊離核酸は、例えば、対象由来の体液（例えば、血液、血漿、血清、尿、脳脊髄液（CSF）など）を供給源とする封入されていない核酸全てを含み得る。細胞外遊離核酸はゲノムDNA、ミトコンドリアDNA、循環DNA、siRNA、miRNA、循環RNA（cRNA）、tRNA、rRNA、低分子核小体RNA（snRNA）、Piwi相互作用性RNA（piRNA）、高分子非コードRNA（高分子ncRNA）、および／またはこれらのいずれ

40

50

かの断片を含めた、DNA (cfDNA)、RNA (cfRNA)、およびそれらのハイブリッドを含む。細胞外遊離核酸は、二本鎖、一本鎖、またはそれらのハイブリッドであり得る。細胞外遊離核酸は、分泌または細胞死プロセス、例えば、細胞壊死、アポトーシスなどを通じて体液中に放出され得る。一部の細胞外遊離核酸は、がん細胞から体液中に放出される、例えば循環腫瘍DNA (ctDNA) である。他の細胞外遊離核酸は健康な細胞から放出される。ctDNAは、封入されていない腫瘍由来断片化DNAであり得る。細胞外遊離核酸は、1つまたは複数のエピジェネティック修飾を有し得、例えば、細胞外遊離核酸は、アセチル化、5-メチル化、ユビキチン化、リン酸化、SUMO化、リボシル化、および／またはシトルリン化されたものであり得る。

【0110】

細胞内核酸：本明細書で使用される場合、「細胞内核酸」とは、後で所与の解析プロセスの一部として除去されたとしても（例えば、細胞溶解によって）、少なくとも対象から試料を取得または採取した時点で1つまたは複数の細胞内に配置されている核酸を意味する。

【0111】

クローン性造血由来変異：本明細書で使用される場合、「クローン性造血由来変異」は、クローン性増大を導く造血幹細胞および／または前駆細胞におけるゲノム変異の体細胞性の獲得を指す。

【0112】

クローン型：本明細書で使用される場合、「クローン型」は、免疫細胞受容体に関しては、その受容体をコードするヌクレオチド配列の変異プロセスまたは遺伝子再構成プロセスに起因する独特のヌクレオチド配列（例えば、T細胞受容体 (TCR) ポリペプチド鎖のCDR3配列をコードする独特のヌクレオチド配列）を指す。

【0113】

比較用結果：本明細書で使用される場合、「比較用結果」とは、所与の試験試料または試験結果の1つまたは複数の可能性のある特性、ならびに／あるいは、試験試料を取得したまたは他のやり方で導き出した対象に関する1つもしくは複数の可能性のある予後転帰および／または1つもしくは複数のカスタマイズされた療法を識別するために、当該試験試料または結果の比較対象とすることができる結果または結果のセットを意味する。比較用結果は、一般には、参照試料のセット（例えば、試験対象と同じがんの型を有する対象および／または試験対象と同じ療法を受けているもしくは受けたことがある対象に由来するもの）から得られる。ある特定の実施形態では、例えば、調整されたTMBスコアを比較用結果と比較して、試験試料に対して決定された調整されたTMBスコアと参照試料のセットに対して決定されたTMBスコアの実質的なマッチを識別する。一般には、参照試料のセットに対して決定されたTMBスコアにより、1つまたは複数のカスタマイズされた療法が指し示される。したがって、実質的なマッチが識別されたら、それにより、対応するカスタマイズされた療法も試験試料を取得した対象に対する潜在的な療法経路として識別される。

【0114】

信頼区間：本明細書で使用される場合、「信頼区間」とは、値の範囲であって、その値の範囲内に所与のパラメータの値が既定の確率で入ると定義される値の範囲を意味する。

【0115】

対照試料：本明細書で使用される場合、「対照試料」とは、分析手順の正確度を評価するために、試験試料と一緒に分析されるかまたは試験試料と比較される、組成が既知であり、かつ／または既知の特性および／もしくは既知のパラメータ（例えば、既知の腫瘍割合、既知のカバレッジ、既知のTMB、および／または同様のもの）を有する試料を指す。一部の実施形態では、対照試料データセットに使用される対照試料は、がんの型に特異的なものおよび／または処置に特異的なものであり得る。

【0116】

対照試料データセット：本明細書で使用される場合、「対照試料データセット」とは、

10

20

30

40

50

所定の閾値腫瘍割合よりも大きい腫瘍割合を有する対照試料のデータセットを指す。

【0117】

コピー数バリエーション：本明細書で使用される場合、「コピー数バリエーション」、「CNV」、または「コピー数バリエーション」とは、ゲノムの切片が反復され、ゲノム内の反復の数が考慮中の集団内の個体間で変動し、また、ある個体の2つの条件または状態の間で変動する現象を指す（例えば、CNVは、ある個体において療法を受ける前と受けた後で変動し得る）。

【0118】

カバレッジ：本明細書で使用される場合、「カバレッジ」とは、特定の塩基位置を表す核酸分子の数を指す。

【0119】

カスタマイズされた療法：本明細書で使用される場合、「カスタマイズされた療法」とは、所与のTMBスコアを有するまたは定義されたTMBスコアの範囲内に入る対象または対象の集団に関する所望の療法転帰を伴う療法を指す。

【0120】

デオキシリボ核酸またはリボ核酸：本明細書で使用される場合、「デオキシリボ核酸」または「DNA」とは、糖部分の2'位に水素基を有する天然のまたは改変されたヌクレオチドを指す。DNAは、一般には、4つの型のヌクレオチド塩基；アデニン（A）、チミン（T）、シトシン（C）、およびグアニン（G）で構成されるヌクレオチドの鎖を含む。本明細書で使用される場合、「リボ核酸」または「RNA」とは、糖部分の2'位にヒドロキシル基を有する天然のまたは改変されたヌクレオチドを指す。RNAは、一般には、4つの型のヌクレオチド；A、ウラシル（U）、G、およびCで構成されるヌクレオチドの鎖を含む。本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」という用語は、天然のヌクレオチドまたは改変されたヌクレオチドを指す。ある特定のヌクレオチドの対は、互いに相補的に特異的に結合する（相補的塩基対合と称される）。DNAでは、アデニン（A）はチミン（T）と対合し、シトシン（C）はグアニン（G）と対合する。RNAでは、アデニン（A）はウラシル（U）と対合し、シトシン（C）はグアニン（G）と対合する。第1の核酸鎖が、第1の鎖のヌクレオチドと相補的なヌクレオチドで構成される第2の核酸鎖と結合する場合、これらの2つの鎖は結合して二本鎖を形成する。本明細書で使用される場合、「核酸シーケンシングデータ」、「核酸シーケンシング情報」、「配列情報」、「核酸配列」、「ヌクレオチド配列」、「ゲノム配列」、「遺伝子配列」、または「断片配列」、または「核酸シーケンシング読み取り」とは、DNAまたはRNAなどの核酸の分子（例えば、全ゲノム、全トランスクリプトーム、エキソーム、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、または断片）内のヌクレオチド塩基（例えば、アデニン、グアニン、シトシン、およびチミンまたはウラシル）の順序および同一性を示す任意の情報またはデータを示す。本教示では、これだけに限定されないが、キャピラリー電気泳動、マイクロアレイ、ライゲーションに基づくシステム、ポリメラーゼに基づくシステム、ハイブリダイゼーションに基づくシステム、直接または間接ヌクレオチド識別システム、パイロシーケンシング、イオンまたはpHに基づく検出システム、および電子シグネチャーに基づくシステムを含めた全ての利用可能な種々の技法、プラットフォームまたは技術を使用して得られた配列情報が意図されることが理解されるべきである。

【0121】

ドライバー変異：本明細書で使用される場合、「ドライバー変異」とは、がんの増悪を駆動する変異を意味する。

【0122】

予測変異割合の予測分布：本明細書で使用される場合、「予測変異割合の予測分布」とは、統計学的分布モデル、例えば二項分布などによって決定された予測変異割合の範囲を指す。

【0123】

予測変異カウント：本明細書で使用される場合、「予測変異カウント（expecte

10

20

30

40

50

d mutational count)」または「予測変異カウント (expected mutation count)」または「調整された変異カウント (adjusted mutational count)」または「調整された変異カウント (adjusted mutational count)」とは、調整された観測変異カウント (mutation count) を指す。

【0124】

予測変異割合 (f) : 本明細書で使用される場合、「予測変異割合」とは、試料においてコールされる実際の体細胞変異の割合を指し、これは、バイオインフォマティクス解析の感度、および、対照試料データセットにおいてバイオインフォマティクス解析によって決定された全ての変異の相対的MAFのデータベースから導き出される相対的MAFの分布から導き出される。

10

【0125】

予測結果 : 本明細書で使用される場合、「予測結果」とは、推定される、可能性が高い、または予想される結果を意味する。

【0126】

免疫レパートリー : 本明細書で使用される場合、「免疫レパートリー」とは、対象の適応免疫系を構成するT細胞受容体およびB細胞受容体 (すなわち、免疫グロブリン) の合計を指す。

【0127】

免疫療法 : 本明細書で使用される場合、「免疫療法」とは、がん細胞を死滅させるかまたは少なくともその成長を阻害し、好ましくはがんのさらなる成長を低減し、がんのサイズを縮小させ、かつ／またはがんを排除するように免疫系を刺激するように作用する1つまたは複数の薬剤を用いた処置を指す。そのような薬剤の中には、がん細胞に存在する標的に結合するものもあり、免疫細胞に存在し、がん細胞には存在しない標的に結合するものもあり、がん細胞と免疫細胞の両方に存在する標的に結合するものもある。そのような薬剤としては、これだけに限定されないが、チェックポイント阻害剤および／または抗体が挙げられる。チェックポイント阻害剤は、自己寛容を維持し、末梢組織における生理的免疫応答の持続時間および振幅を、副次的な組織損傷が最小限になるようにモジュレートする免疫系の経路の阻害剤である (例えば、Pardoll, Nature Reviews Cancer 12, 252-264 (2012) を参照されたい)。例示的な薬剤としては、PD-1、PD-2、PD-L1、PD-L2、CTLA-40、OX40、B7.1、B7He、LAG3、CD137、KIR、CCR5、CD27、またはCD40のいずれかに対する抗体が挙げられる。他の例示的な薬剤としては、IL-1 β 、IL-6、およびTNF- α などの炎症促進サイトカインが挙げられる。他の例示的な薬剤は、T細胞によって認識される腫瘍抗原を標的とするキメラ抗原の発現によって活性化されるT細胞などの、腫瘍に対して活性化されるT細胞である。

20

30

【0128】

インデル : 本明細書で使用される場合、「インデル」とは、対象のゲノム内のヌクレオチドの挿入または欠失を伴う変異を指す。

【0129】

指し示す : 本明細書で使用される場合、「指し示す」とは、第1の要素 (例えば、TM Bスコア) が第2の要素 (例えば、所与の療法) に関連付けられることを指す。

40

【0130】

最大 (maximum) MAF : 本明細書で使用される場合、「最大 (maximum) MAF」または「最大 (max) MAF」とは、試料中の全ての体細胞バリエーションの最大MAFを指す。

【0131】

マイナー対立遺伝子頻度 : 本明細書で使用される場合、「マイナー対立遺伝子頻度」とは、対象から得た試料などの所与の核酸の集団における主要でない対立遺伝子 (例えば、最も一般的なものではない対立遺伝子) の存在頻度を指す。一般には、マイナー対立遺伝

50

子頻度が低い遺伝子バリエーションは試料中に存在する頻度が比較的低い。

【0132】

変異対立遺伝子割合：本明細書で使用される場合、「変異対立遺伝子割合」、「変異量」、または「MAF」とは、所与の試料中の所与のゲノム内の位置に対立遺伝子の変更または変異を有する核酸分子の割合を指す。MAFは、一般に、割合またはパーセンテージとして表される。例えば、MAFは、一般には、所与の遺伝子座に存在する全ての体細胞バリエーションまたは対立遺伝子の約0.5未満、約0.1未満、約0.05未満、または約0.01未満（すなわち、約50%未満、約10%未満、約5%未満、または約1%未満）である。

【0133】

変異：本明細書で使用される場合、「変異」とは、既知の参照配列からのバリエーションを指し、例えば、一塩基バリエーション（SNV）、コピー数バリエーションまたはバリエーション（CNV）／異常、挿入または欠失（インデル）、遺伝子融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、およびエピジェネティックバリエーションなどの変異を含む。変異は、生殖細胞系列または体細胞変異であり得る。一部の実施形態では、比較を行うための参照配列は、試験試料を提供する対象の種の野生型ゲノム配列、一般にはヒトゲノムである。

【0134】

変異コール器：本明細書で使用される場合、「変異コール器」とは、試験試料データ（例えば、対象から得た配列情報）における変異を識別するために使用されるアルゴリズム（一般には、ソフトウェアに組み入れられるか、または他のやり方でコンピューターにより実行される）を意味する。

【0135】

変異カウント（mutation count）：本明細書で使用される場合、「変異カウント（mutation count）」または「変異カウント（mutational count）」とは、核酸試料の全ゲノムまたはエキソームまたは標的化領域における体細胞変異の数を指す。

【0136】

新抗原オーファン免疫受容体情報：本明細書で使用される場合、「新抗原オーファン免疫受容体情報」とは、以前は所与の対象の免疫系によって認識されていなかった抗原に関連する情報を指す。一般には、新抗原オーファン免疫受容体情報は、1つまたは複数の腫瘍関連変異の結果として形成される変更されたポリペプチド、またはコードするポリヌクレオチドから得られる。ある特定の実施形態では、新抗原オーファン免疫受容体情報は、これらの変更されたポリペプチドまたはコードするポリヌクレオチドに関連する配列情報から導き出される。

【0137】

新生物：本明細書で使用される場合、「新生物」および「腫瘍」という用語は、互換的に使用される。これらの用語は、対象における細胞の異常な成長を指す。新生物または腫瘍は、良性、潜在的に悪性、または悪性であり得る。悪性腫瘍は、がんまたはがん性腫瘍と称される。

【0138】

次世代シーケンシング：本明細書で使用される場合、「次世代シーケンシング」または「NGS」とは、従来のサンガー法に基づく手法およびキャピラリー電気泳動に基づく手法と比較して増大したスループットを有し、例えば、何十万もの比較的小さな配列読み取りを一度に生成する能力を有するシーケンシング技術を指す。次世代シーケンシング技法の一部の例としては、これだけに限定されないが、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、およびハイブリダイゼーションによるシーケンシングが挙げられる。

【0139】

非同義変異：本明細書で使用される場合、「非同義変異」とは、コードされるポリペプ

10

20

30

40

50

チドのアミノ酸配列を変更させる変異を意味する。

【0140】

核酸タグ：本明細書で使用される場合、「核酸タグ」とは、核酸を、型が異なる、または異なる処理に供された異なる試料と区別するために（例えば、試料インデックスを表す）、または同じ試料中の異なる核酸分子と区別するために（例えば、分子バーコードを表す）使用される短い核酸（例えば、約500ヌクレオチド未満、約100ヌクレオチド未満、約50ヌクレオチド未満、または約10ヌクレオチド未満の長さ）を指す。核酸タグは、所定の、固定された、ランダムでない、ランダムなまたはセミランダムなオリゴヌクレオチド配列を含む。そのような核酸タグを使用して、異なる核酸分子または異なる核酸試料もしくは副試料を標識することができる。核酸タグは、一本鎖、二本鎖、または少なくとも部分的に二本鎖であり得る。核酸タグは、必要に応じて同じ長さまたは変動する長さを有する。核酸タグは、1つもしくは複数の平滑末端を有する二本鎖分子、5'もしくは3'一本鎖領域（例えば、突出）を含む二本鎖分子を含んでいてもよいし、および／または所与の分子内の他の位置における1つもしくは複数の他の一本鎖領域を含んでいてもよい。核酸タグは、他の核酸（例えば、増幅および／またはシーケンシングされる試料核酸）の一方の末端に付着させることもでき、両方の末端に付着させることもできる。核酸タグを復号して、所与の核酸の起源試料、形態、または処理などの情報を明らかにすることができる。例えば、核酸タグを使用して、異なる分子バーコードおよび／または試料インデックスを有する核酸を含む多数の試料のプールおよび／または並行処理を可能にすることもでき、この場合、その後、核酸タグを検出すること（例えば、読み取り）によって核酸をデコンボリューションする。核酸タグは、識別子（例えば分子識別子、試料識別子）と称することもできる。それに加えて、またはその代わりに、核酸タグを分子識別子として使用することができる（例えば、同じ試料または副試料中の異なる分子または親分子が異なるアンプリコンを区別するために）。これは、例えば、所与の試料中の異なる核酸分子に一意的にタグ付けすること、またはそのような分子に非一意的にタグ付けすることを含む。非一意的にタグ付けする適用の場合では、限られた数のタグ（すなわち、分子バーコード）を使用して各核酸分子にタグ付けすることができ、したがって、異なる分子をそれらの内因性配列情報（例えば、選択された参照ゲノムにそれらがマッピングされる開始および／もしくは停止位置、配列の一方もしくは両方の末端の部分配列、ならびに／または配列の長さ）と少なくとも1つの分子バーコードの組合せに基づいて区別することができる。一般には、任意の2つの分子が同じ内因性配列情報（例えば、開始および／もしくは停止位置、配列の一方もしくは両方の末端部分配列、ならびに／または長さ）を有し、同じ分子バーコードも有し得る確率が低くなるように（例えば、約10%未満、約5%未満、約1%未満、または約0.1%未満の見込み）、十分な数の異なる分子バーコードを使用する。

【0141】

観測変異カウント（mutation count）：本明細書で使用される場合、「観測変異カウント（mutation count）」または「観測変異カウント（mutational count）」とは、本明細書に記載のバイオインフォマティクス解析によって決定された体細胞変異の数を指す。

【0142】

パッセンジャー変異：本明細書で使用される場合、「パッセンジャー変異」とは、適応度の変更はもたらさないが、同時にまたは後にドライバー変異を獲得する細胞に生じる変異を意味する。

【0143】

ポリヌクレオチド：本明細書で使用される場合、「ポリヌクレオチド」、「核酸」、「核酸分子」、または「オリゴヌクレオチド」とは、ヌクレオシド間連結によって接合したヌクレオシドの直鎖状ポリマー（デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシド、またはその類似体を含む）を指す。一般には、ポリヌクレオチドは、少なくとも3つのヌクレオシドを含む。オリゴヌクレオチドのサイズ範囲は、多くの場合、少数の単量体単位、例え

ば、3～4から、数百単量体単位までである。ポリヌクレオチドが「A T G C C T G」などの文字の配列で表されるときはいつでも、特に断りのない限り、ヌクレオチドは左から右に5'→3'の順序であること、およびDNAの場合では、「A」はデオキシアデノシンを示し、「C」はデオキシシチジンを示し、「G」はデオキシグアノシンを示し、「T」はデオキシチミジンを示すことが理解されよう。文字A、C、G、およびTは、当技術分野における標準と同様に、塩基自体、ヌクレオシド、または塩基を含むヌクレオチドを示すために使用され得る。

【0144】

処理すること：本明細書で使用される場合、「処理すること」、「算出すること」、および「比較すること」という用語は、互換的に使用され得る。ある特定の適用では、この用語は、差異、例えば、数または配列の差異を決定することを指す。例えば、遺伝子発現、コピー数バリエーション(CNV)、インデル、および／または一塩基バリエント(SNV)値または配列を処理することができる。

【0145】

相対的MAF：本明細書で使用される場合、「相対的MAF」とは、試料中の最大(max)MAFと比較した特定のバリエーションのMAFの推定値を指す。

【0146】

参照配列：本明細書で使用される場合、「参照配列」とは、実験により決定された配列との比較のために使用される既知配列を指す。例えば、既知配列は、ゲノム全体、染色体、またはその任意のセグメントであり得る。参照は、一般には、少なくとも約20、少なくとも約50、少なくとも約100、少なくとも約200、少なくとも約250、少なくとも約300、少なくとも約350、少なくとも約400、少なくとも約450、少なくとも約500、少なくとも約1000、またはそれよりも多くのヌクレオチドを含む。参照配列は、ゲノムもしくは染色体の単一の連続した配列とアラインメントすることができるものである、またはゲノムもしくは染色体の種々の領域とアラインメントされる連続していないセグメントを含み得る。例示的な参照配列としては、例えば、hg19およびhg38などのヒトゲノムが挙げられる。

【0147】

試料：本明細書で使用される場合、「試料」とは、本明細書に開示される方法および／またはシステムによって分析することができる何かを意味する。

【0148】

検出限界(LOD)：本明細書で使用される場合、「検出限界」とは、所与のアッセイまたは解析手法によって測定することができる試料中の物質(例えば、核酸)の最小量を意味する。

【0149】

感度：本明細書で使用される場合、「感度」とは、所与のMAFおよびカバレッジにおける変異の存在が検出される確率を意味する。

【0150】

シーケンシング：本明細書で使用される場合、「シーケンシング」とは、生体分子、例えば、DNAまたはRNAなどの核酸の配列(例えば、単量体単位の同一性および順序)を決定するために使用される複数の技術のいずれかを指す。例示的なシーケンシング方法としては、これだけに限定されないが、標的化シーケンシング、単一分子リアルタイムシーケンシング、エクソンまたはエキソームシーケンシング、イントロンシーケンシング、電子顕微鏡に基づくシーケンシング、パネルシーケンシング、トランジスタ媒介性シーケンシング、ダイレクトシーケンシング、ランダムショットガンシーケンシング、サンガーデオキシ終結シーケンシング、全ゲノムシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、パイロシーケンシング、キャピラリー電気泳動、二重鎖シーケンシング、サイクルシーケンシング、一塩基伸長シーケンシング、固相シーケンシング、ハイスループットシーケンシング、大規模並列処理シグネチャーシーケンシング、エマルジョンPCR、低変性温度での共増幅PCR(COLD-PCR)、多重PCR、可逆的ダイ

10

20

30

40

50

ターミネーターによるシーケンシング、ペアエンドシーケンシング、短期シーケンシング、エキソヌクレアーゼシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ショートリードシーケンシング、単一分子シーケンシング、合成によるシーケンシング、リアルタイムシーケンシング、リバースターミネーターシーケンシング、ナノポアシーケンシング、454シーケンシング、Solexa Genome Analyzerシーケンシング、SOLiD（商標）シーケンシング、MS-PETシーケンシング、およびこれらの組合せが挙げられる。一部の実施形態では、シーケンシングは、例えば、他の多くのものの中でも、Illumina, Inc.、Pacific Biosciences, Inc.、またはApplied Biosystems/Thermo Fisher Scientificから市販されている遺伝子解析機器などの遺伝子解析機器によって実施することができる。

10

【0151】

配列情報：本明細書で使用される場合、「配列情報」とは、核酸ポリマーに関しては、そのポリマー内の単量体単位（例えば、ヌクレオチドなど）の順序および同一性を意味する。

【0152】

一塩基バリエーション：本明細書で使用される場合、「一塩基バリエーション」または「SNV」とは、ゲノム内の特定の位置に生じる一塩基の変異またはバリエーションを意味する。

【0153】

体細胞変異：本明細書で使用される場合、「体細胞変異」とは、受胎後に生じるゲノム内の変異を意味する。体細胞変異は、生殖細胞以外の体の任意の細胞において生じ得、したがって、後代には受け渡されない。

20

【0154】

実質的なマッチ：本明細書で使用される場合、「実質的なマッチ」とは、少なくとも第1の値または要素が少なくとも第2の値または要素と少なくともほぼ等しいことを意味する。ある特定の実施形態では、例えば、調整された結果（例えば、調整されたTMBスコア）と比較用結果（例えば、1つまたは複数の対照または参照試料から決定されたTMBスコア）が少なくとも実質的にまたはほぼマッチした場合に、カスタマイズされた療法が識別される。

【0155】

対象：本明細書で使用される場合、「対象」とは、哺乳動物種（例えば、ヒト）もしくはトリ（例えば、鳥類）種などの動物、または植物などの他の生物体を指す。より詳細には、対象は、脊椎動物、例えば、マウス、霊長類、サルまたはヒトなどの哺乳動物であり得る。動物は、農場動物（例えば、肉用牛、乳牛、家禽、ウマ、ブタなど）、競技動物、および伴侶動物（例えば、愛玩動物または支援動物）を含む。対象は、健康な個体、疾患もしくは疾患に対する素因を有するもしくはそれを有する疑いがある個体、または療法を必要とするもしくは療法を必要とする疑いがある個体であり得る。「個体」または「患者」という用語は、「対象」と交換できることが意図されている。

30

【0156】

例えば、対象は、がんを有するという診断を受けた個体、がん療法を受ける予定の個体、および／または少なくとも1つのがん療法を受けた個体であり得る。対象は、がんが寛解した状態であり得る。別の例として、対象は、自己免疫疾患を有するという診断を受けた個体であり得る。別の例として、対象は、疾患、例えば、がん、自己免疫疾患を有するという診断を受けた可能性があるかまたは有する疑いがあり得る妊娠中または妊娠する計画がある女性個体であり得る。

40

【0157】

同義変異：本明細書で使用される場合、「同義変異」とは、コードされるポリペプチドのアミノ酸配列が変更されない変異を意味する。

【0158】

閾値：本明細書で使用される場合、「閾値」とは、異なる試料に関して実験により決定

50

された同じパラメータの値を閾値との関係に応じて特徴付けるために使用される所定の値を指す。

【0159】

閾値最大(max)MAF：本明細書で使用される場合、「閾値最大(max)MAF」とは、異なる試料に関して実験により決定された最大(max)MAFの値を特徴付けるために使用される最大(max)MAFの所定の値を指す。一部の実施形態では、例えば、閾値最大(max)MAFは、約0.5%、1%、2%、5%、10%または別の選択された閾値であり得る。

【0160】

閾値TMBスコア：本明細書で使用される場合、「閾値TMBスコア」とは、異なる試料に関して実験により決定されたTMBスコアの値を特徴付けるために使用されるTMBスコアの所定の値を指す。ある特定の実施形態では、例えば、閾値TMBスコアは、約5、10、15、20、25、30、35、40または別の選択された閾値であり得る。

【0161】

閾値腫瘍割合：本明細書で使用される場合、「閾値腫瘍割合」とは、異なる試料に関して実験により決定された腫瘍割合の値を特徴付けるために使用される腫瘍割合の所定の値を指す。ある特定の実施形態では、例えば、閾値腫瘍割合は、約1%、2%、3%、4%、5%または別の選択された閾値であり得る。

【0162】

閾値 f ：本明細書で使用される場合、「閾値 f 」とは、異なる試料に関して実験により決定された予測変異割合(mutation fraction)の値を特徴付けるために使用される予測変異割合(mutation fraction)(f)の所定の値を指す。一部の実施形態では、例えば、閾値 f は、約0.05よりも大きい、約0.1よりも大きい、約0.2よりも大きい、約0.3よりも大きい、約0.4よりも大きい、約0.5よりも大きい、約0.6よりも大きい、約0.7よりも大きい、約0.8よりも大きい、約0.9よりも大きい、または別の選択された閾値であり得る。

【0163】

腫瘍割合：本明細書で使用される場合、「腫瘍割合」とは、所与の試料中の腫瘍に由来する核酸分子の割合の推定値を指す。例えば、試料の腫瘍割合は、試料の最大(max)MAFまたは試料のシーケンシングカバレッジのパターンまたは試料中のcfDNA断片の長さまたは任意の他の選択された試料の特色から導き出される尺度であり得る。一部の例では、試料の腫瘍割合は、試料の最大(max)MAFと等しい。

【0164】

腫瘍遺伝子変異量：本明細書で使用される場合、「腫瘍遺伝子変異量(tumor mutation burden)(TMB)」、「腫瘍遺伝子変異量(tumor mutational burden)(TMB)」または「がん遺伝子変異量(cancer mutation burden)」または「変異負荷量(mutational load)」または「変異負荷量(mutation load)」という用語は、互換的に使用される。これらの用語は、腫瘍ゲノムのシーケンシングされた部分に存在する変異、例えば体細胞変異の総数を指す。TMBは、調査される腫瘍ゲノムまたはエキソームまたはゲノムの標的化領域の1メガベース当たりのコーディング、塩基置換、インデル、または他の変異の数を指し得る。これらは、がん治療剤もしくは薬物、例えば、免疫チェックポイント阻害剤、抗体などに対する感度および／または耐性を、検出する、評価する、算出する、または予想することを示し得る。高レベルのTMBを有する腫瘍は、がん特異的抗原の一種である新抗原をより多く発現する可能性があり、より頑強な免疫応答を可能にし得、したがって、免疫療法に対するより長続きする応答を可能にし得る。免疫系は、適正に応答するために、十分な数の新抗原に依拠するので、体細胞変異の数は、腫瘍における新抗原の数を決定するための代理として作用し得る。TMBを使用して、対象における薬物処置に対する免疫応答の頑強性および薬物処置の有効性を推定することができる。生殖細胞系列バリエーションと体細胞バリエーションをバイオインフォマティクスにより区別して、抗

10

20

30

40

50

原性体細胞バリエントを識別することができる。

【0165】

バリエント：本明細書で使用される場合、「バリエント」は、対立遺伝子と称することができる。バリエントは、通常、対立遺伝子がヘテロ接合性であるかホモ接合性であるかに応じて50%（0.5）または100%（1）の頻度で存在する。例えば、生殖細胞系列バリエントは遺伝性であり、通常は0.5または1の頻度を有する。しかし、体細胞バリエントは後天性バリエントであり、通常は<0.5の頻度を有する。遺伝子座の主要な対立遺伝子および主要でない対立遺伝子とは、それぞれ、参照配列のヌクレオチドによって占有された遺伝子座、および参照配列とは異なるバリエントヌクレオチドによって占有された遺伝子座を有する核酸を指す。遺伝子座における測定値は、試料中で対立遺伝子が観測される頻度を測定する対立遺伝子割合（AF）の形態をとり得る。

10

詳細な説明

【0166】

緒言

【0167】

がんは、異常な細胞成長、および体内の細胞の起源部位を越えて転移する潜在性という共通の特徴を有する遺伝子疾患の大きな群を包含する。これらの疾患の基礎をなす分子基盤は、細胞表現型の変容を導く変異および／またはエピジェネティック変化であり、これらの有害な変化が遺伝によって獲得されたものであるか体細胞を基礎とするものであるかは関係ない。厄介なことに、これらの分子変化は、一般には、同じ型のがんを有する患者の中だけでなく、所与の患者自身の腫瘍の中でさえも変動する。

20

【0168】

大多数のがんにおいて観測される変異性の変動性を考慮すると、がんケアに関する難題の1つは、患者の個別化されたがんの型を考慮して患者が応答する可能性が最も高い療法を識別することである。がん患者にがん免疫療法を含めた適正な処置をマッチさせるために種々のバイオマーカーが使用される。応答に関するバイオマーカーの1つは腫瘍遺伝子変異量（TMB）であり、これは、所与のがんゲノムのコード領域1つ当たりの変異の総数の定量的尺度である。現在まで、この応答バイオマーカーの適用は、一部において、TMBを測定し、解析する手段によって限定されている。

【0169】

本開示は、患者試料中のTMBを決定し、解析することにおいて有用であり、がん処置決定のガイドに役立つ方法、コンピューター可読媒体、およびシステムを提供する。伝統的に、腫瘍割合（例えば、変異対立遺伝子割合（MAF））および／またはカバレッジが小さい場合には、変異をコールするためのアッセイの感度が低下するので、変異率をカウントすることによって得られるTMBは不正確である頻度が高い。したがって、ある特定の態様では、観測TMBを、アッセイの感度の種々の尺度、例えば、腫瘍割合（所与の試料中の変異のMAFを設定する）、カバレッジ、および／または同様のものなどを考慮して調整する。そのような調整を行わなかった場合、例えば、実際にはTMB-Highであるが腫瘍割合が小さく、かつ／またはカバレッジが小さい試料は、TMB-Lowと誤って報告される頻度が高くなる。そのような転帰は、そのような結果に基づいて処置の決定を行う場合、患者に対して下流で重要な意義を有し得る。

30

40

【0170】

腫瘍遺伝子変異量調整方法

【0171】

本出願は、所与のアッセイにおける腫瘍割合および／またはカバレッジの変動性を説明するためにTMBを調整する様々な方法を開示し、変動性は、そうでなければ不正確なTMB報告を導き得る。ある特定の実施形態では、方法は、未加工の体細胞変異カウント（mutation count）（例えば、所与のバイオインフォマティクスパイプラインまたはワークフローによってコールされたSNVおよびインデル）を、特定のバイオインフォマティクスパイプラインによってコールされる考慮中のパネルにおける試料の実際

50

の変異の割合のモデルによる予想によって調整することを含む。ある特定の実施形態では、モデルは、バイオインフォマティクス変異（例えば、SNV、インデル、および／または同様のもの）コール器および二項サンプリングソリューションの論理を使用して、試料カバレッジの設定における、および／またはその試料中のMAFの予測分布にわたる変異コール器の感度を算出する。一部の実施形態では、試料中のMAFの予測分布は、対照試料データセットの対照試料においてコールされた全ての変異の相対的MAFによって導き出される。これらの実施形態の一部では、モデルにより、観測された変異の予測割合、および当該割合の確率分布が算出され、これを、例えば、当該割合に関する95%信頼区間として要約することができる。これを使用して、予測変異カウント（mutation count）の高感度（例えば、可能性が最も高い実際の変異カウント（mutation count））および／または高特異度（例えば、可能性が最も低い実際の変異カウント（mutation count））の算出を出力することができる。これらの実施形態のある特定のものでは、次いで、予測変異カウント（mutation count）を、解析されるゲノム領域のサイズで割って、変異率（すなわち、TMBまたはTMBスコア）を得る。例えば腫瘍由来の組織試料の全エキソームシーケンシングから算出されるTMBまたは試料の腫瘍割合が高い場合に算出されるTMBの「ゴールドスタンダード」と比較して、本明細書に記載の調整を実行することによって算出されるTMBはこれらの調整を行わずに測定されるTMBよりも正確なものになる。

【0172】

さらなる例示のために、図1は、本発明の一部の実施形態に従ってTMBを調整する例示的な方法のステップを概略的に示すフローチャートを提供する。示されている通り、方法100は、ステップ110において、対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定することを含む。方法100は、ステップ112において、核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成すること、ならびにステップ114において、シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成することを含む。さらに、方法100は、ステップ116において、予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象におけるTMBを決定することを含む。

【0173】

ある特定の実施形態では、方法100は、追加的な上流および／または下流のステップを含む。一部の実施形態では、例えば、方法100は、ステップ102で開始され、ステップ104において対象由来の試料を提供する（例えば、対象から取得した血液試料を提供する）。これらの実施形態では、方法100のワークフローは、一般には、ステップ106において、試料中の核酸を増幅させて、増幅した核酸を生成すること、およびステップ108において、増幅した核酸のシーケンシングを行って、配列情報を生成した後、ステップ110において、配列情報から観測変異カウントを決定することを含む。核酸増幅（関連する試料調製を含む）、核酸シーケンシング、および関連するデータ解析は本明細書にさらに記載されている。

【0174】

一部の実施形態では、方法100は、ステップ116において生成された調整された結果から下流の種々のステップを含む。これらの一部の例は、ステップ118において、調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較して、対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別することを含む。一部の実施形態では、方法100は、結果を対象または医師に報告することを含む。他の例示的な実施形態では、方法100は、ステップ120において、調整された結果と比較用結果が実質的にマッチする場合に、識別されたカスタマイズされた療法の少なくとも1つを対象に施行し（例えば、対象のがんまたは別の疾患もしくは状態を処置するために）、その後、ステップ122において終了することを含む。

【0175】

さらなる例示のために、任意の所与の試料に関して、腫瘍割合（例えば、体細胞変異の最大MAF（「主要でないAF」）または腫瘍割合の別の推定値）および／またはカバレッジのいくつかの指標（例えば、塩基1つ当たりの独特の分子の中央値）をモデルに入力する。モデルは、これらの条件でコールされることが予測されるパネル空間内の変異の割合、および認められることが予測される変異の割合の分布（例えば、認められることが予測される変異の割合の範囲の95%信頼区間を用いて要約することができる）を出力するために利用される変異（例えば、SNV、インデル、および／または同様のもの）コールアルゴリズムに基づく算出を使用する。一部の実施形態では、バイオインフォマティクス解析によってコールされる所与のパネルにおける実際の変異の予測割合は、予測MAFの範囲にわたる所与のMAFにおける変異がコールされる確率（すなわち、感度）を評価することによって算出される（すなわち、相対的MAFの分布を、試料腫瘍割合を掛けることによってMAFに変換する）。

【0176】

一般には、変異コール器の感度を所与のMAFにおける変異がコールされる確率およびカバレッジから本明細書に記載のバイオインフォマティクス解析のアルゴリズムを使用して推定する。一部の実施形態では、以前のデータに基づく経験的な分布を使用して確率を算出することができる（すなわち、「経験的な」変異コール感度をもたらす、試料が種々のカバレッジで種々のMAFにおける既知の変異を有し、変異がどのくらいの頻度で検出されるかを試験する実験を実行する）。一部の実施形態では、二項分布を使用して確率を算出することができる。一部の実施形態では、変異コールのための多数の要件に基づく多成分分布を使用して確率を算出することができる（例えば、変異に関する以前の予測のいくつかの他の考慮事項と共に、変異を支持する分子の数；変異コール感度を、変異ががんホットスポット領域に存在するか否かと共に使用する－これらの成分の全てに基づく組合せを使用することができる）。一部の実施形態では、変異コール器の感度を、バリエーションの型（例えば、SNV、短いインデルまたは長いインデル）、ゲノムの状況（例えば、ホットスポット領域、骨格領域、局所的なGC含量など）、または試料の状況（例えば、GC、MAPD、カバレッジプロファイルなどのシーケンシングメトリクス；または腫瘍型の試料メトリクス）などの特定の基本要件に基づいて推定することができる。

【0177】

一部の実施形態では、方法は、特定の試料中のMAFの予測分布を定義することを含む。これらの実施形態のある特定のものでは、相対的MAFの分布を、対照試料データセットにおける対照試料全てにわたって曲線に経験的に当てはめる。経験的に当てはめる曲線は、以下の方程式：

$$F = 1 / (1 + (P_{50} / \text{相対的} - \text{MAF})^n)$$

（式中、Fは、累積分布関数であり、 P_{50} は、相対的MAFの中央値であり、相対的－MAFは相対的MAFであり、nは、相対的な分布の形状を当てはめるための指数である）によって記載される。ある特定の実施形態では、予測変異割合の予測分布を、少なくとも1つの対照試料データセットにおいて観測される相対的な変異対立遺伝子割合（MAF）の1つまたは複数のデータセットから得る。対照試料データセットは、一般には、少なくとも約25から少なくとも約30,000またはそれよりも多くまでの対照試料を含む。一部の実施形態では、対照試料データセットは、約50、75、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,500、5,000、7,500、10,000、15,000、20,000、25,000、50,000、100,000、1,000,000、またはそれよりも多くの対照試料を含む。一部の実施形態では、対照試料において観測される最大(max)MAFは、約0.5%、約1%、約2%、約5%、約10%またはそれよりも多くを構成する。一部の実施形態では、最大MAFの閾値（すなわち、閾値最大(max)MAF）を使用する。これらの実施形態では、閾値腫瘍割合は、一般には、約1%、2%、3%、4%、5%または別の選択された閾値である。

【0178】

一部の実施形態では、予測結果を、以下の方程式：

観測された変異の割合（ f ）＝ $\sum_{MAF} (P(\text{変異のコール} \mid MAF) \times P(MAF \text{ における変異}))$

（式中、 P は確率であり、 MAF は変異対立遺伝子割合であり、 $P(\text{変異のコール} \mid MAF)$ は特定の MAF における変異がコールされる確率であり、これは、試料の特定の MAF およびカバレッジにおける変異コール器の感度を表し、 $P(MAF \text{ における変異})$ は、 MAF における変異の確率であり、これは、試料の MAF の予測分布を表す）を使用して決定する。

【0179】

この割合は基本的に二項サンプリング確率であるので、この割合における分布の上限および下限（および信頼区間）は、二項比率の信頼区間を使用して概算される：

【数4】

$$f_{\text{上限}} = f + z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})} \text{ および}$$

$$f_{\text{下限}} = f - z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})},$$

（式中、 f は、コールされる変異の予測割合であり、 $n_{\text{真}}$ は、予測される実際の変異カウントであり、これは f を考慮して観測される変異の数と等しく、 z は信頼水準である（例えば、95%信頼区間に対して1.96）。予測される実際の変異カウントの算出は、方程式： $n_{\text{真}} = n_{\text{観測}} / f$ によって得られる。したがって、例えば、6つの変異が観測され（すなわち、 $n_{\text{観測}} = 6$ ）、変異の60%が観測された（すなわち、 $f = 60\%$ ）場合、予測される実際の変異カウントは、10（すなわち、 $n_{\text{真}} = 10$ ）である。ある特定の実施形態では、 f が閾値 $f_{\text{未満}}$ 未満の場合、 TMB は決定されず、他の実施形態では、 f が閾値 $f_{\text{未満}}$ を超える場合、 TMB が決定される。一部の実施形態では、例えば、閾値 $f_{\text{未満}}$ は、約0.05よりも大きい、約0.1よりも大きい、約0.2よりも大きい、約0.3よりも大きい、約0.4よりも大きい、約0.5よりも大きい、約0.6よりも大きい、約0.7よりも大きい、約0.8よりも大きい、約0.9よりも大きい、または別の選択された閾値であり得る。ある特定の実施形態では、予測変異割合（ f ）および／または予測変異割合の予測分布は、変異割合に関して約95%またはそれよりも大きな信頼区間を含む。一部の実施形態では、方法は、予測変異割合の95%信頼区間の上限（ $f_{\text{上限}}$ ）を使用して調整された変異カウントの下限を生成することを含む。

【0180】

これらの実施形態の一部では、次いで、試料の腫瘍割合が大きく、かつ／またはカバレッジが大きい場合、未加工の体細胞変異カウント（`mutation count`）（観測変異カウント（`mutation count`））をモデルによるこの出力で割って、パネルにおいてコールされたと予測変異の数を得る。割合の推定値を実際の／予測変異カウント（`mutation count`）の最良の推定値として使用することができる。必要に応じて、割合に関する95%信頼区間の上限（ $f_{\text{上限}}$ ）を使用して、実際の変異カウント（`mutation count`）の下限を得ることができ（すなわち、実際の変異カウント（`mutation count`）がその変異カウント（`mutation count`）と少なくとも等しい見込みが95%である）、これは、特異度が高い出力である（ $TMB-High$ の報告に関して特異度が高い）。これらの実施形態のある特定のものでは、次いで、予測／調整された変異カウント（`mutational count`）を解析されるゲノム領域のサイズで割って、試料の TMB スコアを得る。一部の実施形態では、試料の TMB スコアが閾値 $TMB_{\text{スコア}}$ よりも大きい場合、試料を $TMB-High$ 試料に分類する。試料の TMB スコアが閾値 $TMB_{\text{スコア}}$ よりも小さい場合、試料を $TMB-Low$ 試料に分類する。ある特定の実施形態では、例えば、閾値 $TMB_{\text{スコア}}$ は、約5、10、15、20、25、30、35、40または別の選択された閾値であり得る。

【0181】

一般には、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の体細胞変異を含む。これらの実施形態の一部では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合から1つまたは複数の既知のがんドライバーおよび／またはパッセンジャー変異が除外される。ある特定の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、核酸において識別される複数の同義変異、複数の非同義変異、および／または複数の非コード変異を含む。必要に応じて、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合は、一塩基バリエーション（SNV）、挿入もしくは欠失（インデル）、コピー数バリエーション（CNV）、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、エピジェネティックバリエーション、および／または同様のものを含む複数の変異を含む。ある特定の実施形態では、観測変異カウントおよび／または腫瘍割合からクローン性造血由来変異が除外される。必要に応じて、予測変異割合を実際の変異カウントの観測割合として使用する。

10

【0182】

ある特定の実施形態では、腫瘍割合を組み入れるために、例えば、全ての体細胞変異（例えば、SNVおよびインデルデータから導き出される）の最大変異対立遺伝子割合（最大（max）MAF）を使用すること以外の代替法を利用する。いくつかの例示的な代替としては、カバレッジに基づいた腫瘍割合を使用すること、cfDNA断片の長さに基づいた腫瘍割合を使用すること、生殖細胞系列および／もしくは体細胞バリエーションに基づいた腫瘍割合を使用すること、またはこれらの手法のいずれかの組合せが挙げられる。一部の実施形態では、ゲノム領域の所定のセットのシーケンシングカバレッジのパターンおよび標準の最尤法を使用して腫瘍割合を推定することができる。一部の実施形態では、試料中のゲノム領域の所定のセットとコピー数の変化を有する領域のcfDNA断片サイズ分布の差異から腫瘍割合を推定することができる。一部の実施形態では、生殖細胞系列および／または体細胞バリエーションのMAFを試料において観測されるコピー数の変化に対して調整することによって腫瘍割合を推定することができる。一部の実施形態では、標的ゲノム領域のcfDNA分子のセットを捕捉するために使用されるプローブのシーケンシングカバレッジを使用して、腫瘍割合（すなわち、体細胞割合）を推定することができる。一部の実施形態では、試料中のcfDNA分子のメチル化の状態に基づいて腫瘍割合を推定することができる。一部の実施形態では、最大（max）MAFを使用して腫瘍割合を推定することができるが、その特定のゲノム内の位置におけるコピー数に関して調整を行うことができる。一部の実施形態では、試料中の体細胞MAFを腫瘍割合の推定値と組み合わせることができる。一部の実施形態では、メチル化を、メチル化パターンを使用して腫瘍に由来する分子を識別することに基づいて腫瘍割合を推定するために使用することができる。したがって、腫瘍分子の割合を識別して、腫瘍割合を推定するために使用することができる。一部の例では、上記の実施形態の全ての組合せまたは上記の実施形態の少なくともサブセットの組合せをモデルにおいて使用して、腫瘍割合を推定することができる。

20

30

【0183】

一部の実施形態では、所与の試料の腫瘍割合は、全核酸の約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.5%未満、1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満であり得る。

40

【0184】

一部の実施形態では、生殖細胞系列バリエーションをTMBスコアの決定から除外する。一部の実施形態では、バリエーションの生殖細胞系列／体細胞の状態は、ベータ二項分布モデルを使用して決定することができる。ベータ二項分布を使用して、候補バリエーションの近くに位置する共通生殖細胞系列一塩基多型（SNP）の変異対立遺伝子カウントの平均値および分散をモデル化する。候補バリエーションがこれらの局所的生殖細胞系列SNPの分布から逸脱する場合には、バリエーションは「体細胞バリエーション」とコールされ、そうでなければ、バリエーションは、「生殖細胞系列バリエーション」とコールされる。PCT/US2018/052087ならびに米国特許仮出願第62/726,182号、同第62/823,578号および同第62/857,048号に記載されている方法およびシステムが参照によ

50

り組み込まれる。

【0185】

カバレッジをまた必要に応じて種々のやり方でモデルに組み入れる。一部の実施形態では、カバレッジを塩基1つ当たりの独特のcfDNA断片の中央値として組み入れることができる。一部の実施形態では、モデルを塩基特異的にすることができ、方法は、各塩基における感度を、その塩基における独特のcfDNA断片の数を使用して算出することを含む。ある特定の実施形態では、方法は、核酸における所与のヌクレオチド位を含む複数の独特のシーケンシング読み取りを識別して、カバレッジを決定することを含む。さらに他の例示的な実施形態では、方法は、核酸における所与のヌクレオチド位を構成する独特の細胞外遊離DNA (cfDNA) 分子の数の中央値を識別して、カバレッジを決定することを含む。カバレッジは、ある塩基位置におけるcfDNA断片が少なくとも10個、50個、100個、500個、1000個、5000個、10,000個、20,000個または50,000個というものである。

10

【0186】

本出願に開示される方法は、一般に、対象から取得した試料中の核酸から配列情報を得ることを含む。ある特定の実施形態では、配列情報を核酸の標的とされるセグメントから得る。基本的にあらゆる数のゲノム領域を必要に応じて標的とする。標的とされるセグメントは、少なくとも10、少なくとも50、少なくとも100、少なくとも500、少なくとも1000、少なくとも2000、少なくとも5000、少なくとも10,000、少なくとも20,000、少なくとも50,000または少なくとも100,000 (例えば、25、50、75、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、15,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000または100,000) の異なるおおよび／または重複するゲノム領域を含み得る。

20

【0187】

ある特定の実施形態では、方法は、観測変異カウントを予測結果で割って、調整された結果を生成することを含む。一般には、調整された結果は、変異対立遺伝子割合の範囲にわたって核酸において検出される複数の変異を含む。調整された結果は、一般に、可能性が最も高い実際の変異カウントの予想おおよび／または可能性が最も低い実際の変異カウントの予想を含む。ある特定の実施形態では、予測結果は、予測変異割合 (mutation fraction) を含む。ある特定の実施形態では、調整された結果は、調整された変異カウントを含む。一般には、調整された変異カウントは、観測変異カウントよりも大きいまたはそれと等しい。

30

【0188】

他の例示的な実施形態では、体細胞変異 (例えば、SNV、インデルなど) のカウントからバックグラウンドエキソーム変異率またはTMBを表さないドライバー変異などが除外される。一部の実施形態では、考慮中の腫瘍ではなく、クローン性造血に由来する可能性が高い変異は体細胞変異のカウントから除外される。クローン性造血に由来する変異は、文献おおよびがんデータベース (例えば、COSMIC) に基づく、血液関連がんにおいて頻繁に観測される変異のキュレートされた一覧を使用して識別することができる。一部の実施形態では、クローン性造血変異を、試料中のそれらの状況 (例えば、MAF) (例えば、同様のMAFまたは同様のMAFの範囲における他のクローン性造血バリエーションの存在) を使用して、または以前に試験された試料のデータベース内のクローン性造血変異を解析することによって識別することができる。一部の実施形態では、クローン性造血変異を、血液に由来する患者試料 (例えば、白血球 (white blood cell)) 中のDNAのシーケンシングを行うことによって識別することができる。ある特定の実施形態では、体細胞変異のカウントは、利用される特定のパネルの一部として報告されていない部位におけるSNVおよびインデルも含む。例えば、そのような変異は、所与の適用において変異が「報告されていない」領域 (例えば、イントロン) 内にあり得る。これは

40

50

、例えば、体細胞変異をカウントするためのパネルがより大きく、したがって、試料採取エラーがより小さく、変異率のシグナルがより高いことを意味する。一部の実施形態では、クローン性造血由来変異を、これらのパラメーター患者の年齢、腫瘍型、その位置におけるメチル化の状態、その試料中のその変異および任意の他の変異を支持する分子の断片サイズの少なくともいくつかを入力として利用する確率／尤度モデルを使用することによって識別することができる。一部の実施形態では、これらの入力パラメータを使用して、各変異がクローン性造血由来変異であるかどうかのモデルまたは優先を構築することができる。一部の実施形態では、ロジスティック回帰、ランダムフォレストなどのような機械学習アルゴリズムを適用して、クローン性造血由来変異を識別することができる。PCT／US2019／035214に記載されている方法およびシステムも使用することができる、これらは参照により組み込まれる。

10

【0189】

他の例示的な実施形態では、方法は、任意の特定のSNV、インデル、および／または他の型の変異について検出限界（LOD）を下回るが、他の大多数の塩基よりもその塩基における変異の可能性が高いことが示された変異のプールされたエビデンスを使用することを含む。これらの実施形態では、TMB-High試料は、一般には、TMB-Low試料よりもこのエビデンスを多く有する。一部の実施形態は、所与のパネルにおける、TMBを相関する変異を有する部位の数を増大させること、および／または、腫瘍割合の推定をさらに改善することを含む。ある特定の実施形態では、フラグメントミクスに関して潜在的に高度に情報価値のある部位を含めることにより、腫瘍割合の推定または決定もさらに改善される。

20

【0190】

一部の実施形態では、低MAFの体細胞変異をフィルターで取り除くことにより、観測変異カウントからサブクローン性変異を除外する。一部の実施形態では、観測変異カウントから、最大（max）MAFの約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、約5%未満、約6%未満、約7%未満、約8%未満、約9%未満、約10%未満、約15%未満、約20%未満、約25%未満または約30%未満である体細胞変異を除外する。

【0191】

一部の実施形態では、予測／調整された変異カウントを、エキソーム較正因子を使用して調整し、エキソーム較正因子は、解析されるパネルの変異率のエキソーム変異率に対する比である。一部の実施形態では、予測／調整された変異カウントをエキソーム較正因子で割る。一部の実施形態では、エキソーム較正因子は、1.01、1.02、1.03、1.04、1.05、1.06、1.07、1.08、1.09または少なくとも1.10である。一部の実施形態では、エキソーム較正因子をがんデータベース、例えば、TCGA（The Cancer Genome Atlas）内の試料のエキソーム変異率から決定する。一部の実施形態では、エキソーム較正因子は、がんの型に特異的であり得、エキソーム変異率を特定のがんの型を有する試料（データベース内の）から決定することができる。

30

【0192】

一部の実施形態では、観測変異カウントから耐性変異を除外する。いくつかの実施形態では、耐性変異を、文献およびがんデータベース（例えば、COSMIC、TCGA）に基づく、患者試料において頻繁に観測される変異のキュレートされた一覧を使用して識別することができる。一部の実施形態では、以前に試験された試料のデータベースを解析することによって耐性変異を識別することができる。

40

【0193】

一部の実施形態では、耐性機構または任意の他のプロセスにより、遺伝子に多数の変異が導入される可能性があり（例えば、CRCにおけるKRASまたはPARP阻害剤で処置された前立腺がんにおけるBRCA1／2復帰変異）、観測変異カウントにおけるこれらの変異全てをカウントすることでは、全エキソーム変異率は反映されない可能性がある。そのような実施形態では、特定の遺伝子におけるわずかな変異は、その特定の遺伝子に

50

における変異の数がパネルにおける全体的な試料変異カウント (mutation count) および遺伝子サイズに基づいて予測されるその遺伝子における変異の数よりも有意に多い場合、観測変異カウント (mutation count) から除外される。「有意に多い」という用語は、統計学的サンプリングモデルに基づいて評価することができる。例えば、試料の変異率が1 Mb当たり10個の変異 (がん関連遺伝子のパネルを解析することによって観測される) であり、そのうち5個の変異がK R A S遺伝子 (パネル内) に存在する場合、K R A S内の変異率は、試料変異率に基づいて予測されるものよりもはるかに高くなる。観測変異カウント (mutation count) にカウントされるK R A S由来の変異の数は、試料変異率に基づいて予測率に近づくように抑えられる。

【0194】

一部の実施形態では、T M Bスコアを使用して、患者が免疫療法による処置に応答するかどうかを予想することができる。ある特定の実施形態では、解析された遺伝子のセットにわたるある特定の遺伝子における特定の型の変異 (例えば、S T K 1 1、K E A P 1、P T E Nなどの機能喪失) および／または患者の変異シグネチャー (例えば、患者がC > T転移を有する) が存在することをT M Bスコアと組み合わせて使用して、患者が免疫療法による処置に応答するかどうかを予想することができる。ある特定の実施形態では、患者が、これだけに限定されないが、S T K 1 1、K E A P 1およびP T E Nなどのある特定の遺伝子の機能喪失を有する場合には、患者は、T M Bスコアとは関係なく免疫療法に応答しない。例えば、患者が、(i) 高T M Bスコアおよび(ii) S T K 1 1機能喪失を有する場合には、機能喪失／ドライバー変異が優先し、患者は療法に応答しない。

【0195】

一部の実施形態では、本明細書に開示される調整方法は、対象 (例えば、ヒトまたは他の哺乳動物対象) から試料を得ることを含む。必要に応じて利用される例示的な試料型は本明細書にさらに記載されている。基本的にあらゆる型の核酸 (例えば、D N Aおよび／またはR N A) を本出願に開示される方法に従って評価することができる。一部の例としては、細胞外遊離核酸 (例えば、腫瘍起源のc f D N Aおよび／または同様のもの)、循環腫瘍細胞を含めた細胞内核酸 (例えば、試料中のインタクトな細胞を溶解させることによって得られる)、循環腫瘍核酸が挙げられる。

【0196】

一部の実施形態では、特定のカットオフ未満の腫瘍シェディングを示し、かつ／または特定のカットオフ未満のカバレッジを有する腫瘍割合またはいずれかのパラメータを有し、その結果、変異の予測割合が非常に低くなる試料にはT M B補正モデルを適用することができない。一部の実施形態では、正確なT M B推定に干渉するC H I P変異を優勢に含有する試料にはT M B補正モデルを適用することができない。T M B補正モデルを試料に適用することができるかどうかを確認するための基準は、試料がC H I P変異を優勢に含有するかどうかを算出するために使用される方法を含む。そのような方法は、例えば、(a) C H I Pであることが分かっている変異の大きな割合 (キュレートされたデータベース、またはC H I Pを識別する他の方法、例えば、バフィーシーケンシング、フラグメントミクスなどを使用して) ; (b) 固形腫瘍のエビデンス、例えば、試料の腫瘍型の既知のドライバー変異の非存在 ; (c) 上記の任意の組合せを含む。一部の実施形態では、低腫瘍シェディングまたはC H I P優勢を含有する試料にはT M B補正モデルを適用することができない。

【0197】

これらの実施形態では、方法は、一般には、核酸をシーケンシングのために調製するための種々の試料またはライブラリー調製ステップも含む。多くの異なる試料調製技法が当業者に周知である。それらの技法の基本的に任意のものが本明細書に記載の方法の実施に使用する、または使用するために適合させる。例えば、核酸をシーケンシングのために調製するための典型的なステップは、所与の試料中の他の構成成分から核酸を単離するための種々の精製ステップに加えて、核酸に分子バーコードをタグ付けすること、アダプター (例えば、分子バーコードを含み得る) を付加すること、核酸を1回または複数回増幅さ

せること、核酸の標的とされるセグメントを富化すること（例えば、種々の標的捕捉戦略などを使用して）、および／または同様のものを含む。例示的なライブラリー調製プロセスは本明細書にさらに記載されている。核酸試料／ライブラリー調製に関する追加的な詳細は、例えば、それぞれの全体が参照により組み込まれる *van Dijk et al., Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias, Experimental Cell Research, 322 (1): 12-20 (2014)*, *Micic (Ed.), Sample Preparation Techniques for Soil, Plant, and Animal Samples (Springer Protocols Handbooks), 1st Ed., Humana Press (2016)*、および *Chiu, Next-Generation Sequencing and Sequence Data Analysis, Bentham Science Publishers (2018)* にも記載されている。

【0198】

本明細書に開示される方法によって決定される調整されたTMBは、必要に応じて、対象における疾患もしくは状態、特にがんの存在を診断するため、そのような疾患もしくは状態を特徴付けるため（例えば、所与のがんのステージ分類を行うため、がんの不均一性を決定するためなど）、処置に対する応答をモニタリングするため、所与の疾患もしくは状態が発生する潜在的なリスクを評価するため、および／または、疾患もしくは状態の予後を評価するために使用される。調整された腫瘍遺伝子変異量（*tumor mutation burden*）はまた、必要に応じて、がんの特定の形態を特徴付けるためにも使用される。がんは、多くの場合、組成およびステージ分類のどちらも不均一であるので、TMBデータから、がんの特定の亜型を特徴付け、それにより、診断および処置の選択を補助することが可能になり得る。この情報はまた、対象または健康管理実践者に特定の型のがんの予後に関する手がかりを提供し、対象および／または健康管理実践者が疾患の進行にしたがって処置選択肢を適合させることを可能にするものであり得る。一部のがんは、進行するにつれて侵襲性が大きくなり、遺伝学的に不安定になる。他の腫瘍は良性、不活性または休止状態のままである。

【0199】

調整されたTMBはまた、疾患増悪の決定および／または再発のモニタリングに有用であり得る。ある特定の場合では、例えば、上首尾の処置により、最初に、がん細胞死の数が増加し、核酸が排出（シェディング）されるので、調整されたTMBが増加し得る。これらの場合、一般には、次いで、療法が進行するに従い、腫瘍のサイズが縮小し続けるので、調整されたTMBが減少する。他の場合では、上首尾の処置により、腫瘍遺伝子変異量の最初の増加を伴わずに同じくTMBおよび／または主要でない対立遺伝子割合が減少し得る。さらに、処置後にがんが寛解の状態であることが認められた場合、調整されたTMBを使用して、患者における残留する疾患または疾患の再発をモニタリングすることができる。

【0200】

試料

【0201】

試料は、対象から単離された任意の生体試料であってよい。試料は、体組織、全血、血小板、血清、血漿、便、赤血球、白血球（*white blood cell*）または白血球（*leucocyte*）、内皮細胞、組織生検材料（例えば、既知のまたは疑わしい固形腫瘍由来の生検材料）、脳脊髄液、滑液、リンパ液、腹水、間質液または細胞外液（例えば、細胞間隙からの滲出液）、歯肉滲出液、歯肉溝滲出液、骨髓、胸水、脳脊髄液、唾液、粘液、喀痰、精液、汗、尿を含み得る。試料は、体液、特に血液およびその割合、ならびに尿であることが好ましい。そのような試料は、腫瘍から排出された核酸を含む。核酸は、DNAおよびRNAを含み得、また、二本鎖形態および一本鎖形態であり得る。試

料は、対象から元々単離された形態であってもよく、細胞などの構成成分を除去もしくは付加するため、1つの構成成分を別の構成成分に対して富化するため、または1つの形態の核酸を別の形態の核酸に変換する、例えば、RNAをDNAに変換する、もしくは一本鎖核酸を二本鎖に変換するために、さらなる処理に供されたものであってもよい。したがって、例えば、分析用の体液は、細胞外遊離核酸、例えば、細胞外遊離DNA（cfDNA）を含有する血漿または血清である。

【0202】

一部の実施形態では、対象から取得した体液の試料体積は、シーケンシングされる領域に対する所望の読み取りの深さに依存する。例示的な体積は、約0.4~40ml、約5~20ml、約10~20mlである。例えば、体積は、約0.5ml、約1ml、約5ml、約10ml、約20ml、約30ml、約40ml、またはそれよりも大きなミリリットル数であり得る。試料採取された血漿の体積は、一般には、約5mlから約20mlの間である。

10

【0203】

試料は、種々の量の核酸を含み得る。一般には、所与の試料中の核酸の量は、多数のゲノム等価物と等しい。例えば、約30ngのDNAの試料は、約10,000（ 10^4 ）個の一倍体ヒトゲノム等価物、およびcfDNAの場合では、約2000億（ 2×10^{11} ）個の個々のポリヌクレオチド分子を含有し得る。同様に、約100ngのDNAの試料は、約30,000個の一倍体ヒトゲノム等価物、およびcfDNAの場合では、約6000億個の個々の分子を含有し得る。

20

【0204】

一部の実施形態では、試料は、異なる供給源に由来する核酸、例えば、細胞由来の核酸および細胞外遊離供給源（例えば、血液試料など）由来の核酸を含む。一般には、試料は、変異を有する核酸を含む。例えば、試料は、必要に応じて、生殖細胞系列変異および／または体細胞変異を有するDNAを含む。一般には、試料は、がん関連変異（例えば、がん関連体細胞変異）を有するDNAを含む。

【0205】

増幅前の試料中の細胞外遊離核酸の例示的な量は、一般には、約1フェムトグラム（fg）~約1マイクログラム（μg）、例えば、約1ピコグラム（pg）~約200ナノグラム（ng）、約1ng~約100ng、約10ng~約1000ngにわたる。一部の実施形態では、試料は、最大約600ng、最大約500ng、最大約400ng、最大約300ng、最大約200ng、最大約100ng、最大約50ng、または最大約20ngの細胞外遊離核酸分子を含む。必要に応じて、量は、少なくとも約1fg、少なくとも約10fg、少なくとも約100fg、少なくとも約1pg、少なくとも約10pg、少なくとも約100pg、少なくとも約1ng、少なくとも約10ng、少なくとも約100ng、少なくとも約150ng、または少なくとも約200ngの細胞外遊離核酸分子である。ある特定の実施形態では、量は、最大約1fg、約10fg、約100fg、約1pg、約10pg、約100pg、約1ng、約10ng、約100ng、約150ng、または約200ngの細胞外遊離核酸分子である。一部の実施形態では、方法は、試料から約1fgから約200ngの間の細胞外遊離核酸分子を得ることを含む。

30

40

【0206】

細胞外遊離核酸は、一般には、約100ヌクレオチド長から約500ヌクレオチド長の間のサイズ分布を有し、約110ヌクレオチド長~約230ヌクレオチド長の分子が試料中の分子の約90%に相当し、最頻値は約168ヌクレオチド長であり、第2の副次的なピークが約240ヌクレオチド長から約440ヌクレオチド長の間にわたる。ある特定の実施形態では、細胞外遊離核酸は、約160ヌクレオチド長から約180ヌクレオチド長まで、または約320ヌクレオチド長から約360ヌクレオチド長まで、または約440ヌクレオチド長から約480ヌクレオチド長までである。

【0207】

一部の実施形態では、溶液中に見出される細胞外遊離核酸をインタクトな細胞および体

50

液の他の不溶性構成成分から分離する分割ステップを通じて、細胞外遊離核酸を体液から単離する。これらの実施形態の一部では、分割は、遠心分離または濾過などの技法を含む。あるいは、体液中の細胞を溶解させ、細胞外遊離核酸と細胞内核酸と一緒に処理する。一般に、緩衝剤の添加および洗浄ステップ後、細胞外遊離核酸を、例えばアルコールを用いて沈殿させる。ある特定の実施形態では、夾雑物または塩を除去するためのシリカに基づくカラムなどの追加的な清澄化ステップを使用する。収率などの、例示的な手順のある特定の態様を最適化するために反応全体を通して、例えば非特異的バルクキャリア核酸を必要に応じて添加する。そのような処理後、試料は、一般には、二本鎖DNA、一本鎖DNAおよび／または一本鎖RNAを含めた様々な形態の核酸を含む。必要に応じて、一本鎖DNAおよび／または一本鎖RNAを二本鎖形態に変換し、したがって、二本鎖形態がその後の処理および解析ステップに含まれる。

10

【0208】

核酸タグ

【0209】

一部の実施形態では、核酸分子（ポリヌクレオチドの試料由来）に、試料インデックスおよび／または分子バーコード（一般に「タグ」と称される）をタグ付けすることができる。タグは、他の方法の中でも、化学合成、ライゲーション（例えば、平滑末端ライゲーションまたは粘着末端ライゲーション）、またはオーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によってアダプターに組み入れるまたは他のやり方で接合させることができる。そのようなアダプターを標的核酸分子に最終的に接合させることができる。他の実施形態では、一般に、従来の核酸増幅方法を使用して試料インデックスを核酸分子に導入するために、1つまたは複数のラウンドの増幅サイクル（例えば、PCR増幅）を適用する。増幅は、1つまたは複数の反応混合物（例えば、アレイ内の複数のマイクロウェル）中で行うことができる。分子バーコードおよび／または試料インデックスは、同時に導入することもでき、任意の逐次的順序で導入することもできる。一部の実施形態では、分子バーコードおよび／または試料インデックスを、配列捕捉ステップを実施する前および／または実施した後に導入する。一部の実施形態では、分子バーコードのみをプローブによる捕捉前に導入し、試料インデックスを配列捕捉ステップの実施後に導入する。一部の実施形態では、分子バーコードおよび試料インデックスの両方をプローブに基づく捕捉ステップの実施前に導入する。一部の実施形態では、試料インデックスを配列捕捉ステップの実施後に導入する。一部の実施形態では、分子バーコードを試料中の核酸分子（例えば、cfDNA分子）にアダプターを通じて、ライゲーション（例えば、平滑末端ライゲーションまたは粘着末端ライゲーション）によって組み入れる。一部の実施形態では、試料インデックスを試料中の核酸分子（例えば、cfDNA分子）にオーバーラップ伸長ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を通じて組み入れる。一般には、配列捕捉プロトコルは、標的とされる核酸配列、例えば、ゲノム領域のコード配列に相補的な一本鎖核酸分子を導入することを伴い、そのような領域の変異ががんの型に関連付けられる。

20

30

【0210】

一部の実施形態では、タグを試料核酸分子の一方の末端または両方の末端に位置付けることができる。一部の実施形態では、タグは、所定のまたはランダムもしくはセミランダムな配列のオリゴヌクレオチドである。一部の実施形態では、タグは、約500ヌクレオチド未満、約200ヌクレオチド未満、約100ヌクレオチド未満、約50ヌクレオチド未満、約20ヌクレオチド未満、約10ヌクレオチド未満、約9ヌクレオチド未満、約8ヌクレオチド未満、約7ヌクレオチド未満、約6ヌクレオチド未満、約5ヌクレオチド未満、約4ヌクレオチド未満、約3ヌクレオチド未満、約2ヌクレオチド未満、または約1ヌクレオチド未満の長さであり得る。タグは、試料核酸にランダムに連結することもでき、非ランダムに連結することもできる。

40

【0211】

一部の実施形態では、各試料を、試料インデックスまたは試料インデックスの組合せを用いて一意的にタグ付けする。一部の実施形態では、試料または副試料の各核酸分子を、

50

分子バーコードまたは分子バーコードの組合せを用いて一意的にタグ付けする。他の実施形態では、複数の分子バーコードを、分子バーコードが必ずしも複数内で互いに一意的にならないように使用することができる（例えば、非一意的分子バーコード）。これらの実施形態では、一般に、分子バーコードを個々の分子に、分子バーコードとそれを付着させることができる配列の組合せにより、個別に追跡することができる一意的な配列が創出されるように付着させる（例えば、ライゲーションによって）。非一意的にタグ付けされた分子バーコードと内因性配列情報（例えば、試料中の元の核酸分子の配列に対応する最初の（開始）および／もしくは最後の（終止）部分、一方の末端もしくは両方の末端における配列読み取りの部分配列、配列読み取りの長さ、および／または試料中の元の核酸分子の長さ）の組合せの検出により、一般には、一意的な同一性を特定の分子に割り当てることが可能になる。個々の配列読み取りの長さまたは塩基対の数も一意的な同一性を所与の分子に割り当てるために必要に応じて使用することができる。本明細書に記載の通り、核酸の一本鎖由来の断片に一意的な同一性が割り当てられていることにより、その後、親鎖および／または相補鎖から当該断片を識別することが可能になり得る。

【0212】

一部の実施形態では、分子バーコードを、識別子のセット（例えば、一意的または非一意的分子バーコードの組合せ）と試料中の分子の予測比率で導入する。フォーマットの1つの例では、約2種から約1,000,000種までの異なる分子バーコード、または約5種から約150種までの異なる分子バーコード、または約20種から約50種までの異なる分子バーコードを標的分子の両末端にライゲーションさせて使用する。あるいは、約25種から約1,000,000種までの異なる分子バーコードを使用することができる。例えば、20～50×20～50種の分子バーコードを使用することができる。このような識別子の数は、一般には、同じ開始点および終止点を有する異なる分子が異なる識別子の組合せを得る確率を高くする（例えば、少なくとも94%、99.5%、99.99%、または99.999%）ために十分なものである。一部の実施形態では、分子の約80%、約90%、約95%、または約99%が分子バーコードの同じ組合せを有する。

【0213】

一部の実施形態では、反応における一意的または非一意的分子バーコードの割り当てを、例えば、そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許出願第20010053519号、同第20030152490号、および同第20110160078号、ならびに米国特許第6,582,908号、同第7,537,898号、同第9,598,731号、および同第9,902,992号に記載されている方法およびシステムを使用して実施する。あるいは、一部の実施形態では、内因性配列情報（例えば、開始および／もしくは終止位置、配列の一方もしくは両方の末端部分配列、ならびに／または長さ）だけを使用して試料の異なる核酸分子を識別することができる。

【0214】

核酸増幅

【0215】

アダプターに挟まれた試料核酸を、一般には、増幅されるDNA分子を挟むアダプター内のプライマー結合性部位に結合する核酸プライマーを使用してPCRおよび他の増幅方法によって増幅させる。一部の実施形態では、増幅方法は伸長、変性およびアニーリングのサイクルを伴い、これは、サーモサイクリングによるもの、または、例えば転写増幅法におけるものと同様に等温性であり得る。必要に応じて利用する他の典型的な増幅方法としては、他の手法の中でも、リガーゼ連鎖反応、鎖置換増幅、核酸配列に基づく増幅、および自家持続配列に基づく複製が挙げられる。

【0216】

一般に、従来の核酸増幅方法を使用して分子バーコードおよび／または試料インデックスを核酸分子に導入するために、1つまたは複数のラウンドの増幅サイクルが適用される。増幅は、一般には、1つまたは複数の反応混合物中で行われる。分子バーコードおよび試料インデックスを必要に応じて同時にまたは任意の逐次的順序で導入する。一部の実施

形態では、分子バーコードおよび試料インデックスを、配列捕捉ステップを実施する前におよび／または実施した後に導入する。一部の実施形態では、分子バーコードのみをプローブによる捕捉前に導入し、試料インデックスを配列捕捉ステップの実施後に導入する。ある特定の実施形態では、分子バーコードおよび試料インデックスの両方をプローブに基づく捕捉ステップの実施前に導入する。一部の実施形態では、試料インデックスを配列捕捉ステップの実施後に導入する。一般には、配列捕捉プロトコルは、標的とされる核酸配列、例えば、ゲノム領域のコード配列に相補的な一本鎖核酸分子を導入することを伴い、そのような領域の変異ががんの型に関連付けられる。一般には、増幅反応により、約200ヌクレオチド(nt)～約700nt、250nt～約350nt、または約320nt～約550ntにわたるサイズの分子バーコードおよび試料インデックスで非一意的にまたは一意的にタグ付けされた核酸アンプリコンが複数生成される。一部の実施形態では、アンプリコンのサイズは、約300ntである。一部の実施形態では、アンプリコンのサイズは、約500ntである。

【0217】

核酸富化

【0218】

一部の実施形態では、核酸のシーケンシングを行う前に、配列を富化する。富化は、必要に応じて特異的な標的領域に対してまたは非特異的に（「標的配列」）実施する。一部の実施形態では、標的とされる目的の領域を、1つまたは複数のベイトセットパネルについて選択された核酸捕捉用プローブ（「ベイト」）を用い、示差的タイリングおよび捕捉スキームを使用して富化する。示差的タイリングおよび捕捉スキームでは、一般に、ベイトが結び付くゲノム領域にわたって示差的にタイリングするために（例えば、異なる「分解能」で）種々の相対的濃度のベイトセットを使用し、一連の制約（例えば、シーケンシング負荷、各ベイトの有用性などのシーケンサー制約）に供し、標的とされる核酸を下流のシーケンシングのために所望のレベルで捕捉する。これらの標的とされる目的のゲノム領域は、必要に応じて核酸構築物の天然または合成ヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、1つまたは複数の目的の領域に対するプローブを伴うビオチン標識ビーズを使用して、標的配列を捕捉することができ、必要に応じて、その後、これらの領域を増幅させて、目的の領域を富化させる。

【0219】

配列捕捉は、一般には、標的核酸配列とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブの使用を伴う。ある特定の実施形態では、プローブセット戦略は、目的の領域にわたってプローブをタイリングすることを伴う。そのようなプローブは、例えば、約60ヌクレオチド長から約120ヌクレオチド長までであり得る。セットの深さは、約2×、3×、4×、5×、6×、8×、9×、10×、15×、20×、50×またはそれよりも深いものであり得る。配列捕捉の効果は、一般に、一部において、プローブの配列と相補的な（またはほぼ相補的な）標的分子の配列の長さに依存する。

【0220】

核酸シーケンシング

【0221】

必要に応じてアダプターに挟まれ、予め増幅させたまたはさせていない試料核酸を、一般に、シーケンシングに供する。必要に応じて利用するシーケンシング方法または市販のフォーマットとしては、例えば、サンガーシーケンシング、ハイスループットシーケンシング、パイロシーケンシング、合成によるシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアに基づくシーケンシング、半導体シーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、RNA-Seq (Illumina)、Digital Gene Expression (Helicos)、次世代シーケンシング (NGS)、単一分子合成によるシーケンシング (SMSS) (Helicos)、大規模並列シーケンシング、Clonal Single Molecule Array (Solexa)、ショットガンシーケンシング、Ion Torrent、O

xford Nanopore、Roche Genia、Maxim-Gilbertシーケンシング、プライマーウォーキング、PacBio、SOLiD、Ion Torrent、またはNanoporeプラットフォームを使用したシーケンシングが挙げられる。シーケンシング反応は、多数の試料セットを実質的に同時に処理する多数のレーン、多数のチャンネル、多数のウェル、または他の手段を含み得る種々の試料処理装置で実施することができる。試料処理装置は、多数の動作を同時に処理することを可能にするために多数の試料チャンバーも含み得る。

【0222】

シーケンシング反応は、がんまたは他の疾患のマーカーを含有することが分かっている1つまたは複数の核酸断片型または領域に対して実施することができる。シーケンシング反応はまた、試料中に存在するあらゆる核酸断片に対して実施することもできる。シーケンシング反応は、ゲノムの少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%または100%に対して実施することができる。他の場合では、シーケンシング反応をゲノムの約5%未満、約10%未満、約15%未満、約20%未満、約25%未満、約30%未満、約40%未満、約50%未満、約60%未満、約70%未満、約80%未満、約90%未満、約95%未満、約99%未満、約99.9%未満または約100%未満に対して実施することができる。

【0223】

同時シーケンシング反応を、マルチプレックスシーケンシング技法を使用して実施することができる。一部の実施形態では、細胞外遊離ポリヌクレオチドのシーケンシングを、少なくとも約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、50000、または100,000シーケンシング反応で行う。他の実施形態では、細胞外遊離ポリヌクレオチドのシーケンシングを、約1000未満、約2000未満、約3000未満、約4000未満、約5000未満、約6000未満、約7000未満、約8000未満、約9000未満、約10000未満、約50000未満、または約100,000未満のシーケンシング反応で行う。シーケンシング反応は、一般には、逐次的にまたは同時に実施される。その後のデータ解析を、一般に、シーケンシング反応の全部または一部に対して実施する。一部の実施形態では、データ解析を少なくとも約1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10000、50000、または100,000のシーケンシング反応に対して実施する。他の実施形態では、データ解析を約1000未満、約2000未満、約3000未満、約4000未満、約5000未満、約6000未満、約7000未満、約8000未満、約9000未満、約10000未満、約50000未満、または約100,000未満のシーケンシング反応に対して実施することができる。例示的な読み取りの深さは、遺伝子座（塩基位置）1つ当たり約1000読み取りから約50000読み取りまでである。

【0224】

一部の実施形態では、核酸集団を、一方の末端または両方の末端に一本鎖突出を有する二本鎖核酸に平滑末端を酵素的に形成させることにより、シーケンシングのために調製する。これらの実施形態では、集団を、一般には、5'-3' DNAポリメラーゼ活性および3'-5' エキソヌクレアーゼ活性を有する酵素を用い、ヌクレオチド（例えば、A、C、GおよびTまたはU）の存在下で処理する。必要に応じて使用される例示的な酵素またはその触媒断片としては、クレノウ大断片およびT4ポリメラーゼが挙げられる。5' 突出では、当該酵素により、一般には、反対の鎖上の陥凹3' 末端が5' 末端と揃うまで伸長して、平滑末端が生じる。3' 突出では、当該酵素により、一般に、3' 末端が反対の鎖の5' 末端まで、および時にはそれを越えて消化される。この消化が反対の鎖の5' 末端を越えて進行する場合、5' 突出に対して使用される、同じポリメラーゼ活性を有する酵素によってギャップを埋めることができる。二本鎖核酸における平滑末端の形成により、例えば、アダプターの付着およびその後の増幅が容易になる。

【0225】

一部の実施形態では、核酸集団を、一本鎖核酸から二本鎖への変換および／またはRNAからDNAへの変換などの追加的な処理に供する。これらの形態の核酸も必要に応じてアダプターと連結し、増幅させる。

【0226】

核酸を、予め増幅させてまたは増幅させずに上記の平滑末端を形成するプロセスに供し、必要に応じて、試料中の他の核酸のシーケンシングを行って、シーケンシングされた核酸を生じさせることができる。シーケンシングされた核酸とは、核酸の配列（すなわち、配列情報）または配列が決定された核酸のいずれも指し得る。シーケンシングは、試料中の個々の核酸分子の配列データが直接、または試料中の個々の核酸分子の増幅産物のコンセンサス配列から間接的にもたらされるように実施することができる。

10

【0227】

一部の実施形態では、平滑末端形成後の試料中の一本鎖突出を有する二本鎖核酸の両末端を、分子バーコードを含むアダプターと連結し、シーケンシングにより、核酸配列ならびにアダプターによって導入された分子バーコードを決定する。平滑末端DNA分子を必要に応じて少なくとも部分的に二本鎖のアダプター（例えば、Y形または鐘形アダプター）の平滑末端とライゲーションする。あるいは、ライゲーションを容易にするために（例えば、粘着末端ライゲーションに関して）、試料核酸およびアダプターの平滑末端に、相補的なヌクレオチドを用いて尾部付加することができる。

【0228】

一般には、同じ核酸の任意の2つのコピーが、両末端に連結したアダプター由来のアダプターバーコード（すなわち、分子バーコード）の同じ組合せを受ける確率が低くなる（例えば、<1または0.1%）ように、核酸試料を十分な数のアダプターと接触させる。アダプターをこのように使用することにより、参照核酸における開始点および終止点が同じであり、同じ分子バーコードの組合せと連結した核酸配列のファミリーを識別することが可能になる。そのようなファミリーは、増幅前の試料中の核酸の増幅産物の配列を表す。平滑末端形成およびアダプター付着によって改変されるにしたがって、ファミリーメンバーの配列をコンパイルして、元の試料中の核酸分子に対するコンセンサスヌクレオチド（複数可）または完全なコンセンサス配列を導き出すことができる。言い換えれば、試料中の核酸の既定の位置を占有するヌクレオチドを、ファミリーメンバー配列のその対応する位置を占有するヌクレオチドのコンセンサスであると決定する。ファミリーは、二本鎖核酸の一方または両方の鎖の配列を含み得る。ファミリーのメンバーが二本鎖核酸の両方の鎖の配列を含む場合、全ての配列をコンパイルして、コンセンサスヌクレオチド（複数可）または配列を導き出す目的で、一方の鎖の配列をそれらの相補物に変換する。一部のファミリーは、単一のメンバー配列のみを含む。この場合、この配列を、増幅前の試料中の核酸の配列とみなすことができる。あるいは、単一のメンバー配列のみを伴うファミリーをその後の解析から除外することができる。

20

30

【0229】

シーケンシングされた核酸のヌクレオチドバリエーションは、シーケンシングされた核酸を参照配列と比較することによって決定することができる。参照配列は、多くの場合、既知配列、例えば、対象由来の既知の全ゲノム配列または部分的なゲノム配列（例えば、ヒト対象の全ゲノム配列）である。参照配列は、例えば、hg19またはhg38であり得る。シーケンシングされた核酸は、上記の通り、試料中の核酸について直接決定された配列、またはそのような核酸の増幅産物の配列のコンセンサスを表し得る。比較は、参照配列の1つまたは複数の指定位置で実施することができる。それぞれの配列を最大限にアラインメントした場合に、参照配列の指定位置に対応する位置を含むシーケンシングされた核酸のサブセットを識別することができる。そのようなサブセット内では、もしあれば、どのシーケンシングされた核酸が指定位置にヌクレオチドバリエーションを含むか、および必要に応じて、もしあれば、どれが参照ヌクレオチドを含むか（すなわち、参照配列と同じであるか）を決定することができる。ヌクレオチドバリエーションを含むサブセット内

40

50

のシーケンシングされた核酸の数が選択された閾値を超える場合には、その指定位置においてバリエーションヌクレオチドをコールすることができる。閾値は、他の可能性の中でも、ヌクレオチドバリエーションを含むサブセット内のシーケンシングされた核酸が少なくとも1、2、3、4、5、6、7、9、もしくは10などの単純な数であり得る、または、ヌクレオチドバリエーションを含むサブセット内のシーケンシングされた核酸に対して少なくとも0.5、1、2、3、4、5、10、15、もしくは20などの比であり得る。参照配列内の目的の任意の指定位置について比較を繰り返すことができる。時には、参照配列の少なくとも約20、100、200、または300の連続した位置、例えば、約20～500、または約50～300の連続した位置を占有する指定位置について比較を実施することができる。

10

【0230】

本明細書に記載のフォーマットおよび適用を含めた核酸シーケンシングに関する追加的な詳細は、例えば、Levy et al., Annual Review of Genomics and Human Genetics, 17: 95-115 (2016)、Liu et al., J. of Biomedicine and Biotechnology, Volume 2012, Article ID 251364: 1-11 (2012)、Voelkerding et al., Clinical Chem., 55: 641-658 (2009)、MacLean et al., Nature Rev. Microbiol., 7: 287-296 (2009)、Astier et al., J Am Chem Soc., 128 (5): 1705-10 (2006)、米国特許第6,210,891号、米国特許第6,258,568号、米国特許第6,833,246号、米国特許第7,115,400号、米国特許第6,969,488号、米国特許第5,912,148号、米国特許第6,130,073号、米国特許第7,169,560号、米国特許第7,282,337号、米国特許第7,482,120号、米国特許第7,501,245号、米国特許第6,818,395号、米国特許第6,911,345号、米国特許第7,501,245号、米国特許第7,329,492号、米国特許第7,170,050号、米国特許第7,302,146号、米国特許第7,313,308号、および米国特許第7,476,503号にも提供されており、これらはそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0231】

比較用結果

【0232】

本出願に開示される方法に従って決定された所与の対象の調整された腫瘍遺伝子変異量(TMB)を、一般には、参照集団由来の比較用結果(例えば、TMB)のデータベースと比較して、その対象に対するカスタマイズされたまたは標的化療法を識別する。一部の実施形態では、試験対象のTMBおよび比較用TMBを、例えば、ゲノム全体またはエキソーム全体にわたって測定し、一方、他の実施形態では、例えば、ゲノムまたはエキソームのサブセットまたは標的化領域に基づいてそれらのTMBを測定し、それらを必要に応じて推定して、全ゲノムまたは全エキソームについてのTMBを決定する。一般には、参照集団は、試験対象と同じがんの型を有する患者、および／または試験対象と同じ療法を受けている、もしくは受けた患者を含む。一部の実施形態では、試験対象のTMBおよび比較用TMBを、所定のまたは選択された遺伝子またはゲノム領域のセットにおける変異カウントまたは負荷量を決定することによって測定する。基本的にあらゆる遺伝子(例えば、癌遺伝子)がそのような解析のために必要に応じて選択される。これらの実施形態のある特定のものでは、選択された遺伝子またはゲノム領域は、少なくとも約50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1,500、2,000またはそれよりも多くの選択された遺伝子またはゲノム領域を含む。これらの実施形態の一部では、選択された遺伝子またはゲノム領域は、必要に応じて、表1に列挙されている1つまたは複数の遺伝子を含む。

40

50

【表 1】

表1

点変異 (SNVs)						増幅 (CNVs)		融合	インデル
AKT1	ALK	APC	AR	ARAF	ARID1A	AR	BRAF	ALK	EGFR (エクソン 19 & 20)
ATM	BRAF	BRCA1	BRCA2	CCND1	CCND2	CCND1	CCND2	FGFR2	
CCNE1	CDH1	CDK4	CDK6	CDKN2 A	CDKN2 B	CCNE1	CDK4	FGFR3	ERBB2 (エクソン 19 & 20)
CTNNB1	EGFR	ERBB2	ESR1	EZH2	FBXW7	CDK6	EGFR	NTRK1	
FGFR1	FGFR2	FGFR3	GATA3	GNA11	GNAQ	ERBB2	FGFR1	RET	MET (エクソン14 スキッピング)
GNAS	HNF1A	HRAS	IDH1	IDH2	JAK2	FGFR2	KIT	ROS1	
JAK3	KIT	KRAS	MAP2K1	MAP2K2	MET	KRAS	MET		
MLH1	MPL	MYC	NF1	NFE2L2	NOTCH1	MYC	PDGFR A		
NPM1	NRAS	NTRK1	PDGFR A	PIK3CA	PTEN	PIK3C A	RAF1		
PTPN11	RAF1	RB1	RET	RHEB	RHOA				
RIT1	ROS1	SMAD4	SMO	SRC	STK11				
TERT	TP53	TSC1	VHL						

10

20

【0233】

ある特定の実施形態では、選択された遺伝子またはゲノム領域は、必要に応じて、表2に列挙されている1つまたは複数の遺伝子を含む。

【表 2 - 1】

表 2

ABL1	ABL2	ACVR1B	ACVR2A	ADARB2	ADGRA2	ADGRG4	AFDN	AKT1	AKT1S1	AKT2	AKT3
ALB	ALK	ALOX12B	ALOX15B	ALOX5	AMER1	APC	APEX1	AR	ARAF	ARFRP1	ARHGAP35
ARID1A	ARID1B	ARID2	ASXL1	ATM	ATR	ATRX	AURKA	AURKB	AXIN1	AXIN2	AXL
B2M	BAP1	BARD1	BCL2	BCL2L1	BCL2L2	BCL6	BCOR	BCORL1	BCR	BIRC5	BLM
BRAF	BRCA1	BRCA2	BRD2	BRD3	BRD4	BRIP1	BTG1	BTG2	BTK	BUB1B	CARD11
CASP8	CBFB	CBL	CBLB	CCND1	CCND2	CCND3	CCNE1	CD274	CD79A	CD79B	CDC7
CDC73	CDH1	CDK12	CDK4	CDK6	CDK8	CDKN1A	CDKN1B	CDKN2A	CDKN2B	CDKN2C	CEBPA
CEP295	CHEK1	CHEK2	CIC	CNOT3	CREBBP	CRKL	CRTC1	CSF1R	CTCF	CTLA4	CTNNA1
CTNNB1	CUL3	CUX1	CYLD	DAXX	DDIT3	DDR1	DDR2	DEPDC5	DEPTOR	DICER1	DLL4
DNMT3A	DOT1L	DYRK2	E2F3	ECT2L	EGFR	EIF1AX	EIF4A1	EIF4A2	EIF4A3	EIF4B	EIF4E
EIF4E2	ELF3	EML4	EMSY	EP300	EPCAM	EPHA3	EPHA5	EPHA7	EPHB1	ERBB2	ERBB3
ERBB4	ERCC1	ERCC2	ERCC3	ERCC4	ERCC5	ERCC6	ERCC8	ERG	ERRF1	ESR1	ETV1
ETV4	ETV5	ETV6	EWSR1	EXO1	EZH2	FAAP100	FAAP20	FAAP24	FAM175A	FAM46C	FANCA

30

40

【表 2 - 2】

FANCB	FANCC	FANCD2	FANCE	FANCF	FANCG	FANCI	FANCL	FANCM	FAS	FAT1	FBXW7
FEN1	FGF10	FGF14	FGF19	FGF23	FGF3	FGF4	FGF6	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4
FH	FLCN	FLT1	FLT3	FLT4	FOXA1	FOXL2	FOXO1	FOXP1	FRS2	FUBP1	FZD1
FZD10	FZD2	FZD3	FZD4	FZD5	FZD6	FZD7	FZD8	FZD9	GAS6	GATA1	GATA2
GATA3	GATA6	GEN1	GID4	GNA11	GNA13	GNAQ	GNAS	GRIN2A	GSK3B	H3F3A	HDAC2
HELQ	HES1	HEY1	HEYL	HGF	HIST3H3	HNF1A	HRAS	HSP90AA1	IDH1	IDH2	IDO1
IFNG	IFNGR1	IFNGR2	IGF1	IGF1R	IGF2	IGF2R	IKBKE	IKZF1	IL2RG	IL7R	INHBA
INPP4B	IRF1	IRF4	IRS2	JAK1	JAK2	JAK3	JUN	KAT6A	KDM4A	KDM5A	KDM5B
KDM5C	KDM6A	KDR	KEAP1	KIT	KLHL6	KMT2A	KMT2D	KNSTRN	KRAS	LGR4	LGR5
LGR6	LIG1	LIG4	LMO1	LRP1B	LRP2	LRP5	LRP6	MAD2L2	MAP2K1	MAP2K2	MAP2K4
MAP3K1	MAP4K3	MAPK1	MAPK3	MAPKAP1	MAX	MCL1	MDC1	MDM2	MDM4	MED12	MEF2B
MEN1	MERTK	MET	MITF	MLH1	MLH3	MLST8	MPL	MRAS	MRE11	MSH2	MSH3
MSH6	MTOR	MUTYH	MYB	MYC	MYCL	MYCN	MYD88	NBN	NF1	NF2	NFE2L2
NFKBIA	NHEJ1	NKX2-1	NOTCH1	NOTCH2	NOTCH3	NOTCH4	NPM1	NPRL2	NPRL3	NRAS	NSD1
NTRK1	NTRK2	NTRK3	NUMB	NUP93	NUTM1	PAK3	PALB2	PARG	PARP1	PARP2	PAX5
PBRM1	PCDH15	PDCD1	PDCD1LG2	PDGFRA	PDGFRB	PDK1	PHF6	PIAS4	PIK3C2B	PIK3CA	PIK3CB
PIK3CD	PIK3CG	PIK3R1	PIK3R2	PIK3R3	PIM1	PIN1	PKM	PLEKHS1	PMS1	PMS2	POLD1
POLE	POLH	POLQ	POU2F2	PPARG	PPM1D	PPP2CA	PPP2R1A	PPP2R2A	PPP3CA	PPP6C	PRDM1
PREX1	PREX2	PRKAR1A	PRKCI	PRKDC	PTCH1	PTEN	PTPN11	PTPRD	RAC1	RAD18	RAD21
RAD50	RAD51	RAD51B	RAD51C	RAD51D	RAD52	RAD54L	RAF1	RARA	RASA1	RB1	RBM10
RET	REV3L	RGS1	RHEB	RHOA	RHOB	RICTOR	RIT1	RNF43	ROBO1	ROBO2	ROS1
RPA1	RPS27A	RPS6KA3	RPS6KB1	RPTOR	RRAGC	RSP01	RSP04	RUNX1	RUNX1T1	SDHB	SDHC
SDHD	SESN2	SETD2	SF3B1	SHFM1	SLC34A2	SLFN11	SLIT2	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SMARCA2
SMARCA4	SMARCB1	SMO	SOC1	SOC3	SOS1	SOX10	SOX2	SOX9	SPEN	SPOP	SRC
SRSF2	SRY	STAG2	STAT3	STAT4	STK11	STK19	SUFU	SYK	TBC1D7	TBX3	TEK
TERT	TET2	TGFBR2	TNFRSF22	TNFAIP3	TNFRSF14	TNFRSF1A	TNK2	TOP1	TOPAZ1	TP53	TP53BP1
TP63	TP73	TRAF3	TSC1	TSC2	TSHR	TSHZ2	TYRO3	U2AF1	UBE2T	USP9X	VEGFA
VHL	WEE1	WISP3	WRN	WT1	XBP1	XPA	XPC	XPO1	XRCC1	XRCC2	XRCC3
XRCC4	XRCC5	XRCC6	YAP1	ZNF217	ZNF703	ZNRF3	ZRSR2				

10

20

30

【0 2 3 4】

がん

【0 2 3 5】

ある特定の実施形態では、本明細書に開示される方法およびシステムを使用して、患者における所与の疾患または状態を処置するためのカスタマイズされた療法を識別する。一般には、考慮中の疾患は、がんの一種である。そのようながんの非限定的な例としては、胆道がん、膀胱がん、移行上皮癌、尿路上皮癌、脳がん、神経膠腫、星状細胞腫、乳癌、化生性癌、子宮頸がん、子宮頸部扁平上皮癌、直腸がん、結腸直腸癌、結腸がん、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、結腸直腸腺癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮内膜癌、子宮内膜間質肉腫、食道がん、食道扁平上皮癌、食道腺癌、眼内黒色腫、ぶどう膜黒色腫、胆嚢癌、胆嚢腺癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、移行上皮癌、尿路上皮癌、ウィルムス腫瘍、白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、肝がん、肝癌、ヘパトーマ、肝細胞癌、胆管細胞癌、肝芽腫、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、中皮腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病、末梢性T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌（NPC）、神経芽細胞腫、中咽頭がん、口腔扁平上皮癌、骨肉腫、卵巣癌、膵がん、膵管腺癌、偽乳頭状新生物、腺房細胞癌、前立腺がん、前立腺腺癌、皮膚がん、黒色腫、悪性黒色腫、

40

50

皮膚黒色腫、小腸癌、胃がん、胃癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮がん、または子宮肉腫が挙げられる。

【0236】

カスタマイズされた療法および関連する施行

【0237】

一部の実施形態では、本明細書に開示される方法は、所与の調整されたTMBを有する患者に対するカスタマイズされた療法を識別し、施行することに関する。基本的にあらゆるがん療法（例えば、外科療法、放射線療法、化学療法、および／または同様のもの）がこれらの方法の一部として含まれる。一般には、カスタマイズされた療法は、少なくとも1つの免疫療法（または免疫治療剤）を含む。免疫療法とは、一般に、所与のがんの型に対する免疫応答を増強する方法を指す。ある特定の実施形態では、免疫療法とは、腫瘍またはがんに対するT細胞応答を増強する方法を指す。

【0238】

一部の実施形態では、免疫療法または免疫治療剤は、免疫チェックポイント分子を標的とする。ある特定の腫瘍は、免疫チェックポイント経路を選ぶことにより、免疫系から逃れることができる。したがって、免疫チェックポイントの標的化は、免疫系を逃れる腫瘍の能力を阻止し、ある特定のがんに対する抗腫瘍免疫を活性化するために有効な手法として登場した。Pardoll, Nature Reviews Cancer, 2012, 12: 252-264。

【0239】

ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、抗原に対するT細胞応答に関与するシグナルを低減する阻害性分子である。例えば、CTLA4は、T細胞上に発現され、抗原提示細胞上のCD80（B7.1としても公知）またはCD86（B7.2としても公知）に結合することにより、T細胞活性化の下方制御において役割を果たす。PD-1は、T細胞上に発現される別の阻害性チェックポイント分子である。PD-1は、炎症反応中の末梢組織におけるT細胞の活性を限定する。さらに、PD-1のリガンド（PD-L1またはPD-L2）は、一般に、多くの異なる腫瘍の表面上で上方制御され、その結果、腫瘍微小環境の抗腫瘍免疫応答が下方制御される。ある特定の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、CTLA4またはPD-1である。他の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、PD-L1またはPD-L2などのPD-1のリガンドである。他の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、CD80またはCD86などのCTLA4のリガンドである。他の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、リンパ球活性化遺伝子3（LAG3）、キラー細胞免疫グロブリン様受容体（KIR）、T細胞膜タンパク質3（TIM3）、ガレクチン9（GAL9）、またはアデノシンA2a受容体（A2aR）である。

【0240】

これらの免疫チェックポイント分子を標的とするアンタゴニストを使用して、ある特定のがんに対する抗原特異的T細胞応答を増強することができる。したがって、ある特定の実施形態では、免疫療法または免疫治療剤は、阻害性免疫チェックポイント分子のアンタゴニストである。ある特定の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、PD-1である。ある特定の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子は、PD-L1である。ある特定の実施形態では、阻害性免疫チェックポイント分子のアンタゴニストは、抗体（例えば、モノクローナル抗体）である。ある特定の実施形態では、抗体またはモノクローナル抗体は、抗CTLA4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、または抗PD-L2抗体である。ある特定の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗PD-1抗体である。一部の実施形態では、抗体は、モノクローナル抗PD-L1抗体である。ある特定の実施形態では、モノクローナル抗体は、抗CTLA4抗体と抗PD-1抗体の組合せ、抗CTLA4抗体と抗PD-L1抗体の組合せ、または抗PD-L1抗体と抗PD-1抗体の組合せである。ある特定の実施形態では、抗PD-1抗体は、ペムブロリズマブ（Keytruda（登録商標））またはニボルマブ（Opdivo（登録商標））のうち

10

20

30

40

50

の1つまたは複数である。ある特定の実施形態では、抗CTLA4抗体は、イピリムマブ（Yervoy（登録商標））である。ある特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブ（Tecentriq（登録商標））、アベルマブ（Bavencio（登録商標））、またはデュルバルマブ（Imfinzi（登録商標））のうちの1つまたは複数である。

【0241】

ある特定の実施形態では、免疫療法または免疫治療剤は、CD80、CD86、LAG3、KIR、TIM3、GAL9、TIGITまたはA2aRに対するアンタゴニスト（例えば、抗体）である。他の実施形態では、アンタゴニストは、阻害性免疫チェックポイント分子の細胞外ドメインと抗体のFcドメインを含む可溶性融合タンパク質などの、阻害性免疫チェックポイント分子の可溶性バージョンである。ある特定の実施形態では、可溶性融合タンパク質は、CTLA4、PD-1、PD-L1、またはPD-L2の細胞外ドメインを含む。一部の実施形態では、可溶性融合タンパク質は、CD80、CD86、LAG3、KIR、TIM3、GAL9、またはA2aRの細胞外ドメインを含む。一実施形態では、可溶性融合タンパク質は、PD-L2またはLAG3の細胞外ドメインを含む。

【0242】

ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、抗原に対するT細胞応答に関与するシグナルを増幅させる共刺激分子である。例えば、CD28は、T細胞上に発現される共刺激受容体である。T細胞がT細胞受容体を通じて抗原に結合すると、CD28が抗原提示細胞上のCD80（B7.1としても公知）またはCD86（B7.2としても公知）に結合して、T細胞受容体シグナル伝達が増幅し、T細胞活性化が促進される。CD28はCTLA4と同じリガンド（CD80およびCD86）に結合するので、CTLA4により、CD28によって媒介される共刺激シグナル伝達を打ち消すまたは制御することができる。ある特定の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、CD28、誘導性T細胞共刺激物質（ICOS）、CD137、OX40、またはCD27から選択される共刺激分子である。他の実施形態では、免疫チェックポイント分子は、例えば、CD80、CD86、B7RP1、B7-H3、B7-H4、CD137L、OX40L、またはCD70を含めた共刺激分子のリガンドである。

【0243】

これらの共刺激チェックポイント分子を標的とするアゴニストを使用して、ある特定のガンに対する抗原特異的T細胞応答を増強することができる。したがって、ある特定の実施形態では、免疫療法または免疫治療剤は、共刺激チェックポイント分子のアゴニストである。ある特定の実施形態では、共刺激チェックポイント分子のアゴニストはアゴニスト抗体であり、モノクローナル抗体であることが好ましい。ある特定の実施形態では、アゴニスト抗体またはモノクローナル抗体は、抗CD28抗体である。他の実施形態では、アゴニスト抗体またはモノクローナル抗体は、抗ICOS抗体、抗CD137抗体、抗OX40抗体、または抗CD27抗体である。他の実施形態では、アゴニスト抗体またはモノクローナル抗体は、抗CD80抗体、抗CD86抗体、抗B7RP1抗体、抗B7-H3抗体、抗B7-H4抗体、抗CD137L抗体、抗OX40L抗体、または抗CD70抗体である。

【0244】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載のカスタマイズされた療法は、一般には非経口的に投与される（例えば、静脈内にまたは皮下に）。免疫治療剤を含有する医薬組成物は、一般には静脈内に投与される。ある特定の治療剤は経口投与される。しかし、カスタマイズされた療法（例えば、免疫治療剤など）は、例えば、頬側、舌下、直腸、膣、尿道内、局部、眼内、鼻腔内、および／または耳介内を含めた当技術分野で公知の任意の方法によって投与することもでき、これらの投与は、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、水性懸濁剤、ゲル剤、噴霧剤、坐剤、膏薬、軟膏剤などを含み得る。

【0245】

システムおよびコンピューター可読媒体

【0246】

本開示は、種々のシステムおよびコンピュータープログラム製品または機械可読媒体も提供する。一部の実施形態では、例えば、本明細書に記載の方法は、少なくとも一部において、システム、分散コンピューティングハードウェアおよびアプリケーション（例えば、クラウドコンピューティングサービス）、電子通信ネットワーク、通信インターフェース、コンピュータープログラム製品、機械可読媒体、電子記憶媒体、ソフトウェア（例えば、機械により実行可能なコードまたは論理命令）ならびに／または同様のものを使用して必要に応じて実施されるまたは促進される。例示のために、図2に、少なくとも本出願に開示される方法の態様の実行での使用に適した例示的なシステムの概略図を提示する。

示されている通り、システム200は、少なくとも1つのコントローラまたはコンピューター、例えば、プロセッサ204および記憶装置、ストレージデバイス、または記憶装置構成要素206を含むサーバー202（例えば、検索エンジンサーバー）、ならびに、遠隔サーバー202から離れた所に配置され、遠隔サーバー202とインターネットまたは他のインターネットワークなどの電子通信ネットワーク212を通じて通信する1つまたは複数の他の通信デバイス214および216（例えば、クライアントサイドコンピューターターミナル、電話機、タブレット、ラップトップ、他のモバイルデバイスなど）を含む。通信デバイス214および216は、一般には、例えば、サーバー202コンピューターとネットワーク212を通じて通信する電子ディスプレイ（例えば、インターネット接続可能なコンピューターなど）を含み、電子ディスプレイは、本明細書に記載の方法が実行された際に結果を表示するためのユーザーインターフェース（例えば、グラフィカルユーザーインターフェース（GUI）、ウェブベースユーザーインターフェース、および／または同様のもの）を含む。ある特定の実施形態では、通信ネットワークは、例えば、ハードドライブ、サムドライブ、または他のデータ記憶機構を使用した1つの場所から別の場所へのデータの物理的転送も包含する。システム200は、1つまたは複数の他の通信デバイス、例えば214（デスクトップまたはパーソナルコンピューターとして概略的に示されている）および216（タブレットコンピューターとして概略的に示されている）による、例えば、ガイドされた検索アプリケーションまたは他の実行可能なものを容易にするために、コンピューター、または、例えば、サーバー202によって可読のサーバー202の記憶装置206などの種々の型の記憶装置の1つまたは複数などの機械可読媒体に記憶されたプログラム製品208も含む。一部の実施形態では、システム200は、必要に応じて、例えば、直接または検索エンジンサーバー202を通じてのいずれかで検索可能なデータが記憶されたオンラインウェブサイトに関連付けられるサーバー210（例えば、カスタマイズされた療法を指し示す対照試料または比較用結果データなど）などの少なくとも1つのデータベースサーバーも含む。システム200は、必要に応じて、サーバー202から離れた所に配置された1つまたは複数の他のサーバーも含み、そのそれぞれが、必要に応じて、他のサーバーのそれぞれから離れた所に位置するまたはそれらに対してローカルである1つまたは複数のデータベースサーバー210と関連付けられる。他のサーバーにより、地理的に離れたユーザーにサービスを有益に提供し、地理的に分散した操作を増強することができる。

【0247】

当業者には理解される通り、サーバー202の記憶装置206は、必要に応じて、例えば、とりわけ、RAM、ROM、および磁気または光ディスクを含めた揮発性および／または不揮発性記憶装置を含む。単一のサーバーを例示しているが、例示されているサーバー202の構成は単に例として示したものであり、種々の他の方法体系またはアーキテクチャに従って構成された他の型のサーバーまたはコンピューターも使用することができることも当業者には理解される。図2に概略的に示されているサーバー202は、サーバーまたはサーバークラスターまたはサーバーファームを表し、いかなる個々の物理的サーバーにも限定されない。サーバーサイトは、サーバーホスティング提供者によって管理されるサーバーファームまたはサーバークラスターとして配置することができる。サーバーな

らびにそれらのアーキテクチャおよび構成の数をシステム 200 に対する使用、要求および容量の要件に基づいて増加させることができる。同じく当業者には理解される通り、これらの実施形態では、他のユーザー通信デバイス 214 および 216 は、例えば、ラップトップ、デスクトップ、タブレット、携帯情報端末 (PDA)、携帯電話、サーバー、または他の型のコンピューターであってよい。当業者には公知であり、理解される通り、ネットワーク 212 は、1 つまたは複数の他のコンピューターと、通信ネットワークおよび／またはローカルもしくは他のエリアネットワークの一部を通じて通信する複数のコンピューター／サーバーのインターネット、イントラネット、電気通信ネットワーク、エクストラネット、またはワールドワイドウェブを含み得る。

【0248】

当業者にはさらに理解される通り、例示的なプログラム製品または機械可読媒体 208 は、必要に応じて、ハードウェアの機能を制御し、その操作を指揮する順序付けられた操作の 1 つまたは複数のセットを提供するマイクロコード、プログラム、クラウドコンピューティングフォーマット、ルーチン、および／または記号言語の形態である。例示的な実施形態によるプログラム製品 208 はまた、その全体が揮発性記憶装置内に存在する必要はなく、必要に応じて、当業者には公知であり、理解される種々の方法体系に従って選択的にローディングすることができる。

【0249】

当業者にはさらに理解される通り、「コンピューター可読媒体」または「機械可読媒体」という用語は、プロセッサへの実行の命令の提示に関与する任意の媒体を指す。例示のために、「コンピューター可読媒体」または「機械可読媒体」という用語は、例えば、コンピューターによる読み取りのために、本開示の種々の実施形態の機能性またはプロセスを実行するプログラム製品 608 を記憶させることができる分散媒体、クラウドコンピューティングフォーマット、中間記憶媒体、コンピューターの実行記憶装置、および任意の他の媒体またはデバイスを包含する。「コンピューター可読媒体」または「機械可読媒体」は、これだけに限定されないが、非揮発性媒体、揮発性媒体、および伝送媒体を含めた多くの形態をとり得る。非揮発性媒体としては、例えば、光学ディスクまたは磁気ディスクが挙げられる。揮発性媒体としては、所与のシステムのメインメモリなどのダイナミックメモリが挙げられる。伝送媒体としては、バスを含むワイヤーを含めた、同軸ケーブル、銅線および光ファイバーが挙げられる。伝送媒体は、とりわけ、電波および赤外データ通信の間に生成されるものなどの音波または光波の形態もとる。コンピューター可読媒体の例示的な形態としては、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、フラッシュドライブ、もしくは任意の他の磁気媒体、CD-ROM、任意の他の光学媒体、パンチカード、紙テープ、ホール、RAM、PROM、および EPROM のパターンを有する任意の他の物理的な媒体、FLASH（登録商標）-EPROM、任意の他のメモリチップもしくはカートリッジ、搬送波、またはコンピューターが読み取りを行うことができる任意の他の媒体が挙げられる。

【0250】

プログラム製品 208 は、必要に応じて、コンピューター可読媒体からハードディスクまたは同様の中間記憶媒体にコピーされる。プログラム製品 208 またはその一部が実施される際、コンピューター（複数可）が種々の実施形態の機能性または方法に一致して作動するように構成されたそれらの分散媒体、それらの中間記憶媒体などから、1 つまたは複数のコンピューターの実行記憶装置に必要に応じてローディングされる。そのような操作は全て、例えば、コンピューターシステムの当業者に周知である。

【0251】

さらなる例示のために、ある特定の実施形態では、本出願は、1 つまたは複数のプロセッサ、およびプロセッサと通信する 1 つまたは複数の記憶装置構成要素を含むシステムを提供する。記憶装置構成要素は、一般には、実行されると、プロセッサに、少なくとも 1 つの変異カウント、調整された結果／TMB、比較用結果、カスタマイズされた療法、および／もしくは同様のものの表示を引き起こす情報を提供させる（例えば、通信デバイス

10

20

30

40

50

214、216などを介して)、ならびに／または他のシステム構成要素および／もしくはシステムユーザーから情報を受信させる(例えば、通信デバイス214、216などを介して)1つまたは複数の命令を含む。

【0252】

一部の実施形態では、プログラム製品208は、電子プロセッサ204によって実行されると、少なくとも、(i)対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、(ii)核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、(iii)シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、(iv)予測結果を考慮して観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、対象における腫瘍遺伝子変異量(TMB)を検出するステップと、必要に応じて、(v)調整された結果を1つまたは複数の比較用結果と比較するステップであって、調整された結果と比較用結果が実質的にマッチすることにより、対象に対する療法に対する予想応答が示される、ステップとを実施する非一時的なコンピューターで実行可能な命令を含む。

10

【0253】

システム200は、一般には、本明細書に記載の方法の種々の態様を実施するように構成された追加的なシステム構成要素も含む。これらの実施形態の一部では、これらの追加的なシステム構成要素の1つまたは複数の、遠隔サーバー202から離れた所に配置され、電子通信ネットワーク212を通じて遠隔サーバー202と通信し、一方、他の実施形態では、これらの追加的なシステム構成要素の1つまたは複数の、ローカルに配置され、サーバー202と通信する(すなわち、電子通信ネットワーク212の非存在下で)か、または、例えばデスクトップコンピューター214と直接通信する。

20

【0254】

一部の実施形態では、例えば、追加的なシステム構成要素は、コントローラ202に作動可能に接続された(直接または間接的に(例えば、電子通信ネットワーク212を介して))試料調製構成要素218を含む。試料調製構成要素218は、核酸増幅構成要素(例えば、サーマルサイクラーなど)および／または核酸シーケンサーによって増幅および／またはシーケンシングしようとする試料中の核酸を調製する(例えば、核酸のライブラリーを調製する)ように構成されている。これらの実施形態のある特定のものでは、試料調製構成要素218は、試料中の核酸を他の構成要素から単離するように、本明細書に記載の通り分子バーコードを含む1つもしくは複数のアダプターを核酸に付着させるように、シーケンシングの前にゲノムもしくはトランスクリプトームから1つもしくは複数の領域を選択的に富化するように、および／または同様のことを行うように構成されている。

30

【0255】

ある特定の実施形態では、システム200は、コントローラ202に作動可能に接続された(直接または間接的に(例えば、電子通信ネットワーク212を介して))核酸増幅構成要素220(例えば、サーマルサイクラーなど)も含む。核酸増幅構成要素220は、対象由来の試料中の核酸を増幅させるように構成されている。例えば、核酸増幅構成要素220は、必要に応じて、本明細書に記載の通り試料中のゲノムまたはトランスクリプトームから選択的に富化された領域を増幅するように構成されている。

40

【0256】

システム200は、一般には、コントローラ202に作動可能に接続された(直接または間接的に(例えば、電子通信ネットワーク212を介して))少なくとも1つの核酸シーケンサー222も含む。核酸シーケンサー222は、対象由来の試料中の核酸(例えば、増幅した核酸)から配列情報をもたらすように構成されている。基本的にあらゆる型の核酸シーケンサーをこれらのシステムにおける使用に適合させることができる。例えば、核酸シーケンサー222は、必要に応じて、パイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシング、ハイブリダイゼーションによるシーケンシング、ま

50

たは他の技法を核酸に対して実施して、シーケンシング読み取りを生成するように構成されている。必要に応じて、核酸シーケンサー 222 は、配列読み取りを配列読み取りのファミリーに群分けするように構成されており、各ファミリーは、所与の試料中の核酸から生成された配列読み取りを含む。一部の実施形態では、核酸シーケンサー 222 では、シーケンシングライブラリーに由来するクローン単一分子アレイを使用して、シーケンシング読み取りを生成する。ある特定の実施形態では、核酸シーケンサー 222 は、シーケンシングライブラリーのシーケンシングを行って、シーケンシング読み取りを生成するためのマイクロウェルのアレイを有する少なくとも 1 つのチップを含む。

【0257】

完全なまたは部分的なシステム自動化を容易にするために、システム 200 は、一般には、コントローラ 202 に作動可能に接続された（直接または間接的に（例えば、電子通信ネットワーク 212 を介して））材料移動構成要素 224 も含む。材料移動構成要素 224 は、1 つまたは複数の材料（例えば、核酸試料、アンプリコン、試薬、および／または同様のもの）を核酸シーケンサー 222、試料調製構成要素 218、および核酸増幅構成要素 220 に、ならびに／または核酸シーケンサー 222、試料調製構成要素 218、および核酸増幅構成要素 220 から移動させるように構成されている。コンピューターシステムおよびネットワーク、データベース、およびコンピュータープログラム製品に関する追加的な詳細は、例えば、Peterson, Computer Networks: A Systems Approach, Morgan Kaufmann, 5th Ed. (2011)、Kurose, Computer Networking: A Top-Down Approach, Pearson, 7th Ed. (2016)、Elmasri, Fundamentals of Database Systems, Addison Wesley, 6th Ed. (2010)、Coronel, Database Systems: Design, Implementation, & Management, Cengage Learning, 11th Ed. (2014)、Tucker, Programming Languages, McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2nd Ed. (2006)、および Rhoton, Cloud Computing Architected: Solution Design Handbook, Recursive Press (2011) でも提供されており、これらはそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0258】

免疫レパートリーのシーケンシング

【0259】

本明細書に記載の TMB 解析に加えて、本出願は、免疫レパートリーのシーケンシングを対象とする方法をさらに提供する。免疫受容体（T 細胞に関しては T 細胞受容体（TCR）、B 細胞に関しては免疫グロブリン（Ig））は、これらのリンパ球の一意的な「バーコード」である（健康なヒトでは受容体の種類が 10^6 種を超える）。免疫系は、病原体（すなわち、ワクチン、病原体、およびがん変異由来の新抗原）を認識すると、抗原特異的 T 細胞のクローンへの増大を可能にする免疫応答を誘発する。TCR などの免疫受容体の一意性のシーケンシングを行うことにより、患者試料において免疫応答を追跡することが可能になる。ある特定の実施形態では、免疫レパートリーのプロファイリングにより、TMB 解析と相補的な解析が可能になる。高 TMB スコアは、免疫療法（抗 PD1、抗 PDL1、抗 CTLA4 など）に対する患者の応答と相関する可能性が高く、一方、免疫レパートリーの測定は、がん中存在する新抗原の高出現に応答した実際の機能的転帰である。さらに、いくつかの、例えば白血病細胞および他のがん細胞は別個の受容体クローニングネチャーを有し得るので、免疫レパートリーのシーケンシングにより、血液がんの識別が可能になる。これはまた、元のがん細胞の受容体を追跡することによる血液がんに関する微小残存病変（MRD）研究にも拡張することができる。

【0260】

さらなる例示のために、図3は、本開示の一部の実施形態に従って、細胞外遊離核酸のシーケンシング（TMB解析を用いて）を同じ試料由来の免疫レパートリーのシーケンシングと組み合わせて実施する例示的な方法のステップを概略的に示すフローチャートを提示する。示されている通り、方法300は、試験試料（例えば、血液試料）を対象から得るステップを含む。試験試料を単離または抽出ステップに供して、細胞外遊離核酸を含む血漿画分およびリンパ球を含むバフィーコート画分を作製する。示されている実施形態では、血漿試料部分中のctDNAを、ctDNAにおける変異またはバリエーションを識別するプロセスの一部として、ProKに基づく抽出ステップに供する。必要に応じて、方法は、標的化パネルおよびメチル結合性ドメイン（MBD）分割ステップを含む。本明細書に開示される方法の実施における使用のために必要に応じて適合させるエピジェネティック修飾の解析に関する追加的な詳細は、例えば、参照により組み込まれる2017年12月22日出願のWO2018/119452に記載されている。示されている通り、ctDNA解析は、種々のライブラリー調製（末端修復、ライゲーション、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）増幅など）および富化ステップも含む。方法300は、ゲノムDNA（gDNA）抽出ステップ、ライブラリー調製ステップ（例えば、TCRバーコーディング、清浄化、マルチプレックスネステッドPCR、ならびにさらなる清浄化および定量ステップ）を含むTCRクローン型決定アッセイを含む。同じく示されている通り、例示的な方法300は、TCRクローン型決定アッセイに必要な応じて追加してまたはその代わりに、RNA抽出、逆転写および鋳型切り換え、ならびに清浄化ステップを種々のPCRおよび清浄化ステップと一緒に含む免疫受容体発見アッセイ／血液がん検出および微小残存病変（MRD）アッセイを含む。方法300の様々なアッセイの産物をプールし、シーケンシングを行い、本明細書に記載のバイオインフォマティクスパイプライン（BIP）によってさらに解析する。PCRステップを含めた試料調製方法のさらなる描写を、図4Aおよび4Bに、それぞれTCRクローン型決定アッセイおよび免疫受容体発見アッセイについて示す。

【0261】

さらなる例証のために、図5に、血液試料のバフィーコートおよび血漿部分の分析を含む方法500を概略的に示す。示されている通り、バフィーコート分析は、免疫レパートリーおよび他の免疫遺伝子をクローン性造血（例えば、未確定の潜在能をもつクローン性造血（clonal hematopoiesis of indeterminate potential））または「CHIP」）変異に関して評価することを含み、これは、本明細書に記載のバイオインフォマティクスパイプラインによってさらに評価される。アッセイは、T細胞受容体（TCR）およびB細胞受容体（BCR）のクローン型を評価すること、ならびにクローン性増大または新抗原受容体の評価を含む。試料の血漿部分に関しては、ctDNAライブラリーを、試料のバフィーコート試料割合から得られたCHIP関連情報を含む本明細書に記載のバイオインフォマティクスパイプラインを使用して評価する。血漿試料割合の評価の一部として、一塩基バリエーション（SNV）、マイクロサテライト不安定性（MSI）、および融合を評価して、TMBスコアを生成する。同じく示されている通り、新抗原オーファン受容体を識別するために、2つの示されているアッセイ経路間で収集したデータを使用して、変異を相関させることができる。同じく示されている通り、2つの示されているアッセイ経路の結果を使用して、可能性のある免疫療法に対する応答を識別するための改善されたスコアを生成することもできる。

【0262】

一部の実施形態では、例えば、バフィーコートを、標準のキット（例えば、Qiagenまたは他の供給者から市販されているもの）を使用したゲノムDNA単離、その後、2回のネステッドPCRに供して、CDR3などの高度可変領域の外側のTCRアルファおよびベータサブユニットを標的とするアンプリコンを富化させる。2回のPCRの2回目は、TCR gDNAを増幅させるだけでなく、シーケンシング用の部分的なアダプター（例えば、SP5およびSP7アダプター）を付加するプライマーを必要とする。これらの部分的なアダプターは、この例示的な実施形態の最終的な第3の「インデックス」PC

Rにおいて、所望のTCRアンプリコンに全長P5およびP7オリゴを付加し、それにより、例えば、Illuminaシーケンサーでシーケンシングを行うことができるライブラリーを作製するために利用する。

【実施例】

【0263】

(実施例1)

腫瘍割合が小さく、かつカバレッジが小さい試料におけるTMBスコアの調整

【0264】

既知の腫瘍割合が大きく、かつカバレッジが大きい患者試料の一定分量を、非腫瘍cfDNA（すなわち、正常なcfDNA）で3～4倍希釈して、腫瘍割合が小さく、かつカバレッジが小さい試料を実現した。希釈試料を、Guardant Health, Inc. (Redwood City, CA) によって開発された血液に基づくDNAアッセイを使用して処理し、分析した。バイオインフォマティクス解析によって変異カウント (mutation count) を推定し、TMB補正モデルを適用して、補正TMBスコアを決定した。希釈試料の観測変異カウント (mutation count)、最大 (max) MAFおよびカバレッジを入力パラメータとして提供した。このモデルにより、予測変異割合 (mutation fraction) (f)、予測変異割合 (mutation fraction) の95%信頼水準の上限 (f_{上限})、調整された変異カウントおよびTMBスコアを推定した。表3に示されている通り、モデルから報告された希釈試料のTMBスコア (1メガベースMb当たり23.5の変異 (mut)) は、元の腫瘍割合が大きい試料のTMBスコア (1Mb当たり23.2の変異) と非常に近い。図6に、TMB補正モデルを適用した (○) および適用していない (△) 希釈試料のTMBスコアプロットを示す。

【表3】

表 3

希釈した試料の入力パラメータ:	
観測変異カウント (mutation count)	12 mut
最大(max)MAF	1.03%
カバレッジ	1215
TMB 補正モデル出力	
f	0.39
f _{上限}	0.51
調整された変異カウント	12/0.51 = 23.5 mut
報告された TMB スコア (パネルは 1Mb である)	23.5 mut/Mb
希釈していない試料の「真の」TMB	
高腫瘍割合における TMB スコア	23.2 mut/Mb

【0265】

(実施例2)

6種の固形腫瘍型にわたるctDNAに基づく腫瘍遺伝子変異量のランドスケープおよびゲノム相関

【0266】

緒言

【0267】

腫瘍遺伝子変異量 (TMB) は、免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) による療法に対する応答の予想バイオマーカーである。現行のパネルに基づく TMB アルゴリズムでは、ある特定の型の体細胞バリエーション由来のシグナル (例えば、非同義コード SNV) を集める。多くの TMB-High 患者は ICI に応答しないので、追加的なバリエーション型および他のゲノム相関により TMB 算出を精密化することができるかどうかを調査した。さらに、血漿 TMB では、組織と比べて報告可能な TMB 結果の収量が改善されるが、低腫瘍 DNA 排出者 (shedder) における TMB が実際よりも小さく推定される。この実施例では、高感度 500 遺伝子 cfDNA シーケンシングプラットフォーム (大パネルアッセイ) での実施を利用して多数のがんの型の試料を数千試験することにより、追加的なゲノムの特色および低 DNA 排出についての調整を使用して、TMB アルゴリズムを改善する。

【0268】

方法

【0269】

変動する腫瘍シェディングレベルに対して頑強な cfDNA に基づく TMB アルゴリズムを開発した。肺、結腸直腸、および前立腺を含めた 6 種の固形腫瘍型にわたる 1,000 を超える血漿試料において cfDNA に基づく TMB を評価した。サイレント SNV およびインデルの TMB スコアに対する寄与を調査した。TMB 腫瘍型、患者民族性、および肺腫瘍分子亜型間の相関を調査した。最後に、TMB のランドスケープならびに追加的なゲノムの特色: サブクローン性、染色体不安定性、およびマイクロサテライト不安定性 (MSI) も調査した。大パネルアッセイに関する追加的な詳細を表 4 に提示する。さらに、本実施例において使用した TMB ワークフローを図 7 に概略的に示す。

【表 4】

表 4: 遺伝子 500 種の cfDNA シーケンシングプラットフォーム (大パネルアッセイ)

明細	大パネルアッセイ
遺伝子の数	500 種の遺伝子
総サイズ	2.145 Mb
最適な入力材料	血漿 ≥ 2 mL から 5~30 ng の cfDNA
体細胞バリエーション検出	小さなヌクレオチドバリエーション (SNV、496 種の遺伝子)、短い挿入/欠失 (インデル、496 種の遺伝子)、コピー数増幅 (106 種の遺伝子)、融合 (21 種の遺伝子)
腫瘍遺伝子変異量 (TMB)	TMB スコア (mut/Mb)
マイクロサテライト不安定性 (MSI)	MSI-High の状態
提出物	報告書 (csv)、デジタル BAM、VCF

【0270】

結果

【0271】

1. 大パネルアッセイの性能

【0272】

表5に、30ngのcfDNA入力に基づく大パネルアッセイの解析的検証性能および明細の要約を提示する。

【表5】

表 5

変更の型	報告可能な範囲	95%検出限界(LoD)	PPV**
SNV (496種の遺伝子)	$\geq 0.04\%$	0.15 - 0.6%*	98%
インデル (496種の遺伝子)	$\geq 0.1\%$	0.4 - 0.8%*	>99%
融合 (21種の遺伝子)	≥ 2 分子	0.1 - 0.2%	>99%
CNA (106種の遺伝子)	≥ 2.18 コピー	遺伝子の90%に対して2.18~2.9コピー —	>99%

*解析感度範囲は標的化領域の臨床的関連性に依存する。これらの領域外のまたは高度に反復される配列の状況での感度は変動し得る。

**試料1つ当たりの体細胞バリエーションの予測数に基づくバリエーション1つ当たりのPPV。

【0273】

体細胞／生殖細胞系列状態を、局所的生殖細胞系列変異対立遺伝子割合からの偏差のベータ二項統計学モデルを使用して決定した。これは、例えば、参照により組み込まれるNance et al. (2018) A novel approach to differentiate somatic vs. germline variants in liquid biopsies using a betabinomial model. AACR, Poster 4272にさらに記載されている。この方法は、共通生殖細胞系列変異（例えば、dbSNP）のデータベースに依拠するものではなかった。

【0274】

2. パネルに基づくTMBの構成物

【0275】

図8A、BおよびCは、非同義コードSNVと関連した変異型：コホートにわたって、非同義コードSNVと関連する（図8A）同義SNV、（図8B）インデル、および（図8C）イントロンSNV（ピアソンの $r=0.90$ 、 0.71 、 0.89 ）を示すプロットである。変異カウント（mutation count）の変動性（箱ひげ図）は、試料特異的変異率に基づく予測と一致した（黒い線：太い：中央値、細い：IQR）。

【0276】

3. 調整された血漿TMBは入力にほとんど依存しない

【0277】

図9A～9Dは、大パネルアッセイ腫瘍シェディング補正により、変異カウント (mutation count) の (図9A) 腫瘍シェディングおよび (図9B) 入力cfDNAへの依存が取り除かれ、その結果、これらの入力メトリクスにほとんど依存しない血漿腫瘍遺伝子変異量 (pTMB) がもたらされた (図9Cおよび9D) ことを示すプロットである。図9Aおよび9Bは、腫瘍シェディングのピンにわたる変異カウント (mutation count) 分布 (最大体細胞MAF (最大 (max) MAF) によって概算される) または入力体積 (分子カバレッジをもたらす) を示す。図9Cおよび9Dは、補正後の同じピンにわたるTMBスコアを示す。バイオリンプロットは中央値および四分位範囲 (IQR) を示す。黒い線は、中央値のトレンドを示す。

10

【0278】

4. 腫瘍型にわたるTMB

【0279】

図10Aおよび10Bは、コホートにわたる、および腫瘍型間のTMB分布を示すプロットである: (図10A) コホートにわたって、TMBスコアは尾の長い分布を有し、これは、組織に基づくTMBおよび血漿に基づくTMBにおける以前の観察と一致し、腫瘍型にわたる中央値は10mut/Mbであり、上位三分位数は14mut/Mbであった (黒い線)。図10Bは、TMB中央値が、以前の組織に基づく観察と一致する傾向で結腸直腸がん試料、肺がん試料、および前立腺がん試料の間で変動したことを示す。

20

【0280】

5. TMBは民族性に依存しない

【0281】

図11Aおよび11Bは、TMB中央値が民族性の間で変動しないことを示すプロットである。共通生殖細胞系列変異の主成分解析 (PCA) を使用して試料をクラスター化して、人種に基づくクラスターを定義した。人種が分かっている試料のセットを使用してクラスターにラベルを付ける (アジア人/太平洋諸島の住民: A; 黒人/アフリカ系アメリカ人: B、白人: W)。人種に基づくクラスターのそれぞれについて、腫瘍型を釣り合わせた試料23例をランダムに選択した。図11AはPCAクラスタリングを示し、図11BはTMBスコアを示す。いくつかの組織TMBパイプラインに反して、TMB中央値はクラスターにわたって一定であった (中央値のノンパラメトリックなサンプリングに基づく比較を使用して、A対W: $p = 0.78$ 、B対W: 0.77 、A対B: 0.99)。

30

【0282】

6. TMBと発がん性変異の相関

【0283】

図12は、肺試料におけるTMB (すなわち、血漿に基づくTMB (pTMB)) がドライバーの状態によって異なることを示すプロットである。肺試料の中で、TMB中央値は、全肺腫瘍 (12mut/Mb) と比較して、EGFRにより駆動された肺腫瘍およびALKにより駆動された肺腫瘍において低く (中央値8mut/Mb、中央値の同等性について $p < 0.01$)、KRASまたはPIK3CAホットスポット変異を有する腫瘍では高かった (14mut/Mb、 $p = 0.04$)。BRAFドライバーを有する肺腫瘍は、全肺腫瘍と同様のTMB中央値を有する (11mut/Mb、 $p = 0.25$)。STK11、KEAP1、またはPTENの機能喪失 (LOF) 変異は、ICI応答に関する推定上の負の予測因子である。TMB中央値はこれらの変異を有する腫瘍において全肺腫瘍よりもわずかに高く (15mut/Mb、 $p < 0.01$)、これにより、これらの後者の事象がTMBとは独立した臨床的バイオマーカーであり得ることが示唆される。

40

【0284】

7. TMBランドスケープは変動するクローン構造、染色体不安定性、およびMSIの状態を有する

50

【0285】

図13Aは、体細胞変異のクローン性および染色体不安定性がTMBランドスケープにわたって高度に変動したことを示すプロットである：コホートにおいて認められたTMBスコアの範囲にわたって、様々なサブクローン性変異割合（*m u t a t i o n f r a c t i o n*）が存在した。これは、TMBスコアによって順序付けられた、腫瘍型にわたってランダムに選択された試料100例によって例示され、黒色がクローン性変異（MAFは試料の最大（*m a x*）MAFの $\geq 10\%$ である）であり、薄い灰色がサブクローン性変異（試料の最大（*m a x*）MAFのMAF $< 10\%$ と定義される）である。サブクローン性であった全変異の割合が下の棒に示されている（黒色＝高度にクローン性；薄い灰色＝高度にサブクローン性）。サブクローン性割合はTMBスコアと関連しなかった。同様に、増幅が検出された遺伝子の数（*# C N V*：サブクローン性割合の下に示されている）または二倍体であるパネル空間の割合（二倍体割合：（*# C N V*）の下に示されている）のいずれかによって測定される染色体不安定性もTMBスコアと関連しない。図13Bは、TMB-High試料のサブセットにおいてMSI-Highが検出されたことを示す図である。

10

【0286】

結論

【0287】

パネルに基づくTMBスコアは、エキソーム全体にわたる変異負荷量のシグナルが強化されるように、同義および非コード変異に影響を及ぼし得る。より多くの患者転帰データが利用可能になるので、TMBアルゴリズムおよび腫瘍ゲノム免疫原性の別個の（*o r t h o g o n a l*）バイオマーカーは、患者の免疫療法に対する応答に関するガイダンスの改善のためにさらに進化する。大きなパネル空間を介してTMBに対して高感度でパネルのシーケンシングを行うこと、ならびにコピー数バリエーションおよびMSIの状態を検出できることがバイオマーカーの開発および臨床的適用に重要になる。

20

【0288】

（実施例3）

TMB補正モデルを使用した、腫瘍割合が小さく、かつカバレッジが小さい試料におけるTMBスコアの調整

【0289】

患者試料を、Guardant Health, Inc. (Redwood City, CA) により開発された血液に基づくDNAアッセイを使用して処理し、分析した。パイオインフォマティクス解析により、この試料において13種の体細胞変異が識別された。この実施形態では、SNVおよびインデルのみ体細胞変異の考慮に入れた。この実施形態では、13種の体細胞変異のうち、3種を観測変異カウント（*m u t a t i o n c o u n t*）から除外し、これは、これらの3種変異のうち2種は腫瘍に関連しない変異（例えば、クローン性造血変異）であり、他の変異はドライバー変異であったからである。試料の観測変異カウント（*m u t a t i o n c o u n t*）、最大（*m a x*）MAFおよびカバレッジをTMB補正モデルへの入力パラメータとして提供した。このモデルにより、予測変異割合（*m u t a t i o n f r a c t i o n*）（*f*）、予測変異割合（*m u t a t i o n f r a c t i o n*）の95%信頼水準の上限（*f*_{上限}）、調整された変異カウント（*m u t a t i o n c o u n t*）、およびTMBスコアを推定した。ここで、調整された変異カウント（*m u t a t i o n c o u n t*）をエキソーム較正因子と解析されるゲノム領域のサイズ（本実施例では約1Mb）の積で割って、TMBスコアを決定した。表6は、TMB補正モデルから報告されたTMBスコアを示す。

30

40

50

【表 6】

表 6

体細胞変異の概要	
最大(max)MAF	2.24%
総体細胞変異カウント(mutation count)	13
TMB にカウントされない変異	非腫瘍変異 2 つ ドライバー変異 1 つ
観測変異カウント(mutation count)	13-3 = 10
試料入力パラメータ	
観測変異カウント(mutation count)	10
最大(max)MAF	2.24%
カバレッジ	1980
TMB 補正モデル出力	
f	0.67
f _{上限}	0.91
調整された変異カウント	11.0 muts
報告された TMB スコア(パネルは 1Mb である)	11.0 muts/Mb

【0290】

(実施例 4)

TMB 補正モデルを使用した評価を受けていない試料 (腫瘍割合が小さい)

【0291】

患者試料を、Guardant Health, Inc. (Redwood City, CA) により開発された血液に基づく DNA アッセイを使用して処理し、分析した。バイオインフォマティクス解析により、この試料において 1 種の体細胞変異が識別された。この実施形態では、SNV およびインデルのみ体細胞変異の考慮に入れた。また、この試料の最大 (max) MAF は 0.1 % であることが決定された。この実施形態では、最大 (max) MAF を腫瘍割合とみなした。この試料の腫瘍割合は腫瘍割合カットオフを下回った。したがって、この試料に対しては TMB 補正モデルを使用した評価を行わなかった。この実施例に関するデータを表 7 にさらに要約する。

10

20

30

40

50

【表 7】

表 7

体細胞変異の概要:	
最大(max)MAF	0.1%
総体細胞変異カウント(mutation count)	1
TMB にカウントされない変異	なし
試料の未加工のパラメータ:	
TMB にカウントされる観測変異	1
最大(max)MAF	0.1%
カバレッジ	2487
モデル出力	
不十分な腫瘍割合: TMB 評価不可能	

10

20

【0292】

前述の開示は、明瞭さおよび理解のために実例としておよび例として一部の詳細が記載されているが、本開示を読めば、形態および詳細の種々の変化を本開示の真の範囲から逸脱することなく行うことができ、また、添付の特許請求の範囲内で実施することができることが当業者には明らかになる。例えば、方法、システム、コンピューター可読媒体、および／または構成要素の特色、ステップ、要素、またはそれらの他の態様は全て種々の組合せで使用することができる。

【0293】

本明細書において引用されている特許、特許出願、ウェブサイト、他の刊行物または文書、受託番号などは全て、各個別の項目が参照により組み込まれることが具体的にかつ個別に示されたものと同じく、あらゆる目的に関してその全体が参照により組み込まれる。異なるバージョンの配列が違う時間に受託番号に関連付けられている場合、本出願の有効な出願日に受託番号に関連付けられたバージョンが意図される。有効な出願日とは、実際の出願日より前または該当する場合には受託番号を参照する優先出願の出願日を意味する。同様に、異なるバージョンの刊行物、ウェブサイトなどが違う時間に公開されている場合、別段の指定のない限り、本出願の有効な出願日のごく最近に公開されたバージョンが意図される。

30

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目 1)

対象における腫瘍遺伝子変異量 (TMB) を決定する方法であって、

40

(a) 前記対象由来の試料中の 1 つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、

(b) 前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、

(c) 前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、

(d) 前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、前記対象における前記 TMB を決定するステップとを含む方法。

(項目 2)

50

対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定する方法であって、

- （a）前記対象由来の試料を提供するステップと、
 - （b）前記試料中の核酸を増幅させて、増幅した核酸を生成するステップと、
 - （c）前記増幅した核酸のシーケンシングを行って、配列情報を生成するステップと、
 - （d）前記配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、
 - （e）前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、
 - （f）前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、
 - （g）前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、前記対象における前記TMBを決定するステップと
- を含む方法。

10

（項目3）

対象におけるがんを処置するために1つまたは複数のカスタマイズされた療法を選択する方法であって、

- （a）前記対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、
 - （b）前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、
 - （c）前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、
 - （d）前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、
 - （e）前記調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較して、前記対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップと
- を含む方法。

20

（項目4）

対象におけるがんを処置する方法であって、

- （a）前記対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、
 - （b）前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、
 - （c）前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、
 - （d）前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、
 - （e）前記調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較して、前記対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップと、
 - （f）前記調整された結果と前記比較用結果が実質的にマッチする場合に、識別されたカスタマイズされた療法の少なくとも1つを前記対象に施行して、それにより、前記対象におけるがんを処置するステップと
- を含む方法。

30

40

（項目5）

対象におけるがんを処置する方法であって、1つまたは複数のカスタマイズされた療法を前記対象に施行し、それにより、前記対象におけるがんを処置することを含み、前記カスタマイズされた療法が、

- （a）前記対象由来の試料中の1つまたは複数の核酸から得られた配列情報から観測変異カウントを決定するステップと、

50

(b) 前記核酸の腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、

(c) 前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、

(d) 前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成するステップと、

(e) 前記調整された結果を、1つまたは複数の療法を指し示す1つまたは複数の比較用結果と比較するステップと、

(f) 前記調整された結果と前記比較用結果が実質的にマッチする場合に、前記対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップと
によって識別されたものである、方法。

10

(項目6)

前記観測変異カウントおよび／または前記腫瘍割合が、前記核酸において識別される複数の同義変異、複数の非同義変異、および／または複数の非コード変異を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目7)

前記観測変異カウントおよび／または前記腫瘍割合が、一塩基バリエーション(SNV)、挿入または欠失(インデル)、コピー数バリエーション(CNV)、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復伸長、およびエピジェネティックバリエーションからなる群から選択される複数の変異を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目8)

前記観測変異カウントおよび／または前記腫瘍割合から、ドライバー変異および／またはクローン性造血由来変異が除外される、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目9)

前記観測変異カウントを決定するために、所与の一塩基バリエーション(SNV)または所与の挿入もしくは欠失(インデル)に関して検出限界を下回る1つまたは複数の可能性のある変異のプールされたエビデンスを使用することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目10)

前記予測変異割合を実際の変異カウントの観測割合として使用することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目11)

前記観測変異カウントおよび／または前記腫瘍割合が、前記核酸において識別される複数の体細胞変異を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記観測変異カウントから1つまたは複数の既知のがんドライバーおよび／またはパッセンジャー変異が除外される、項目11に記載の方法。

(項目13)

前記配列情報を1つまたは複数の参照配列と比較して、前記観測変異カウントを識別することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目14)

前記参照配列が、hg19および／またはhg38の少なくとも部分配列を含む、項目13に記載の方法。

(項目15)

前記腫瘍割合が、前記核酸において識別される全ての体細胞変異の最大変異対立遺伝子割合(MAF)を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記腫瘍割合が、前記試料中の全ての核酸の約0.05%未満、約0.1%未満、約0.2%未満、約0.5%未満、約1%未満、約2%未満、約3%未満、約4%未満、または約5%未満である、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 17)

前記カバレッジを決定するために、前記核酸における所与のヌクレオチド位を含む複数の独特の cfDNA 断片を識別することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 18)

前記カバレッジを決定するために、前記核酸における所与のヌクレオチド位を構成する独特の細胞外遊離 DNA (cfDNA) 分子の数の中央値を識別することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 19)

前記カバレッジが、前記試料中に存在する前記核酸における所与のヌクレオチド位において 10 個から 50,000 個の間の cfDNA 断片である、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 20)

前記予測変異割合および／または前記予測変異割合の前記予測分布が、前記変異割合に関して約 95% またはそれよりも大きな信頼区間を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 21)

前記予測変異割合の 95% 信頼区間の上限を使用して、前記観測変異カウントの下限を生成することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 22)

所与の変異対立遺伝子割合 (MAF) における変異が予測 MAF の分布にわたって識別される確率を算出して、前記予測変異割合を決定することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 23)

予測相対的 MAF の分布に前記腫瘍割合を掛けて、MAF を生成することを含む、項目 22 に記載の方法。

(項目 24)

予測 MAF の前記分布が、以下の二項比率の信頼区間を使用して算出される、項目 22 または 23 に記載の方法：

【数 5】

$$f_{\text{上限}} = f + z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})} \quad \text{および}$$

$$f_{\text{下限}} = f - z * \sqrt{(f * (1 - f) / n_{\text{真}})},$$

30

(式中、f は、コールされる変異の予測割合であり、n_真 は、予測される実際の変異であり、これは f を考慮して観測される変異の数と等しく、z は信頼水準である)。

(項目 25)

f が閾値 $f_{\text{閾}}$ 未満の場合、TMB は決定されない、項目 24 に記載の方法。

(項目 26)

f が閾値 $f_{\text{閾}}$ を超える場合、TMB が決定される、項目 24 に記載の方法。

40

(項目 27)

以下の方程式：

観測された変異の割合 = $\sum_{MAF} (P(\text{変異のコール} | MAF) \times P(MAF \text{ における変異}))$

(式中、P は確率であり、MAF は変異対立遺伝子割合である)

を使用して前記予測結果を決定することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 28)

相対的 MAF の予測分布が、対照試料データセットの 1 つまたは複数のデータセットから得られる、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 2 9)

前記対照試料データセットが、少なくとも約 2 5、少なくとも約 5 0、少なくとも約 1 0 0、少なくとも約 2 0 0、少なくとも約 3 0 0、少なくとも約 4 0 0、少なくとも約 5 0 0、少なくとも約 6 0 0、少なくとも約 7 0 0、少なくとも約 8 0 0、少なくとも約 9 0 0、少なくとも約 1, 0 0 0、少なくとも約 5, 0 0 0、少なくとも約 1 0, 0 0 0、少なくとも約 1 5, 0 0 0、少なくとも約 2 0, 0 0 0、少なくとも約 2 5, 0 0 0、少なくとも約 3 0, 0 0 0、またはそれよりも多くの対照試料を含む、項目 2 8 に記載の方法。

(項目 3 0)

前記対照試料データセットにおいて観測される最大 (max) MAF が、約 0. 5 %、約 1 %、約 2 %、約 5 % または約 1 0 % を構成する、項目 2 8 または 2 9 に記載の方法。

10

(項目 3 1)

前記相対的 MAF を、以下の方程式：

$$F = 1 / (1 + (P_{50} / \text{相対的} - \text{MAF})^n)$$

(式中、F は、累積分布関数であり、P₅₀ は、相対的 MAF の中央値であり、相対的 - MAF は相対的 MAF であり、n は、相対的な分布の形状を当てはめるための指数である)

を使用して曲線に当てはめることを含む、項目 2 8 から 3 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 2)

20

前記試料における前記観測変異カウントを予測変異割合または前記予測変異割合の信頼区間の上限／下限で割って、前記調整された結果を生成することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 3)

前記調整された結果が、変異対立遺伝子割合の範囲にわたって前記核酸において検出される複数の変異を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 4)

前記観測変異カウントを前記予測結果で割って、前記調整された結果を生成することを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 5)

30

前記調整された結果が、可能性が最も高い実際の変異カウントの予想を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 6)

前記調整された結果が、可能性が最も低い実際の変異カウントの予想を含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 7)

前記調整された結果が、調整された変異カウントを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記調整された変異カウントが、前記観測変異カウントよりも大きいかまたはそれと等しい、項目 3 7 に記載の方法。

40

(項目 3 9)

前記対象由来の前記試料中の前記核酸から前記配列情報を得ることを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 0)

前記配列情報を、前記核酸の標的とされるセグメントから得る、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

標的とされるセグメントが、約 1 から約 1 0 0, 0 0 0 の間の異なるおおよび／または重複するゲノム領域を含む、項目 3 9 または 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

50

前記対象由来の前記試料を得ることを含む、前記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記試料が、組織、血液、血漿、血清、喀痰、尿、精液、膿液、糞便、滑液、脊髄液、および唾液からなる群から選択される、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記試料が、組織を含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記試料が、血液、血漿、および／または血清を含む、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記対象が、哺乳動物対象である、項目 4 2 から 4 5 までのいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 4 7)

前記哺乳動物対象が、ヒト対象である、項目 4 6 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記核酸が、細胞外遊離核酸を含む、項目 4 2 から 4 7 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 9)

前記核酸が、細胞内核酸を含む、項目 4 2 から 4 8 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 0)

前記核酸が、循環腫瘍核酸を含む、項目 4 2 から 4 9 までのいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 5 1)

前記核酸を循環腫瘍細胞から得る、項目 4 2 から 5 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 2)

前記核酸が、デオキシリボ核酸 (DNA) および／またはリボ核酸 (RNA) を含む、項目 4 2 から 5 1 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記試料中の前記核酸の少なくとも 1 つのセグメントを増幅させて、少なくとも 1 つの増幅した核酸を生成することを含む、項目 4 2 から 5 2 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

前記増幅した核酸のシーケンシングを行って、前記配列情報を生成することを含む、項目 5 3 に記載の方法。

30

(項目 5 5)

前記核酸の少なくとも約 50,000、約 100,000、約 150,000、約 200,000、約 250,000、約 500,000、約 750,000、約 1,000,000、約 1,500,000、約 2,000,000 ヌクレオチド、またはそれよりも多くのヌクレオチドのシーケンシングを行って、前記配列情報を生成することを含む、項目 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記シーケンシングが、標的化シーケンシング、イントロンシーケンシング、エキソームシーケンシング、および全ゲノムシーケンシングからなる群から選択される、項目 5 4 または 5 5 に記載の方法。

40

(項目 5 7)

前記カスタマイズされた療法が、少なくとも 1 つの免疫療法を含む、項目 3 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 8)

前記免疫療法が、少なくとも 1 つのチェックポイント阻害抗体を含む、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記免疫療法が、PD-1、PD-2、PD-L1、PD-L2、CTLA-40、OX40、B7.1、B7He、LAG3、CD137、KIR、CCR5、CD27、または CD40 に対する抗体を含む、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

50

(項目 6 0)

前記免疫療法が、少なくとも1つの腫瘍型に対する炎症促進性サイトカインの投与を含む、項目 5 7 から 5 9 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 1)

前記免疫療法が、少なくとも1つの腫瘍型に対するT細胞の投与を含む、項目 5 7 から 6 0 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 2)

前記がんが、胆道がん、膀胱がん、移行上皮癌、尿路上皮癌、脳がん、神経膠腫、星状細胞腫、乳癌、化生性癌、子宮頸がん、子宮頸部扁平上皮癌、直腸がん、結腸直腸癌、結腸がん、遺伝性非ポリポーシス大腸がん、結腸直腸腺癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮内膜癌、子宮内膜間質肉腫、食道がん、食道扁平上皮癌、食道腺癌、眼内黒色腫、ぶどう膜黒色腫、胆嚢癌、胆嚢腺癌、腎細胞癌、腎明細胞癌、移行上皮癌、尿路上皮癌、ウィルムス腫瘍、白血病、急性リンパ性白血病（ALL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、慢性骨髄性白血病（CML）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、肝がん、肝癌、ヘパトーマ、肝細胞癌、胆管細胞癌、肝芽腫、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、中皮腫、B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫／白血病、末梢性T細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、上咽頭癌（NPC）、神経芽細胞腫、中咽頭がん、口腔扁平上皮癌、骨肉腫、卵巣癌、膵がん、膵管腺癌、偽乳頭状新生物、腺房細胞癌、前立腺がん、前立腺腺癌、皮膚がん、黒色腫、悪性黒色腫、皮膚黒色腫、小腸癌、胃がん、胃癌、消化管間質腫瘍（GIST）、子宮がん、および子宮肉腫からなる群から選択される少なくとも1つの腫瘍型を含む、項目 3 から 5 までのいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

前記配列情報が、核酸シーケンサーによって生成された前記核酸の配列読み取りを含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6 4)

前記核酸シーケンサーにより前記核酸に対してパイロシーケンシング、単一分子シーケンシング、ナノポアシーケンシング、半導体シーケンシング、合成によるシーケンシング、ライゲーションによるシーケンシングまたはハイブリダイゼーションによるシーケンシングを実施して、シーケンシング読み取りを生成する、項目 6 3 に記載の方法。

(項目 6 5)

シーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプトームから1つまたは複数の領域を選択的に富化させるステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6 6)

選択的に富化された領域をシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含む、項目 6 5 に記載の方法。

(項目 6 7)

前記配列情報を前記核酸の標的とされるセグメントから得て、前記標的とされるセグメントをシーケンシングの前にゲノムまたはトランスクリプトームから1つまたは複数の領域を選択的に富化させることによって得る、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 6 8)

得られた標的とされるセグメントをシーケンシングの前に増幅させるステップをさらに含む、項目 6 7 に記載の方法。

(項目 6 9)

シーケンシングの前に、分子バーコードを含む1つまたは複数のアダプターを前記核酸に付着させるステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 7 0)

前記核酸を一意的にタグ付けする、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 1)

10

20

30

40

50

前記核酸を非一意的にタグ付けする、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 2)

前記アダプターが、2 から 1 , 0 0 0 , 0 0 0 の間の分子バーコードを含む、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 3)

分子バーコードを含むアダプターを核酸の各末端にランダムに付着させることを含む、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 4)

前記アダプターを前記核酸に平滑末端ライゲーションまたは粘着末端ライゲーションによって付着させる、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 5)

前記アダプターが、T 尾部を有するおよび／または C 尾部を有するアダプターである、項目 6 9 に記載の方法。

(項目 7 6)

配列読み取りを配列読み取りのファミリーに群分けするステップをさらに含み、各ファミリーが、前記試料中の核酸から生成された配列読み取りを含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 7 7)

前記方法の少なくとも一部が、コンピューターにより実行される、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 7 8)

1 つまたは複数の T M B スコアを提示する電子形式の報告書を作成するステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 7 9)

前記試料を T M B - H i g h 試料に分類するステップをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の方法。

(項目 8 0)

前記変異カウントを、表 2 に列挙されている遺伝子を含む遺伝子またはゲノム領域のセットの中で決定する、前記方法項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 1)

がんを有するか、または有する疑いがある対象由来の細胞外遊離核酸分子の試料を特徴付ける方法であって、

前記試料に対してアッセイを実施して、表 2 に列挙されているものから選択される少なくとも 1 0 0 種、2 0 0 種、3 0 0 種、4 0 0 種、または 5 0 0 種の遺伝子またはゲノム領域に遺伝的バリエーションが存在するかどうかを決定するステップを含む方法。

(項目 8 2)

前記アッセイを 1 , 0 0 0 種以下の遺伝子に対して実施する、項目 1 3 9 に記載の方法。

(項目 8 3)

アッセイされた遺伝子のうちの少なくとも 1 種に遺伝的バリエーションの存在が決定された対象にがん処置を施行するステップをさらに含む、項目 1 3 9 に記載の方法。

(項目 8 4)

前記試料から核酸分子を単離し、前記少なくとも 1 0 0 種、2 0 0 種、3 0 0 種、4 0 0 種、または 5 0 0 種の遺伝子に対応する核酸分子を、前記少なくとも 1 0 0 種、2 0 0 種、3 0 0 種、4 0 0 種、または 5 0 0 種の遺伝子由来のセグメントを含有するプローブを用いて富化させるステップをさらに含む、項目 1 3 9 に記載の方法。

(項目 8 5)

がんを有するか、またはがんを有する疑いがある対象由来の細胞外遊離 D N A の試料を解析するための方法であって、

表 2 に列挙されている遺伝子からなる群から少なくとも 1 0 0 種、2 0 0 種、3 0 0 種

10

20

30

40

50

、400種、または500種のゲノム領域を選択的に富化させて、富化されたライブラリーを生成するステップと、

前記富化されたライブラリーを増幅させ、シーケンシング反応を実施するステップと、
前記ゲノム領域における遺伝子バリエーションの存在について解析するステップと
を含む方法。

(項目86)

少なくとも部分的にコンピューターを使用して新抗原オーファン免疫受容体情報を生成する方法であって、

(a) がんと診断された対象から得た血液試料中の核酸から得られた配列情報をコンピューターにより受け取るステップであって、前記配列情報の少なくとも第1の部分が、前記血液試料中の細胞外遊離核酸(c f N A)から得られたシーケンシング読み取りを含み、前記配列情報の少なくとも第2の部分が、前記血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップと、

(b) 前記配列情報の少なくとも前記第1の部分から前記対象の腫瘍遺伝子変異量(T M B)スコアを決定するステップと、

(c) 前記配列情報の少なくとも前記第2の部分における免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別するステップと、

(d) 前記T M Bスコアと前記1つまたは複数のクローン型を相関させて、前記対象における1つまたは複数の新抗原オーファン免疫受容体を識別し、それにより、前記新抗原オーファン免疫受容体情報を生成するステップと
を含む方法。

(項目87)

前記新抗原オーファン免疫受容体情報を使用して前記対象に対する1つまたは複数のカスタマイズされた療法を識別するステップをさらに含む、項目86に記載の方法。

(項目88)

前記1つまたは複数のカスタマイズされた療法を前記対象に施行するステップをさらに含む、項目87に記載の方法。

(項目89)

前記配列情報の前記第1の部分における1つまたは複数のバリエーションを識別して、前記T M Bスコアを決定することを含み、前記バリエーションが、一塩基バリエーション(S N V)、挿入または欠失(インデル)、コピー数バリエーション(C N V)、融合、塩基転換、転座、フレームシフト、重複、反復バリエーション、およびエピジェネティックバリエーションからなる群から選択される1つまたは複数の変異を含む、項目86に記載の方法。

(項目90)

前記反復バリエーションが、1つまたは複数のマイクロサテライトバリエーションを含む、項目89に記載の方法。

(項目91)

前記配列情報の前記第2の部分における1つまたは複数の他のバリエーションを識別して、前記T M Bスコアを決定するステップをさらに含む、前記他のバリエーションが、前記血液試料中の前記1つまたは複数の免疫細胞に由来する前記核酸における1つまたは複数の体細胞変異を含む、項目89に記載の方法。

(項目92)

がんと診断された対象由来の血液試料中の多数の解析物を解析する方法であって、

(a) 前記血液試料中の細胞外遊離核酸(c f N A)の第1のセットおよび前記血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞由来の核酸の第2のセットを単離するステップと、

(b) T細胞受容体のアルファおよび／またはベータサブユニットの少なくとも一部をコードする核酸の前記第2のセットの1つまたは複数の領域を増幅させて、富化された核酸の第2のセットを生成するステップと、

(c) c f N Aの前記第1のセットの1つまたは複数の領域および前記富化された核酸の第2のセットの1つまたは複数の領域のシーケンシングを行って、配列情報を作製する

10

20

30

40

50

ステップと、

（d）前記配列情報から前記対象の腫瘍遺伝子変異量（TMB）スコアを決定するステップと、

（e）前記配列情報から免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別するステップと、

（f）前記TMBスコアと前記1つまたは複数のクローン型を相関させて、前記対象における1つまたは複数の新抗原オフン免疫受容体を識別し、それにより、がんと診断された前記対象由来の前記血液試料中の前記多数の解析物を解析するステップを含む方法。

（項目93）

少なくとも部分的にコンピューターを使用して対象由来の血液試料中の核酸を解析する方法であって、

（a）前記対象由来の前記血液試料中の前記核酸から得られた配列情報をコンピューターによって受け取るステップであって、前記配列情報の少なくとも第1の部分が、前記血液試料中の細胞外遊離核酸（cfNA）から得られたシーケンシング読み取りを含み、前記配列情報の少なくとも第2の部分が、前記血液試料中の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップと、

（b）前記配列情報の前記第1の部分における1つまたは複数のバリエーションおよび前記配列情報の前記第2の部分における免疫レパートリーの1つまたは複数のクローン型を識別し、それにより、前記対象由来の前記血液試料中の前記核酸を解析するステップを含む方法。

（項目94）

（i）前記配列情報の前記第1の部分における観測変異カウントを決定するステップと、

（ii）前記配列情報の前記第1の部分における少なくとも前記cfNAの腫瘍割合および／またはカバレッジを決定して、シーケンシングパラメータを生成するステップと、

（iii）前記シーケンシングパラメータを考慮して予測変異割合および／または前記予測変異割合の予測分布を決定して、予測結果を生成するステップと、

（iv）前記予測結果を考慮して前記観測変異カウントを調整して、調整された結果を生成し、それにより、前記対象における腫瘍遺伝子変異量（TMB）を決定するステップを含む、項目93に記載の方法。

（項目95）

（i）前記配列情報の前記第1の部分および／または第2の部分に由来する複数の反復性核酸遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、前記複数の反復性核酸遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、前記配列情報が、反復性核酸遺伝子座の集団を含む、ステップと

（ii）所与の反復性核酸遺伝子座の部位スコアが前記所与の反復性核酸遺伝子座についての部位特異的訓練閾値を超える場合、前記所与の反復性核酸遺伝子座を不安定であるとコールして、前記複数の反復性核酸遺伝子座由来の複数の不安定な反復性核酸遺伝子座を含む反復性核酸不安定性スコアを生成するステップと、

（iii）前記反復性核酸不安定性スコアが前記血液試料中の反復性核酸遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、前記血液試料の反復性核酸不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、前記血液試料の前記反復性核酸不安定性の状態を決定するステップと

を含む、項目93に記載の方法。

（項目96）

（i）前記配列情報の前記第1の部分および／または第2の部分由来の複数の反復性デオキシリボ核酸（DNA）遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、前記複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、前記配列情報が、反復性DNA遺伝子座の集団を含む、ステップと、

（ii）前記複数の反復性DNA遺伝子座のそれぞれについて、所与の反復性DNA遺

10

20

30

40

50

伝子座の部位スコアを前記所与の反復性DNA遺伝子座についての部位特異的訓練閾値と比較するステップと、

(iii) 前記所与の反復性DNA遺伝子座の前記部位スコアが前記所与の反復性DNA遺伝子座についての前記部位特異的訓練閾値を超える場合、前記所与の反復性DNA遺伝子座を不安定であるとコールして、前記複数の反復性DNA遺伝子座由来の複数の不安定な反復性DNA遺伝子座を含む反復性DNA不安定性スコアを生成するステップと、

(iv) 前記反復性DNA不安定性スコアが前記血液試料中の反復性DNA遺伝子座の集団についての集団訓練閾値を超える場合、前記血液試料の反復性DNA不安定性の状態を不安定であると分類し、それにより、前記血液試料の前記反復性DNA不安定性の状態を決定するステップと

を含む、項目93に記載の方法。

(項目97)

(i) 前記配列情報の前記第1の部分および／または第2の部分由来の複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれに存在する複数の異なる反復長を定量して、前記複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれについての部位スコアを生成するステップであって、前記配列情報が、マイクロサテライト遺伝子座の集団を含む、ステップと、

(ii) 前記複数のマイクロサテライト遺伝子座のそれぞれについて、所与のマイクロサテライト遺伝子座の部位スコアを前記所与のマイクロサテライト遺伝子座についての部位特異的訓練閾値と比較するステップと、

(iii) 前記所与のマイクロサテライト遺伝子座の前記部位スコアが前記所与のマイクロサテライト遺伝子座についての前記部位特異的訓練閾値を超える場合、前記所与のマイクロサテライト遺伝子座を不安定であるとコールして、前記複数のマイクロサテライト遺伝子座由来の複数の不安定なマイクロサテライト遺伝子座を含むマイクロサテライト不安定性スコアを生成するステップと、

(iv) 前記マイクロサテライト不安定性スコアが前記血液試料中のマイクロサテライト遺伝子座の前記集団についての集団訓練閾値を超える場合、前記血液試料のマイクロサテライト不安定性(MSI)の状態を不安定であると分類し、それにより、前記血液試料の前記MSIの状態を決定するステップと

を含む、項目93に記載の方法。

(項目98)

配列可変標的領域セットとエピジェネティック標的領域セットとを含む、細胞外遊離DNA(cfDNA)の標的領域の複数のセットを捕捉することを含み、それにより、捕捉されたcfDNA分子のセットが生じ、前記配列可変標的領域セットに対応するcfDNA分子が、前記エピジェネティック標的領域セットに対応するcfDNA分子よりも高い捕捉収率で前記捕捉されたcfDNA分子のセット内に捕捉される、項目93に記載の方法。

(項目99)

前記cfDNAが、細胞外遊離DNA(cfDNA)を含む、項目93に記載の方法。

(項目100)

前記血液試料中の前記1つまたは複数の免疫細胞に由来する前記核酸が、mRNAおよび／またはgDNAを含む、項目93に記載の方法。

(項目101)

前記血液試料中の前記1つまたは複数の免疫細胞に由来する前記核酸が、抗体、B細胞受容体、およびT細胞受容体からなる群から選択される免疫学的ポリペプチドの少なくとも一部をコードする、項目93に記載の方法。

(項目102)

前記cfDNAを前記血液試料の血漿画分または血清画分から得ることを含む、項目93に記載の方法。

(項目103)

前記血液試料のバフィーコート画分由来の1つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸を

10

20

30

40

50

得ることを含む、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

通信ネットワークを通じて対象由来の試料中の 1 つまたは複数の核酸からシーケンシング情報を得る通信インターフェースと、

前記通信インターフェースと通信するコンピューターであって、少なくとも 1 つのコンピュータープロセッサと、少なくとも 1 つのコンピュータープロセッサによって実行されると、

(i) がんと診断された対象から得た血液試料中の核酸から得られた配列情報を受け取るステップであって、前記配列情報の少なくとも第 1 の部分が、前記血液試料中の細胞外遊離核酸 (c f N A) から得られたシーケンシング読み取りを含み、前記配列情報の少なくとも第 2 の部分が、前記血液試料中の 1 つまたは複数の免疫細胞に由来する核酸から得られたシーケンシング読み取りを含む、ステップと、

(i i) 前記配列情報の少なくとも前記第 1 の部分から前記対象の腫瘍遺伝子変異量 (T M B) スコアを決定するステップと、

(i i i) 前記配列情報の少なくとも前記第 2 の部分における免疫レパトリの 1 つまたは複数のクローン型を識別するステップと、

(i v) 前記 T M B スコアと前記 1 つまたは複数のクローン型を相関させて、前記対象における 1 つまたは複数の新抗原オーファン免疫受容体を識別するステップとを含む方法を実行する、機械により実行可能なコードを含むコンピューター可読媒体とを含む、コンピューターとを含むシステム。

【図面】

【図 1】

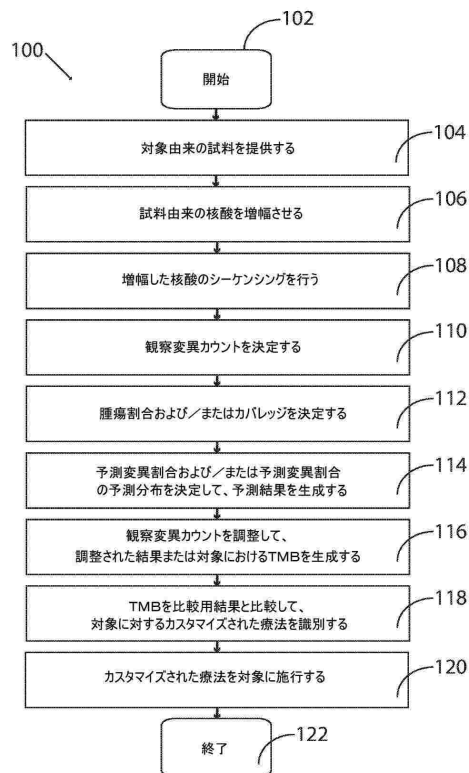


FIGURE 1

【図 2】

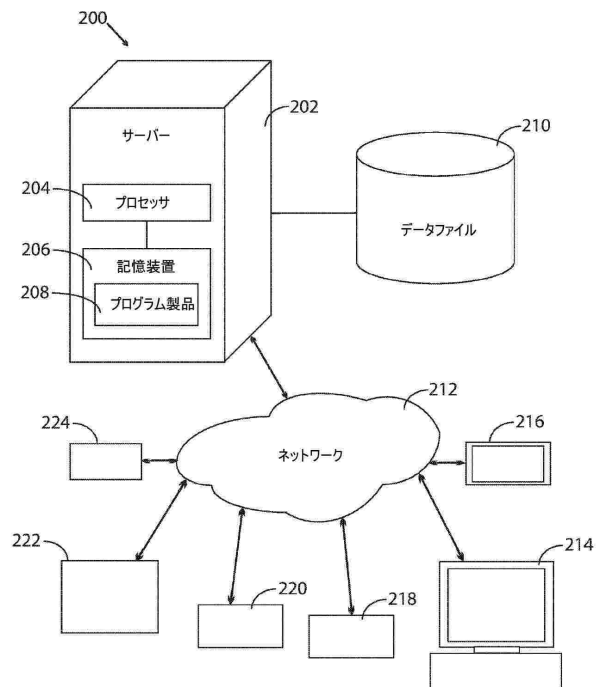


FIGURE 2

10

20

30

40

50

【図 3】

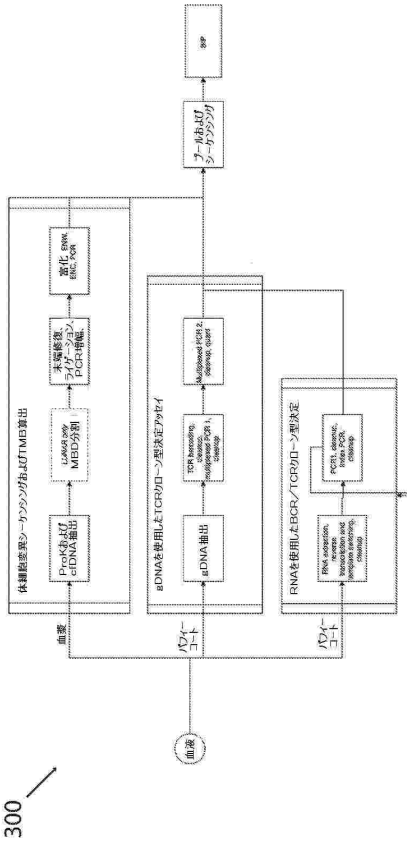


FIGURE 3

【図 4】

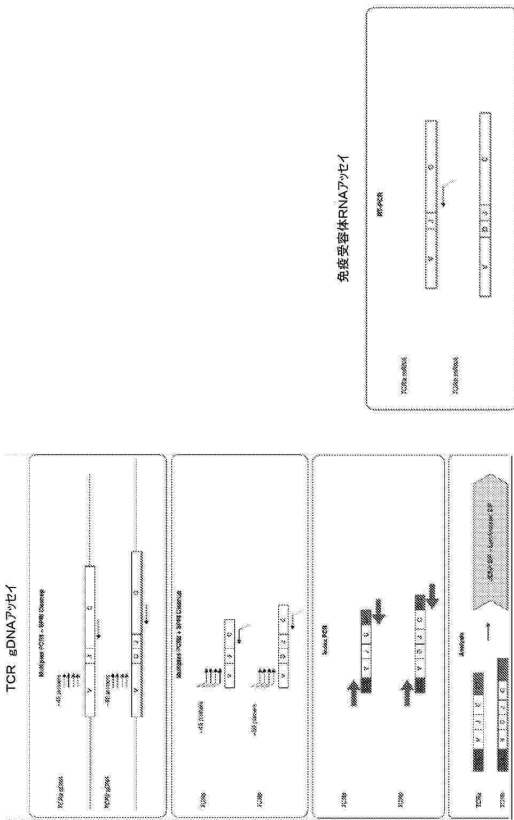


FIGURE 4B

FIGURE 4A

【図 5】

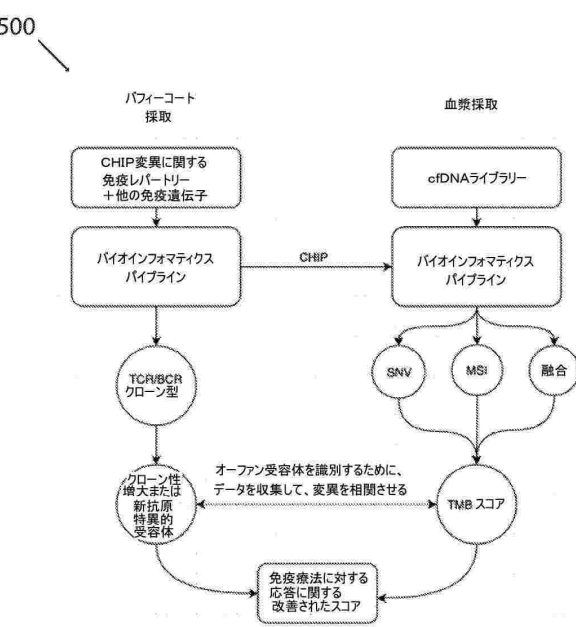


FIGURE 5

【図 6】

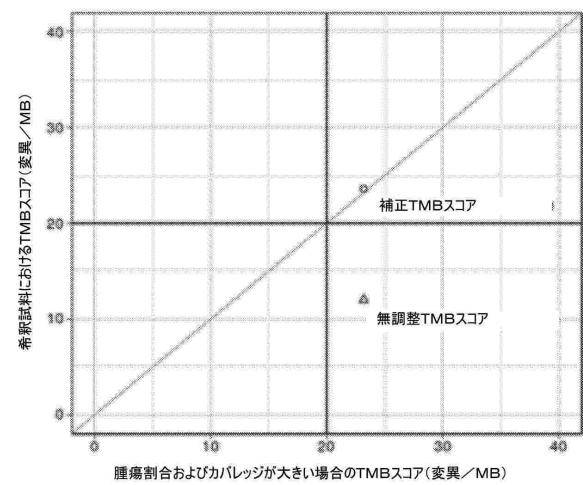


FIGURE 6

300

500

10

20

30

40

50

【図 7】

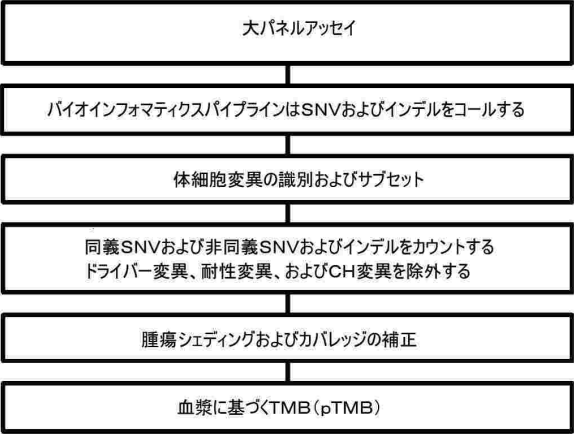


FIGURE 7

【図 8】

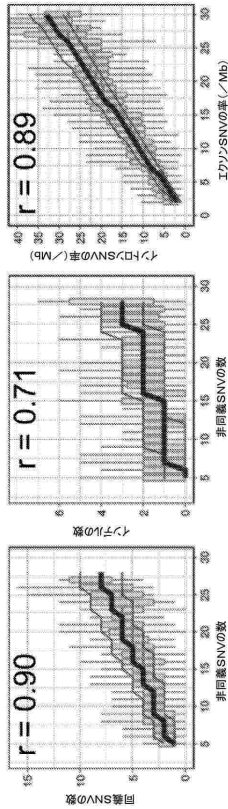


FIGURE 8A

FIGURE 8B

FIGURE 8C

【図 9】

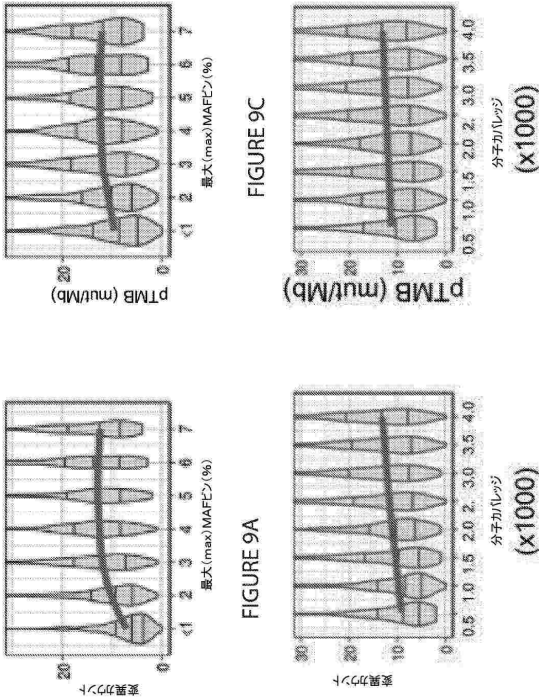


FIGURE 9B

FIGURE 9D

【図 10】

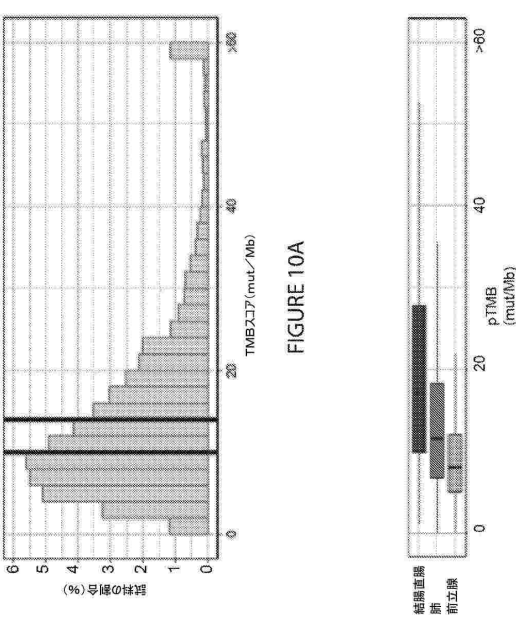


FIGURE 10A

FIGURE 10B

10

20

30

40

50

【図 1 1】

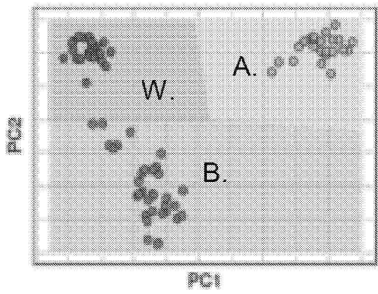


FIGURE 11A

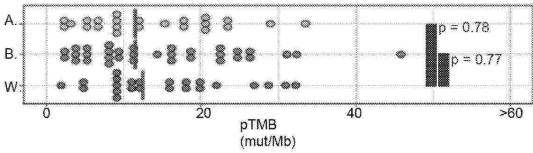


FIGURE 11B

【図 1 2】

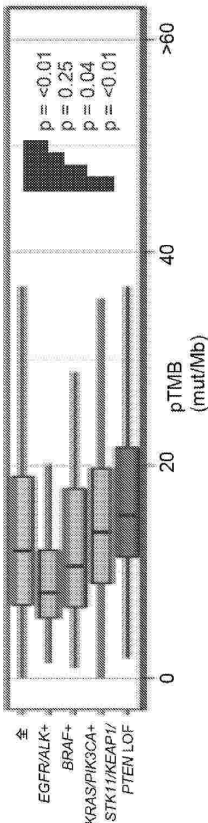


FIGURE 12

【図 1 3】

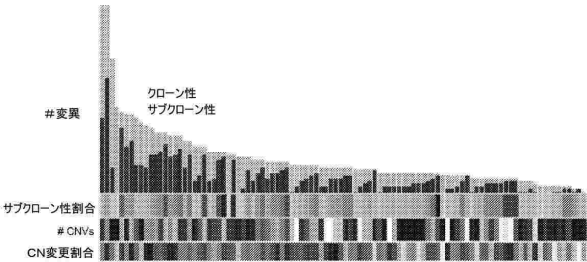


FIGURE 13A

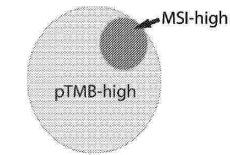


FIGURE 13B

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/09 (2010.01)

F I

C 1 2 N 5/09

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/782,894

(32)優先日 平成30年12月20日(2018.12.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/824,246

(32)優先日 平成31年3月26日(2019.3.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

弁護士 山本 健策

(72)発明者 クイン, ケイティ ジュリア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 ヘルマン, エレナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 チュドヴァ, ダーリヤ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 エルトーキー, ヘルミー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 オーデガード, ジャスティン アイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 フェアクロー, スティーブン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 シャム, エリーン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

(72)発明者 ジャイモビッチ, アリエル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 3, レッドウッド シティ, ペノブスコット ドライブ
5 0 5

審査官 藤山 純

(56)参考文献 特表2018-512048 (JP, A)

特表2018-507682 (JP, A)

米国特許出願公開第2014/0296081 (US, A1)

米国特許出願公開第2003/0219765 (US, A1)

米国特許出願公開第2005/0282196 (US, A1)

国際公開第2017/151524 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1/00- 3/00

C 1 2 N 5/09

G 1 6 B 20/20

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
P u b M e d