

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第 1 部門第 1 区分  
 【発行日】令和 1 年 8 月 29 日 (2019.8.29)

【公表番号】特表 2018-514219 (P2018-514219A)  
 【公表日】平成 30 年 6 月 7 日 (2018.6.7)  
 【年通号数】公開・登録公報 2018-021  
 【出願番号】特願 2017-557142 (P2017-557142)  
 【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/68 (2018.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/68 A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】  
 【提出日】令和 1 年 7 月 17 日 (2019.7.17)  
 【手続補正 1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲  
 【補正対象項目名】全文  
 【補正方法】変更  
 【補正の内容】  
 【特許請求の範囲】  
 【請求項 1】

対象からの試料中の非天然核酸の量を評価する方法であって、試料が非天然核酸および天然核酸を含み、方法が：

複数の一塩基バリエーション (SNV) 標的のそれぞれについて、試料またはその一部に対して、少なくとも 2 つのプライマー対を用いた増幅に基づく定量アッセイを実施すること、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、少なくとも 2 つのプライマー対の 1 つは、プライマーにおいて SNV 標的の 1 つのアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV 標的の別のアレルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも 2 つのプライマー対のもう 1 つは、SNV 標的の別のアレルを特異的に増幅する、および、増幅に基づく定量アッセイからの結果を得るかまたは提供して、試料中の非天然核酸の量を決定すること、

を含み、

ここで任意に、結果がレポートで提供され、ここで任意に、方法がさらに、試料中の非天然核酸の量を、結果に基づいて決定することを含む、またはここで結果が、試料中の非天然核酸の量を含む、

前記方法。

【請求項 2】

対象からの試料中の非天然核酸の量を評価する方法であって、試料が非天然核酸および天然核酸を含み、方法が：

複数の一塩基バリエーション (SNV) 標的のそれぞれについて、試料またはその一部に対して少なくとも 2 つのプライマー対を用いて実施した、増幅に基づく定量アッセイからの結果を得ること、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、少なくとも 2 つのプライマー対の 1 つは、プライマーにおいて SNV 標的の 1 つのアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV 標的の別のアレルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも 2 つのプライマー対のもう 1 つは、SNV 標的の別のアレルを特異的に増幅す

る、および、  
非天然核酸の量を、結果に基づいて評価すること、  
を含み、  
ここで任意に、試料中の非天然核酸の量が、増幅に基づく定量アッセイの結果に基づき、  
ここで任意に、結果がレポートから得られる、  
前記方法。

【請求項 3】

方法がさらに、増幅に基づく定量アッセイの情報提供的な結果を選択することを含み、  
ここで任意に、選択された情報提供的な結果が平均化され、ここで任意に、増幅に基づく  
定量アッセイの情報提供的な結果が、非天然核酸および / または天然核酸の遺伝子型に基  
づいて選択される、  
請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

試料中の非天然核酸の量が、少なくとも 0.005 %、少なくとも 0.01 %、少なく  
とも 0.03 %、少なくとも 0.05 %、少なくとも 0.1 %、または少なくとも 0.3  
% である、およびここで任意に、試料中の非天然核酸の量が、1.5 % 未満、1.3 % 未  
満、1 % 未満、または 0.5 % 未満である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

非天然核酸の遺伝子型が知られていないかまたは得られていない場合、方法がさらに：  
可能性のある非天然の遺伝子型の予測に基づいて、結果を評価すること、  
を含み、  
ここで任意に、評価することが、期待値最大化アルゴリズムを用いて実施される、  
請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

対象からの試料中の非天然核酸の量を評価する方法であって、試料が非天然核酸および  
天然核酸を含み、方法が：

次の 1) および 2) からの結果を得ること：1) 複数の SNV 標的のそれぞれについて、  
試料またはその一部に対して少なくとも 2 つのプライマー対を用いて実施された、増幅に  
基づく定量アッセイ、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプ  
ライマーを含み、少なくとも 2 つのプライマー対の 1 つは、プライマーにおいて SNV 標的  
の 1 つのアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV 標的の別のア  
レルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増  
幅し、少なくとも 2 つのプライマー対のもう 1 つは、SNV 標的の別のアレルを特異的に  
増幅する、および 2) 天然の遺伝子型および、可能性のある非天然の遺伝子型の予測、に  
基づく、情報提供的結果の決定、ならびに

結果を提供して、試料中の非天然核酸の量を決定すること、  
を含み、

ここで任意に、結果がレポートで提供され、およびここで任意に、方法がさらに、試料中  
の非天然核酸の量を、結果に基づいて決定することを含む、および / またはここで結果が  
、試料中の非天然核酸の量を含む、  
前記方法。

【請求項 7】

対象からの試料中の非天然核酸の量を評価する方法であって、試料が非天然核酸および  
天然核酸を含み、方法が：

次の 1) および 2) からの結果を得ること：1) 複数の SNV 標的のそれぞれについて、  
試料またはその一部に対して少なくとも 2 つのプライマー対を用いて実施された、増幅に  
基づく定量アッセイ、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプ  
ライマーを含み、少なくとも 2 つのプライマー対の 1 つは、プライマーにおいて SNV 標的  
の 1 つのアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV 標的の別のア  
レルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増

幅し、少なくとも2つのプライマー対のうち1つは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および2)天然の遺伝子型および、可能性のある非天然の遺伝子型の予測、に基づく、情報提供的結果の決定、ならびに

非天然核酸の量を、結果に基づいて評価すること、  
を含み、

ここで任意に、試料中の非天然核酸の量が、増幅に基づく定量アッセイの結果に基づき、およびここで任意に、結果がレポートから得られる、  
前記方法。

【請求項8】

方法がさらに、天然の遺伝子型および可能性のある非天然の遺伝子型の予測に基づいて情報提供的な結果を選択することを含む、および/または期待値最大化を用いて、可能性のある非天然の遺伝子型を予測する、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

少なくとも2つのプライマー対のうち1つのプライマー対もまた、プライマーにおいてSNV標的の別のアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを、しかしSNV標的の1つのアレルに対しては3'二重ミスマッチを含み、かつSNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および/または量が、非天然核酸の天然核酸に対する比率またはパーセンテージである、請求項1、2および6～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

方法がさらに：  
天然核酸の遺伝子型を得ること；および/または  
複数のSNV標的を得ること；および/または  
複数のSNV標的のそれぞれについて少なくとも2つのプライマー対を得ること  
を含む、請求項1～3および6～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

最大尤度を用いて非天然核酸の量を算出する、および/または試料が無細胞DNA試料を含み、量が非天然無細胞DNAの量である、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

【請求項12】

対象が移植レシピエントであり、非天然核酸の量がドナー特異的無細胞DNAの量であり、ここで任意に、移植レシピエントが、心臓移植レシピエントである、および/または小児の移植レシピエントである、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

複数の増幅に基づく定量アッセイが、リアルタイムPCRアッセイまたはデジタルPCRアッセイなどの定量的PCRアッセイである、請求項1～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

方法がさらに、対象におけるリスクを、試料中の非天然核酸の量に基づいて決定することを含み、ここで任意に、リスクが、移植に関連するリスクであり、ここで任意に、移植が心臓移植であり、ここで任意に、移植に関連するリスクが、移植拒絶反応のリスクである、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

リスクが、非天然核酸の量が閾値よりも大きい場合に増大する、またはリスクが、非天然核酸の量が閾値未満である場合に減少し、ここで任意に、リスクが心臓移植拒絶反応に関連するリスクの場合に、閾値が1%または1.3%である、請求項14に記載の方法。

【請求項16】

方法がさらに：  
対象に対する処置を、非天然核酸の量に基づき選択すること；および/または  
非天然核酸の量に基づき対象を処置すること；および/または  
対象への処置に関する情報を、非天然核酸の量に基づき提供すること；および/または

対象における非天然核酸の量を、経時的にモニタリングすることまたはモニタリングを示唆すること；および／または

対象における非天然核酸の量を、その後の時点で評価すること；および／または対象に投与する処置の効果を、非天然核酸の量に基づき評価すること

を含み、

ここで任意に、処置が抗拒絶反応療法である、

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

試料またはその一部を提供するまたは得ることをさらに含む、および／または核酸を試料から抽出することをさらに含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

試料が、血液、血漿または血清を含む、および／または試料を、対象から心臓移植の 10 日以内に得る、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

複数の SNV 標的を決定する方法であって、

a) 個体の集団において複数の高度にヘテロ接合性の SNV を同定すること、ここで任意に、Hardy-Weinberg の  $p > 0.25$  の SNV を選択すること、および／または困難領域に関連する SNV を除くこと、をさらに含む、ここで任意に、困難領域が、症候性領域および／または低複雑度領域である；

b) 各 SNV にわたる 1 つ以上のプライマーを設計すること、ここで任意に、1 つ以上のプライマーが 70 bp ウィンドウにわたり、および／または、1 つ以上のプライマーが 16 ~ 26 bp の長さである；

c) 十分に特異的なプライマーを選択すること、ここで任意に、十分に特異的なプライマーが、BLAST 分析によって同定され、ここで任意に、BLAST 分析が、GCRh37 に対するものである；

d) 選択されたプライマーの融解温度および／または GC % を算出し、中程度範囲の配列についてフィルタリングすること、ここで任意に、反復遺伝アルゴリズムおよび／または模擬アニーリングをさらに含む；

e) プライマーの多重化能力を、共通の溶液中の共通の融解温度で評価すること、および

f) 均一に増幅された配列を、PCR などで同定すること、

を含む、前記方法。

【請求項 20】

同定された各 SNV 標的についてのプライマー対を得ることをさらに含む、ここで、プライマー対が、プライマーにおいて SNV の 1 つのアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV 標的の別のアレルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅し、ここで任意に、方法がさらに、同定された各 SNV 標的についての別のプライマー対を得ることを含む、ここで別のプライマー対は、SNV 標的の別のアレルを特異的に増幅する、およびここで任意に、別のプライマー対が、プライマーにおいて SNV の別のアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし SNV の 1 つのアレルに対しては 3' 二重ミスマッチを含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

同定された複数の SNV 標的が、少なくとも 90 個の SNV 標的、または少なくとも 95 個の SNV 標的である、および／または同定された複数の SNV 標的が、105 個未満の SNV 標的、または 100 個未満の SNV 標的である、請求項 1 ~ 20 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

組成物またはキットであって、

複数の SNV 標的のそれぞれについてプライマー対を含み、

ここで各プライマー対は、プライマーにおいて SNV 標的の 1 つのアレルに対して 3' 末

端から2番目のミスマッチを、しかしSNV標的の別のアレルに対しては3'二重ミスマッチを含み、かつSNV標的の1つのアレルを特異的に増幅する、

ここで任意に、複数のSNV標的のそれぞれについて別のプライマー対をさらに含み、ここで別のプライマー対が、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅し、ここで任意に、同定された複数のSNV標的が、少なくとも90個のSNV標的、または少なくとも95個のSNV標的である、および/または同定された複数のSNV標的が、105個未満のSNV標的、または100個未満のSNV標的である、前記組成物またはキット。

【請求項23】

緩衝剤；および/または

ポリメラーゼ；および/または

プローブ、任意に蛍光プローブ；および/または

使用説明書、ここで任意に、使用説明書が、試料中の非天然核酸の量を決定するための使用説明書である、

をさらに含み、

ここで任意に、試料が、心臓移植レシピエント由来または小児の心臓移植レシピエント由来である、

請求項22に記載の組成物またはキット。

【請求項24】

非天然核酸の遺伝子型を推定する方法であって：

複数の一塩基バリエーション(SNV)標的のそれぞれについて、情報提供的な非天然核酸レベルを得ること、

レベルを、最大尤度または期待値最大化ステップを用いて、2つの分布の1つに割り当てること、そのうちの1つは完全情報提供的レベル用であり、もう1つは半情報提供的レベル用であり、ここで任意に、情報提供的な非天然核酸レベルが、天然核酸であると決定されるレベルを除去することによって得られ、ここで任意に、方法がさらに、コールなしまたは誤ったコールを表すレベルを除去することを含む、および/またはレベルが、次世代シーケンシングなどのシーケンシングによって決定される、前記方法。

【請求項25】

レベルが、複数のSNV標的のそれぞれについて実施される増幅に基づく定量アッセイから得られ、ここで任意に、増幅に基づく定量アッセイが、複数のSNV標的のそれぞれについて少なくとも2つのプライマー対を用いて実施され、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、少なくとも2つのプライマー対の1つは、プライマーにおいてSNV標的の1つのアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを、しかしSNV標的の別のアレルに対しては3'二重ミスマッチを含み、かつSNV標的の1つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも2つのプライマー対のもう1つは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅し、およびここで任意に、少なくとも2つのプライマー対のもう1つのプライマー対もまた、プライマーにおいてSNV標的の別のアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを、しかしSNV標的の1つのアレルに対しては3'二重ミスマッチを含み、かつSNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

方法がさらに、割り当てられたレベルを提供することを含む、および/または方法がさらに、非天然核酸の量を、レベルの割り当てに基づいて得ることを含む、および/または方法がさらに、非天然核酸の量を、レベルの割り当てに基づいて提供することを含む、請求項24または25に記載の方法。

【請求項27】

方法であって、

完全情報提供的または半情報提供的として割り当てられたレベルまたは非核酸の量を、請求項24～26のいずれか一項に記載の方法に従った割り当てに基づいて得ること、および

対象におけるリスクを、前記レベルまたは量に基づいて評価すること、  
を含み、

ここで任意に、対象が、移植のレシピエントである、および／または  
ここで処置または処置に関する情報が、評価されたリスクに基づいて対象に与えられ、こ  
こで任意に、処置が、抗拒絶反応療法である、またはここで方法がさらに、対象における  
非天然核酸の量を経時的にモニタリングすること、またはモニタリングを示唆することを  
含む、  
前記方法。