

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-514387

(P2019-514387A)

(43) 公表日 令和1年6月6日 (2019. 6. 6)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/6851 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6851	4 B 0 6 3
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09	Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 41 頁)

(21) 出願番号 特願2018-556973 (P2018-556973)
 (86) (22) 出願日 平成29年4月29日 (2017. 4. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年1月4日 (2019. 1. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/030292
 (87) 国際公開番号 W02017/190105
 (87) 国際公開日 平成29年11月2日 (2017. 11. 2)
 (31) 優先権主張番号 62/330, 044
 (32) 優先日 平成28年4月29日 (2016. 4. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511148204
 ザ メディカル カレッジ オブ ウィス
 コンシン インク
 THE MEDICAL COLLEGE
 OF WISCONSIN, INC.
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
 226 ミルウォーキー ウォータータウ
 ン プランク ロード 8701
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 ミッチェル, アオイ, トミタ
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53
 122、エルム グローブ、ストーンフィ
 ールド コート 13835

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 胎児健康を評価するための多重／最適化ミスマッチ増幅 (MOMA) ーリアルタイムPCR

(57) 【要約】

本発明は、妊娠した対象からなどの試料中の非天然核酸の量を評価するための、非天然核酸が胎児特異的である、方法および組成物に関する。本明細書で提供される方法および組成物は、妊娠した対象における胎児状態などの状態のリスクを決定するために、使用することができる。

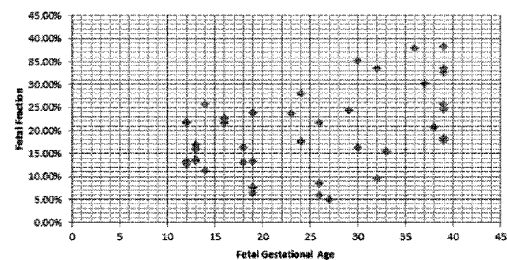


Fig. 7

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

妊娠した対象からの試料中の胎児特異的核酸の量を評価する方法であって、試料が胎児特異的核酸および対象核酸を含み、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ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）定量アッセイなどの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、PCR定量アッセイなどの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、試料中の胎児特異的核酸の量を決定すること、を含む、前記方法。

10

【請求項 2】

結果がレポートで提供される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

方法がさらに、試料中の胎児特異的核酸の量を、結果に基づいて決定することを含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

結果が、試料中の胎児特異的核酸の量を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

妊娠した対象からの試料中の胎児特異的核酸の量を評価する方法であって、試料が胎児特異的核酸および対象核酸を含み、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実施した、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイからの結果を得ること、ここで少なくとも2つのプライマー対を用い、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、胎児特異的核酸の量を、結果に基づいて評価すること、を含む、前記方法。

30

【請求項 6】

試料中の胎児特異的核酸の量が、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの結果に基づく、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

結果がレポートから得られる、請求項 5 または 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

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 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

量が、全核酸に対する胎児特異的核酸の比率またはパーセンテージである、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

結果が、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供の結果である

50

、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

量が、PCR 定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供的結果に基づいている、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

方法がさらに、PCR 定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供的結果を選択することを含む、請求項 1 ～ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

選択された情報提供的結果が平均化されている、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

PCR 定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイが、胎児特異的核酸および / または対象核酸の遺伝子型（または親の遺伝子型）に基づいて選択される、請求項 1 2 または 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

方法がさらに、胎児特異的核酸および / または対象核酸の遺伝子型（または親の遺伝子型）を得ることを含む、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

方法がさらに、複数の SNV 標的を得ることを含む、請求項 1 ～ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 7】

方法がさらに、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 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

複数の SNV 標的が、少なくとも 1 8、2 1、2 4、2 7、3 0、3 3、3 6、3 9、4 2、4 5、4 8、5 1、5 4、5 7、6 0、6 3、6 6、6 9、7 2、7 5、7 8、8 1、8 4、8 7、9 0、9 3 または 9 6 の SNV 標的である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

複数の SNV 標的が、1 0 0、9 9、9 8、9 7、9 6、9 5、9 4、9 3、9 2、9 1 または 9 0 未満の SNV 標的である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

複数の SNV 標的が、7 5 未満の SNV 標的である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

複数の SNV 標的が情報提供の標的であり、複数の SNV の情報提供の標的が、少なくとも 6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、2 4、2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1 または 3 2 の SNV の情報提供の標的である、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

複数の SNV の情報提供の標的が、3 4、3 3、3 2、3 1 または 3 0 未満の SNV の情報提供の標的である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

複数の SNV の情報提供の標的が、2 5 未満の SNV の情報提供の標的である、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

試料中の胎児特異的核酸の量が 1 0 % 未満である、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 5】

試料中の胎児特異的核酸の量が 5 % 未満である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

親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：

10

20

30

40

50

親の遺伝子型の予測に基づいて、結果を評価すること、を含む、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

評価が、期待値最大化アルゴリズムを用いて実施される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

胎児特異的核酸が、胎児特異的無細胞 DNA である、請求項 1 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

量を使用して、胎児へのリスクを決定する、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

胎児へのリスクが、本明細書で提供されるいずれか 1 つの状態のリスクである、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

複数の PCR 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 アッセイである、請求項 1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

方法がさらに、対象に対する処置を、胎児特異的核酸の量に基づき選択することを含む、請求項 1 ~ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

方法がさらに、胎児特異的核酸の量に基づき対象を処置することを含む、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

方法がさらに、胎児特異的核酸の量に基づき、対象への処置に関する情報を提供することを含む、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

方法がさらに、対象における胎児特異的核酸の量を、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、請求項 1 ~ 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

方法がさらに、対象における胎児特異的核酸の量を、その後の時点で評価することを含む、請求項 1 ~ 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

方法がさらに、対象に投与する処置の効果を、胎児特異的核酸の量に基づき評価することを含む、請求項 1 ~ 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

処置が、本明細書で提供されるいずれか 1 つの処置である、請求項 32 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

試料が、少なくとも妊娠 10 週齢の対象からのものである、請求項 1 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

10%未満の胎児特異的核酸の量が、胎児苦痛を示す、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

試料またはその一部を提供するまたは取得することをさらに含む、請求項 1 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

核酸を試料から抽出することをさらに含む、請求項 1 ~ 41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

SNV 標的に対するプライマーを使用する増幅前ステップをさらに含む、請求項 1 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 4】

試料が、血液、血漿または血清を含む、請求項 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 5】

組成物またはキットであって、

少なくとも 6 つの S N V の情報提供的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 S N V 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 S N V 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 S N V 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅する、前記組成物またはキット。

【請求項 4 6】

少なくとも 6 つの S N V の情報提供的標的のそれぞれについて別のプライマー対をさらに含む、請求項 4 5 に記載の組成物またはキットであって、別のプライマー対が S N V 標的の別のアレルを特異的に増幅する、前記組成物またはキット。

【請求項 4 7】

少なくとも 6 つの S N V の情報提供的標的が、少なくとも 7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31 または 32 の S N V の情報提供的標的である、請求項 4 5 または 4 6 に記載の組成物またはキット。

【請求項 4 8】

少なくとも 6 つの S N V の情報提供的標的が、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26 または 25 未満の S N V の情報提供的標的である、請求項 4 7 に記載の組成物またはキット。

【請求項 4 9】

少なくとも 6 つの S N V の情報提供的標的のそれぞれについて、別のプライマー対もまた、プライマーにおいて S N V 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 S N V 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 S N V 標的の別のアレルを特異的に増幅する、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 5 0】

組成物またはキットであって、

少なくとも 18 の S N V 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 S N V 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 S N V 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 S N V 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅する、前記組成物またはキット。

【請求項 5 1】

少なくとも 18 の S N V 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、S N V 標的の別のアレルを特異的に増幅する、請求項 5 0 に記載の組成物またはキット。

【請求項 5 2】

少なくとも 18 の S N V 標的が、少なくとも 21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、71、75、80、85、90 または 95 の S N V 標的である、請求項 5 0 または 5 1 に記載の組成物またはキット。

【請求項 5 3】

少なくとも 18 の S N V 標的が、100、99、98、97、96、95、94、93、92、91 または 90 未満の S N V 標的である、請求項 5 2 に記載の組成物またはキット。

【請求項 5 4】

少なくとも 18 の S N V 標的が 75 未満の S N V 標的である、請求項 5 3 に記載の組成

10

20

30

40

50

物またはキット。

【請求項 55】

少なくとも 18 の SNV 標的のそれぞれについて、別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 50 ~ 54 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 56】

緩衝剤をさらに含む、請求項 45 ~ 55 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 57】

ポリメラーゼをさらに含む、請求項 45 ~ 56 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 58】

プローブをさらに含む、請求項 45 ~ 57 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 59】

プローブが蛍光プローブである、請求項 58 に記載の組成物またはキット。

【請求項 60】

使用説明書をさらに含む、請求項 45 ~ 59 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 61】

使用説明書が、試料中の非天然核酸の量を決定するまたは評価するための説明書である、請求項 60 に記載の組成物またはキット。

【請求項 62】

請求項 1 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法で使用するための、請求項 45 ~ 61 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 63】

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つで使用するための、請求項 45 ~ 61 のいずれか一項に記載の組成物またはキット。

【請求項 64】

方法であって、
請求項 1 ~ 44 のいずれか一項に記載の方法に基づいて胎児特異的核酸の量を得ること、
および
対象または胎児におけるリスクを、量に基づいて評価すること、
を含む、前記方法。

【請求項 65】

処置または処置もしくは無処置に関する情報が、評価されたりリスクに基づいて対象について選択されるかまたは対象に提供される、請求項 64 に記載の方法。

【請求項 66】

方法がさらに、対象における胎児特異的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、請求項 64 または 65 に記載の方法。

【請求項 67】

対象が、妊娠期間 10 週以降の間の 1 以上の時点でモニタリングされる、請求項 66 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、35 U.S.C. § 119(e) の元で、2016 年 4 月 29 日に提出された米国仮出願第 62/330,044 号の出願日の利益を主張し、この仮出願の内容は、その全体が参照により

10

20

30

40

50

本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

発明の分野

本発明は、対象からの試料中の非天然核酸の量を評価するための、方法および組成物に関する。本明細書で提供される方法および組成物は、胎児に関連するリスクを決定するために使用することができる。本発明はさらに、非天然無細胞デオキシリボ核酸（胎児特異的無細胞DNAなどの非天然無細胞DNA）の量を評価するための、多重／最適化ミスマッチ増幅（MOMA）を使用した、方法および組成物に関する。

【発明の概要】

10

【0003】

本開示は少なくとも部分的に、多重／最適化ミスマッチ増幅を用いて対象からの試料中の低頻度の非天然核酸を定量することができるという、驚くべき発見に基づく。多重／最適化ミスマッチ増幅は、特定配列の増幅のために3'末端から2番目のミスマッチを、しかし代替配列に対しては2重ミスマッチを含み得るプライマーの設計を包含する。かかるプライマーでの増幅は、核酸異種集団において、非天然核酸の量が例えば1%未満、または0.5%である場合でさえ、試料中の非天然核酸の量の定量的決定を可能にする。

【0004】

本明細書に提供されるのは、かかる最適化された増幅に関連する方法、組成物およびキットである。本方法、組成物またはキットはそれぞれ、実施例および図面にあるもののいずれか1つを含む、本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つであることができる。

20

【0005】

一側面において、妊娠した対象からの試料中の胎児特異的核酸の量を評価する方法、ここで試料は胎児特異的核酸を含む。一態様において、方法は、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ついて、少なくとも2つのプライマー対を用いてポリメラーゼ連鎖反応（PCR）定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイを実施することを含み、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、ここで少なくとも2つのプライマー対のうちの1つは、SNV標的の1つのアレルに対して、プライマーにおいて3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、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PCR定量アッセイなどの定量アッセイから結果を得るかまたは提供して、試料中の胎児特異的核酸の量を決定することを含む。

30

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、結果はレポートで提供される。

【0006】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、結果に基づいて試料中の胎児特異的核酸の量を決定することをさらに含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、結果は、試料中の胎児特異的核酸の量を含む。

40

一側面において、妊娠した対象からの試料中の胎児特異的核酸の量を評価する方法、ここで試料は胎児特異的核酸および対象核酸を含む、が提供される。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、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実施されるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）などの増幅に基づく定量アッセイから結果を得ることを含み、増幅には少なくとも2つのプライマー対を用い、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、ここで少なくとも2つのプライマー対の1つは、SNV標的の1つのアレルに対してプライマーにおいて3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異

50

的に増幅し、少なくとも2つのプライマー対のもう1つがSNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および、結果に基づいて胎児特異的核酸の量を評価することを含む。

【0007】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料中の胎児特異的核酸の量は、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの結果に基づく。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、結果はレポートから得られる。

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも2つのプライマー対の別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含むが、SNV標的の1つのアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する。

【0008】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、量は、全核酸に対する胎児特異的核酸の比率またはパーセンテージである。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、結果は、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供の結果である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、量は、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供の結果に基づく。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供の結果を選択することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、選択された情報提供の結果は、平均化される。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、PCR定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供の結果は、胎児特異的核酸および/または対象核酸の遺伝子型（または親の遺伝子型）に基づいて選択される。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、胎児特異的核酸および/または対象核酸の遺伝子型（または親の遺伝子型）を得ることを含む。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、複数のSNV標的を得ることを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、複数のSNVの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さらに含む。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNV標的は、少なくとも18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72または75のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNV標的は、90未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNV標的は、75未満のSNV標的である。

【0009】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNV標的は情報提供の標的であり、複数のSNVの情報提供の標的は、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25のSNVの情報提供の標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNVの情報提供の標的は、30未満のSNVの情報提供の標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、複数のSNVの情報提供の標的は、25未満のSNVの情報提供の標的である。

【0010】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料の胎児特異的核酸の量は10%未満である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料の胎児特異的核酸の量は5%未満である。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、親の遺伝子型は、知られ

10

20

30

40

50

ていないかまたは得られていない。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、親の遺伝子型の予測に基づいて結果を評価することをさらに含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、予測は、期待値最大化アルゴリズムを用いて実施される。

【0011】

提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、胎児特異的核酸は、胎児特異的無細胞 DNA である。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、量は、胎児に対するリスクを決定するために使用される。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、胎児に対するリスクは、本明細書で提供されるいずれか 1 つの状態のリスクである。

10

【0012】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、複数の PCR 定量アッセイは、リアルタイム PCR アッセイまたはデジタル PCR アッセイである。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、対象への処置を、胎児特異的核酸の量に基づいて選択することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、対象を、胎児特異的核酸の量に基づいて処置することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、胎児特異的核酸の量に基づき、対象の処置についての情報を対象に提供することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、対象における胎児特異的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。

20

【0013】

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、対象における胎児特異的核酸の量を、その後の時点で評価することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、対象に投与される処置の効果を、胎児特異的核酸の量に基づいて評価することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、処置は、本明細書で提供される処置のいずれか 1 つである。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、試料は、少なくとも妊娠 10 週齢の対象からのものである。本発明で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、胎児特異的核酸の 10 % 未満の量は、妊娠 10 週齢以降などにおける、胎児苦痛を示すものである。

30

【0014】

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、試料またはその一部を提供することまたは得ることを含む。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法はさらに、核酸を試料から抽出することを含む。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法は、SNV 標的のためのプライマーを使用する増幅前ステップをさらに含む。プライマーは、非天然核酸の量を決定するためのものと同一であっても異なってもよい。

40

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、試料は、血液、血漿または血清を含む。

【0015】

一側面において、少なくとも 6 つの SNV の情報提供的標的のそれぞれについてプライマー対を含む組成物またはキットであって、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含むが、SNV 標的の別のアレルに対して 3' 二重ミスマッチを含み、SNV 標的の 1 つのアレルを特異的に増幅するものが提供される。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、組成物またはキットは、SNV 標的の別のアレルを特異的に増幅

50

する、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的のそれぞれについての別のプライマー対をさらに含む。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的は、少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31または32のSNVの情報提供の標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的は、35未満のSNVの情報提供の標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的は、30未満のSNVの情報提供の標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的は、25未満のSNVの情報提供の標的である。

10

【0016】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供の標的のそれぞれについての別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番目のミスマッチも含むが、SNV標的の1つのアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する。

【0017】

一側面において、少なくとも18のSNV標的のそれぞれについてのプライマー対を含む組成物またはキットであって、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番目のミスマッチも含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異的に増幅するものが提供される。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する少なくとも18のSNV標的のそれぞれについての別のプライマー対をさらに含む。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、少なくとも21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、71、75、78、81、84、87、90、93、または96のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、100未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、95未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、90未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、85未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、80未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、75未満のSNV標的である。

20

30

【0018】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的のそれぞれについての別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番目のミスマッチも含むが、SNV標的の1つのアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する。

40

本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットは緩衝剤をさらに含む。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットはポリメラーゼをさらに含む。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットはプローブをさらに含む。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様

50

において、プローブは蛍光プローブである。

【 0 0 1 9 】

本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、組成物またはキットは、使用説明書をさらに含む。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、使用説明書は、試料中の非天然核酸の量を決定または評価するための説明書である。本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、組成物またはキットは、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つにおいて使用される。

【 0 0 2 0 】

一側面において、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つに基づいて胎児特異的核酸の量を得ること、および量に基づいて対象または胎児におけるリスクを評価することを含む方法が提供される。

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、評価されたリスクに基づいて、処置または処置または無処置についての情報が対象に選択または提供される。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法は、経時的に対象における胎児特異的核酸の量をモニタリングすることまたはモニタリングすることを示唆することをさらに含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、対象は、妊娠 10 週以降の間の 1 以上の時点でモニタリングされる。

【 0 0 2 1 】

一側面において、本明細書で提供される 1 つ以上の結果を含有するレポートが提供される。提供されるレポートのいずれか 1 つの一態様において、レポートは電子形式である。提供されるレポートのいずれか 1 つの一態様において、レポートはハードコピーである。提供されるレポートのいずれか 1 つの一態様において、レポートは口頭で与えられる。

提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、ミスマッチプライマー（単数または複数）はフォワードプライマー（単数または複数）である。提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、それぞれの S N V 標的についてのプライマー対のリバースプライマーは同じである。

【 0 0 2 2 】

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法は、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つなどの、その後の時点などで、対象から別の試料を得ること、および試料について試験を実施することをさらに含む。

一態様において、本明細書で提供される方法の態様のいずれか 1 つは、提供される組成物、キットまたはレポートのいずれか 1 つの態様であることができる。一態様において、本明細書で提供される組成物、キットまたはレポートの態様のいずれか 1 つは、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの態様であることができる。

添付の図面は、一定の縮尺で描くことを意図していない。これらの図は例示的なものに過ぎず、開示を可能にするためには必要とされない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

【 図 1 】 図 1 は、M O M A プライマーの例示的で非限定的な図を提供する。ポリメラーゼ連鎖反応（P C R）アッセイにおいて、S N V A を含有する配列の伸長が起こることが予想され、これにより S N V A の検出が行われ、これは続いて定量され得る。しかし S N V B の伸長は、二重ミスマッチのために起こることは予想されない。

【 図 2 】 図 2 は、例示的な増幅トレースを提供する。

【 図 3 】 図 3 は、期待値最大化を用いた、未知の場合の非天然遺伝子型の予測を示す。

【 図 4 】 図 4 は、期待値最大化を用いた、未知の場合の非天然遺伝子型の予測を示す。

【 0 0 2 4 】

【 図 5 】 図 5 は、104 個の M O M A 標的の平均バックグラウンドノイズを提供する。

【 図 6 】 図 6 は、M O M A を使用する方法のバックグラウンドノイズのさらなる例を提供する。

10

20

30

40

50

【図 7】図 7 は、本明細書で記載された方法を使用して算出された胎児フラクシオンおよび胎児妊娠年齢を示す散布図である。

【図 8】図 8 は、いくつかの態様が動作することができるコンピュータシステムの例を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

発明の詳細な説明

本開示の側面は、試料中の非天然核酸の高感度の検出および/または定量化のための方法に関する。非天然核酸、例えば非天然 DNA は、妊娠した対象の胎児からのものを含む様々な状況において個体に存在し得る。本開示は、対象から得た試料中の、非天然無細胞 DNA 濃度などの非天然核酸を検出、分析、および/または定量するための技術を提供する。

10

本明細書で使用する場合、「非天然核酸」は、別の供給源に由来するか、または対象において見出される核酸の突然変異型である（特定の配列に関して）、核酸を指す。したがって「天然核酸」は、別の供給源からではなく、対象において見出される核酸の突然変異型ではない（野生型（WT）配列などの特定の配列に関して）核酸である。いくつかの態様において、非天然核酸は、非天然無細胞 DNA である。「無細胞 DNA」（または cf - DNA）は、細胞の外、例えば対象の血液、血漿、血清、尿などに存在する DNA である。いかなる特定の理論またはメカニズムにも束縛されることを望まないが、cf - DNA は、例えば細胞のアポトーシスを介して、細胞から放出されると考えられている。非天然核酸の例は、妊娠した対象における、胎児からの核酸である。本明細書で使用する場合、本明細書で提供される組成物および方法は、非天然供給源からの無細胞 DNA、例えば、胎児特異的 DNA または胎児特異的無細胞 DNA（例えば、胎児特異的 cf - DNA）の量を決定するために、使用することができる。

20

【0026】

本明細書において提供されるのは、配列同一性の違いを有する核酸を測定するために使用することができる、方法および組成物である。いくつかの態様において、配列同一性の違いは、一塩基バリエーション（SNV）である；しかしながら、SNV が本明細書で指される場合はいつでも、天然核酸と非天然核酸の間の配列同一性のいかなる違いも、適用可能であることが意図される。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか 1 つは、配列同一性に違いがある場合に、天然核酸 v s 非天然核酸に適用することができる。本明細書で使用する場合、「一塩基バリエーション」は、単一ヌクレオチド（single nucleotide）において配列可変性がその中に存在する、核酸配列を指す。いくつかの態様において、SNV は両アレル（両アレル）SNV であり、SNV について 1 つのメジャーなアレルおよび 1 つのマイナーなアレルが存在することを意味する。いくつかの態様において、SNV は、集団内などに 2 つより多くのアレルを有し得る。一般に「マイナーなアレル」は、遺伝子座について、集団などにおいて頻度が少ないアレルを指し、一方「メジャーなアレル」は、集団などにおいてより頻度が高いアレルを指す。SNV はまた、胎児状態の既知の指標であり得る。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、かかる変異は、本明細書で提供される状態のいずれか 1 つに関連する変異である。本明細書で提供される方法および組成物は、核酸の混合物内のメジャーおよびマイナーなアレルの核酸を、いくつかの態様において低レベルで存在する場合であっても、定量することができる。変異の例としては、高リスクの遺伝子欠損、胎児死亡などを含む、本明細書で提供される胎児状態のいずれかに関連する変異が挙げられる。

30

40

【0027】

SNV などの、配列同一性に可変性が存在する核酸配列は、一般に「標的」と呼ばれる。本明細書で使用する場合、「SNV 標的」は、個体の集団などにおける、または対象において起こり得て疾患または状態に関連し得る突然変異の結果として生じる、単一ヌクレオチドなどにおいて配列可変性が存在するところの核酸配列を指す。SNV 標的は 1 つより多くのアレルを有し、好ましい態様において、SNV 標的は両アレルである。本明細書

50

で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、SNV標的は、SNP標的である。これらの態様のいくつかにおいて、SNP標的は両アレルである。非天然核酸は、極めて低いレベルであっても、PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイをSNV標的に特異的なプライマーを用いて実施することにより、定量可能であることが発見されている。いくつかの態様において、非天然核酸の量は、定量的PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイを、複数のSNV標的についてのプライマーを用いて試みることににより、決定される。

【0028】

「複数のSNV標的」は、各標的に対して少なくとも2つのアレルが存在する、1より多くのSNV標的を指す。好ましくは、いくつかの態様において、各SNV標的は両アレルであると予想され、SNV標的の各アレルに特異的なプライマー対を使用して、各アレルの核酸を特異的に増幅し、ここで増幅は、特異的なアレルの核酸が試料中に存在する場合に起こる。本明細書で使用する場合、1つのアレルは標的配列の突然変異型であってよく、別のアレルは配列の非突然変異型である。

【0029】

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つにおいて、複数のSNV標的は、少なくとも6つの情報提供的なSNV標的を含む。提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的PCRなどの増幅に基づく定量的アッセイは、少なくとも6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または32の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量アッセイは、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、または23未満の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、6～10、6～15、6～20、6～25または6～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、7～10、7～15、7～20、7～25または7～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、8～10、8～15、8～20、8～25、または8～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、10～15、10～20、10～25または10～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、15～20、15～25または15～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、17～20、17～25または17～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、20～25または20～30の情報提供的な標的についてのプライマー対を用いて実施される。

【0030】

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つの態様において、SNV標的についてのプライマー対は、SNV標的が情報提供的であるという知識に基づいて、遺伝子型の知識を用いるなどして予め選択され得る。しかしながら、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つの別の態様において、パーセンテージが情報提供的である可能性について、SNV標的についてのプライマー対が選択される。かかる態様において、より多くの数のSNV標的についてのプライマー対が、パーセンテージが情報提供的である確率に基づいて使用される。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、情報提供的な結果は、少なくとも18、21、2

10

20

30

40

50

4、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93または96の標的についてのプライマー対を用いて得られる。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、99、96、93、90、87、84、81、78、75、72、または69未満の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、18~30、18~45、18~60、18~75、18~80、18~85、18~90、18~95または18~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、21~30、21~45、21~60、21~75、21~80、21~85、21~90、21~95または21~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、24~30、24~45、24~60、24~75、24~80、24~85、24~90、24~95または24~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、30~45、30~60、30~75、30~80、30~85、30~90、30~95または30~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、40~45、40~60、40~75、40~80、40~85、40~90、40~95または40~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、45~60、45~75、45~80、45~85、45~90、45~95または45~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、50~60、50~75、50~80、50~85、50~90、50~95または50~100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。

【0031】

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的PCRなどの増幅に基づく定量アッセイは、プライマー対を用いて、少なくとも40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、または95個の標的に対して、実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、アッセイは、プライマー対を用いて、105、104、103、102、101、100、99、98、または97個未満の標的に対して、実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、十分に情報提供的な結果が、プライマー対を用いて、40~105、45~105、50~105、55~105、60~105、65~105、70~105、75~105、80~105、85~105、90~105、90~104、90~103、90~102、90~101、90~100、90~99、91~99、92~99、93~99、94~99、95~99、または90~95個の間の標的に対して、実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、十分に情報提供的な結果が、プライマー対を用いて、40~99、45~99、50~99、55~99、60~99、65~99、70~99、75~99、80~99、85~99、90~99、95~99、90~98、90~97または90~96個の間の標的に対して、実施される。提供される方法または組成物のいずれか1つについて、方法または組成物は、前述の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つに向けられ得る。

【0032】

本明細書で使用する場合、「情報提供的なSNV標的」とは、本明細書で提供されるプライマーによる増幅が生じ、その結果が情報提供的であるものである。本明細書で提供さ

れる「情報提供的な結果」とは、試料中の非天然核酸または天然核酸のレベルを定量するために使用することができる結果である。いくつかの態様において、情報提供的な結果は、天然核酸が特定のSNV標的についてヘテロ接合性である場合の結果および、「コールなし」または誤ったコール結果を除外する。胎児健康の文脈において、情報提供的な非天然核酸はヘテロ接合性であり得ることもまた認識されるべきである。情報提供的な結果からアレルのパーセントを、標準曲線を使用し、提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において算出することができる。提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、非天然核酸および/または天然核酸の量は、それぞれ、非天然核酸および/または天然核酸の情報提供的な結果にわたる平均値を表す。

【0033】

非天然核酸の量またはレベル（例えば、比率またはパーセンテージ）は、天然および/または非天然核酸のメジャーおよびマイナーなアレルの量ならびに遺伝子型を用いて、決定することができる。結果は、父親の遺伝子型の知識なしで評価することもできる。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、天然核酸の遺伝子型は既知であるが父親および/または非天然核酸の遺伝子型は知られていない場合、方法は、可能性のある非天然の遺伝子型を予測すること、または父親の遺伝子型をシーケンシングによって決定すること、のステップを含む。かかる方法のさらなる詳細は、例えば、PCT公報番号WO2016/176662に見出され得、かかる方法は参照によって本明細書中に取り込まれる。本明細書に提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、アレルは、対象の天然核酸および/または父親の以前の遺伝子型決定に基づき、決定することができる。遺伝子型決定のための方法は、当技術分野において知られている。かかる方法には、次世代、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイなどのシーケンシング、他の分離技術またはPCRアッセイを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、かかる遺伝子型を得るステップを含むことができる。

【0034】

本明細書で使用する「得ること」とは、それによってそれぞれの情報または材料を獲得できる任意の方法を指す。したがってそれぞれの情報は、天然の遺伝子型を決定することなどの、実験方法によって獲得することができる。いくつかの態様において、それぞれの材料を、様々な実験的または実験室的方法で作成し、設計することができる。それぞれの情報または材料は、レポートまたは資料などにおいて情報を与えられまたは提供されることによっても、獲得することができる。材料は、いくつかの態様において、商業的手段によって（すなわち、購入によって）与えられるかまたは提供されてもよい。

【0035】

レポートは、口頭、書面（またはハードコピー）または電子形式において、例えば視覚化または表示することができる形式であってよい。いくつかの態様において、本明細書で提供される各アッセイについての「生の」結果がレポートで提供され、このレポートから、試料中の非天然核酸の量を決定するためのさらなるステップを実施することができる。これらのさらなるステップは、以下のうちのいずれか1つ以上を含むことができる：情報提供的な結果を選択すること、天然および/または非天然の遺伝子型（または父親の遺伝子型）を得ること、天然および非天然核酸に関する情報提供的な結果についてのアレルパーセントを算出すること、アレルパーセントを平均化すること、など。他の態様において、レポートは、試料中の非天然核酸の量を提供する。その量から、いくつかの態様において臨床医は、対象に対する処置の必要性または非天然核酸の量を経時的にモニターする必要性を、評価することができる。したがって、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、方法は、対象中の非核酸の量を1つよりも多い時点で評価することを含むことができる。かかる評価は、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つを用いて実施することができる。

【0036】

いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、対象由来の1つ以上の試料中の全無細胞DNAなどの核酸の全量を決定または取得するステップを含み

10

20

30

40

50

得る。したがって、本明細書で提供されるレポートのいずれか1つ以上もまた、全無細胞DNAなどの全核酸の1つ以上の量を含み得、レポートにある天然核酸および/または非天然核酸の量の組合せを臨床医が使用して対象の処置の必要性または対象のモニタリングの必要性を評価し得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの好ましい態様において、核酸の全量は、本明細書で提供されるMOMAアッセイによって決定され、MOMAアッセイによって決定されるような天然のおよび非天然の核酸カウントの尺度であり、好ましくは、情報提供的標的からのものである。いくつかの態様において、核酸の全量は、本明細書で提供されるMOMAアッセイまたは当業者に公知の他のアッセイであるが、本明細書で提供されるMOMAアッセイではない任意の方法によって決定される。

10

【0037】

本明細書で提供される定量アッセイは、多重/最適化ミスマッチ増幅(MOMA)を利用する。かかるアッセイで使用するためのプライマーを得ることができ、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイを実施するための1つ以上のプライマー対を得るステップを含むことができる。一般にプライマーは、核酸の量を定量する際にそれらの使用を容易にする、ユニークな特性を有する。例えば、プライマー対のフォワードプライマーは、3'ヌクレオチド(例えば、末端から2番目の3'ヌクレオチド)でミスマッチであり得る。提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、このミスマッチは3'ヌクレオチドにおいてであるが、SNV位置に隣接している。提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、SNV位置に対するプライマーのミスマッチ位置は、図1に示される通りである。一般に、かかるフォワードプライマーは3'ミスマッチを有していても、PCR反応などにおいて増幅生成物(適切なリバースプライマーと併せて)を生成し、こうしてそれぞれのSNVを有する核酸の増幅およびその結果としての検出を可能にする。特定のSNVが存在せず、SNV標的の別のアレルに対して二重ミスマッチがある場合、増幅産物は一般に産生されない。好ましくは、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、各SNV標的について、各アレルの特異的増幅が、他のアレルの増幅なしで起こり得るプライマー対が得られる。「特異的増幅」とは、別の核酸の実質的な増幅なしの、またはバックグラウンドもしくはノイズを超える別の核酸配列の増幅なしの、標的の特異的アレルの増幅をいう。いくつかの態様において、特異的な増幅は、特異的なアレルの増幅のみをもたらす。

20

30

【0038】

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、両アレルである各SNV標的について、2つのプライマー対があり、それぞれが2個のアレルのうちの1つに特異的であり、したがって、それが増幅するアレルに関しては1つのミスマッチを有し、増幅しないアレルに関して二重ミスマッチを有する(再びこれらのアレルの核酸が存在する場合に限る)。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、ミスマッチプライマーはフォワードプライマーである。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、各SNV標的についての2つのプライマー対のリバースプライマーは、同一である。

40

これらの概念は、本明細書で提供される組成物および方法のいずれか1つでのプライマー対の設計において使用することができる。フォワードおよびリバースプライマーは、鋳型の特定の遺伝子座の断片を増幅するために、反対の鎖(例えば、センス鎖およびアンチセンス鎖)に結合するように設計されることが理解されるべきである。プライマー対のフォワードプライマーおよびリバースプライマーは、任意の適切なサイズの核酸断片を増幅するように設計され得て、例えば本開示によるSNV標的のアレルの存在を検出する。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、本明細書に記載の1つ以上のプライマー対を得るための1つ以上のステップを含むことができる。

【0039】

本明細書に記載のプライマー対は、PCRアッセイなどの多重増幅に基づく定量アッセ

50

イに使用され得ることが理解されるべきである。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、プライマー対は、PCR反応などの増幅反応において他のプライマー対と適合するように設計される。例えばプライマー対は、PCR反応などの増幅反応における他のプライマー対の少なくとも2個、少なくとも5個、少なくとも10個、少なくとも20個、少なくとも30個、少なくとも40個等と適合するように設計されてもよい。本明細書で使用する場合、PCR反応などの増幅反応におけるプライマー対は、それらの標的を同じ反応において増幅することができる場合に、「適合的」である。いくつかの態様においてプライマー対が適合的であるのは、PCR反応などの同じ増幅反応に多重化されている場合に、それらの標的DNAの増幅が、1%以下、2%以下、5%以下、10%以下、15%以下、20%以下、25%以下、30%以下、35%以下、40%以下、45%以下、50%以下、または60%以下阻害されている場合である。プライマー対は多くの理由で適合的でない可能性があり、その理由としては、限定はされないが、プライマー二量体の形成、および他のプライマー対と干渉し得る、鑄型上の標的外部位への結合を含む。したがって、本開示のプライマー対は、他のプライマー対との二量体の形成を妨げるか、または標的外結合部位の数を制限するように、設計され得る。多重PCRアッセイにおいて使用するためのプライマーを設計するための例示的な方法は、当技術分野で知られており、さもなくば本明細書に別途記載される。

10

【0040】

いくつかの態様において、本明細書に記載のプライマー対は、非天然核酸の量を定量するためにPCRアッセイなどの多重増幅に基づくアッセイにおいて使用される。したがって、本明細書に提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、プライマー対は、潜在的に非二倍体であるゲノム領域を検出するように設計されたプライマー対を除いて、二倍体であるゲノム領域を検出するように設計される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、本開示に従って使用されるプライマー対は、反復マスク領域、既知コピー数可変領域、または非二倍体であり得る他のゲノム領域を検出しない。

20

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、増幅に基づく定量アッセイは、それによって核酸が増幅されて、核酸の量を決定することができるような、任意の定量アッセイである。かかるアッセイには、核酸を本明細書に記載のMOQAプライマーで増幅して定量するものが含まれる。かかるアッセイには、単純な増幅および検出、ハイブリダイゼーション技術、電気泳動などの分離技術、次世代シーケンシングなどが含まれる。

30

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、定量アッセイは定量的PCRアッセイである。定量的PCRには、リアルタイムPCR、デジタルPCR、TAQMAN(商標)などが含まれる。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、PCRは「リアルタイムPCR」である。かかるPCRは、増幅プロセスがまだ進行している間に反応動態を液相でモニタリングすることができる、PCR反応を指す。従来のPCRとは対照的に、リアルタイムPCRは、増幅反応においてリアルタイムで同時に検出または定量する能力を提供する。特定の色素からの蛍光強度の増加に基づき、標的の濃度を、増幅がそのプラトーに達する前であっても決定することができる。

40

【0041】

複数プローブの使用は、単一プローブリアルタイムPCRの能力を拡大することができる。多重リアルタイムPCRは、各アッセイが固有の蛍光色素で標識された特異的プローブを有し得、各アッセイについて異なる観察色をもたらす、複数のプローブに基づくアッセイを使用する。リアルタイムPCR装置は、異なる色素から生成される蛍光を区別することができる。異なるプローブは、それぞれ固有の発光スペクトルを有する異なる色素で標識することができる。スペクトル信号は、離散光学系で収集され、一連のフィルタセットを通過し、検出器のアレイによって収集される。色素間のスペクトルの重なりは、純粋な色素スペクトルを用いて行列代数により実験データをデコンボリューションすることにより、実施することができる。

50

プローブは、本開示の方法、特に定量化ステップを含む方法のために有用であり得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、PCRアッセイの実施におけるプローブの使用を含むことができ、一方で本明細書で提供されるキットの組成物のいずれか1つは、1つ以上のプローブを含むことができる。重要なことに、本明細書に提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、PCR定量アッセイの1つ以上または全てにおけるプローブは、ミスマッチプライマーと同じ鎖上にあり、反対鎖上ではない。このようにプローブをPCR反応に組み込む際に、さらなるアレルト異的識別が提供できることが見出されている。

【0042】

一例として、TAQMAN (商標) プローブは、5'末端にFAM (商標) またはVIC (登録商標) 色素標識を有し、3'末端にマイナーグループバインダー (MGB) 非蛍光クエンチャー (NFQ) を有する、加水分解プローブである。TAQMAN (商標) プローブの原理は、一般に、相補的なプローブ結合領域へのハイブリダイゼーション中に二重標識TAQMAN (商標) プローブを切断するための、TAQMAN (商標) ポリメラーゼの5' - 3'エキソヌクレアーゼ活性、およびフルオロフォアに基づく検出に依存する。TAQMAN (商標) プローブは、定量的PCR反応の指数関数的段階の間に、定量的測定における検出の特異性を高めることができる。

PCRシステムは一般に、蛍光色素またはレポーターの検出および定量に依存し、そのシグナルは反応におけるPCR産物の量に正比例して増加する。例えば、最も簡単で最も経済的な形式においては、そのレポーターは、二本鎖DNA特異的色素SYBR (登録商標) Green (Molecular Probes) であることができる。SYBR Greenは、二本鎖DNAのマイナーグループに結合する色素である。SYBR Green色素が二本鎖DNAに結合すると、蛍光強度が増加する。より多くの二本鎖アンプリコンが産生されると、SYBR Green色素シグナルが増加する。

【0043】

本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、PCRはデジタルPCRであってもよい。デジタルPCRは、希釈された増幅産物を複数の個別試験部位に分割して、ほとんどの個別試験部位が、ゼロまたは1つの増幅産物を含むようにすることを含む。次いで増幅産物を分析して、試料中の選択された関心対象のゲノム領域の頻度の表示を提供する。個別試験部位ごとに1つの増幅産物を分析すると、各個別試験部位について2値の「イエスまたはノー」の結果が得られ、選択された関心のあるゲノム領域が定量化され、選択された関心のあるゲノム領域の相互の頻度が決定される。ある側面において、これに加えて、または代替として、複数の分析を、所定の領域からのゲノム領域に対応する増幅産物を使用して行うことができる。2つ以上の所定の領域の分析結果を用いて、増幅産物の数の相対的な頻度を定量し、決定することができる。2つ以上の所定の領域を使用して試料中の頻度を決定することにより、単一の検出アッセイによっては容易には明らかにされない、増幅効率の変動などを介したバイアスの可能性が低減される。デジタルPCRを使用してDNAを定量する方法は、当技術分野で知られており、例えば米国特許公開番号US20140242582に記載されている。

【0044】

本明細書で提供されるPCR条件は、本明細書に記載の方法のいずれか1つに従って機能するように、改変または最適化できることが、理解されるべきである。典型的には、PCR条件は、使用する酵素、標的鋳型、および/またはプライマーに基づく。いくつかの態様において、PCR反応の1つ以上の成分が改変または最適化される。最適化され得るPCR反応の成分の非限定的な例としては、鋳型DNA、プライマー (例えば、フォワードプライマーおよびリバースプライマー)、デオキシヌクレオチド (dNTP)、ポリメラーゼ、マグネシウム濃度、緩衝液、プローブ (例えば、リアルタイムPCRを実施する場合)、緩衝液、および反応容積を含む。

【0045】

前述の態様のいずれにおいても、任意のDNAポリメラーゼ (DNAヌクレオチドのD

10

20

30

40

50

NA鎖への重合を触媒する酵素)を利用することができ、これには熱安定性ポリメラーゼを含む。適切なポリメラーゼ酵素は当業者に知られており、以下を含む：大腸菌DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、クレノウクラスのパリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、バクテリオファージ29、REDTaq(商標)ゲノムDNAポリメラーゼ、またはシークエナーゼ。例示的なポリメラーゼとしては、限定はされないが、以下を含む：Bacillus stearothermophilus pol I、Thermus aquaticus(Taq) pol I、Pyrococcus furiosus(Pfu)、Pyrococcus woesei(Pwo)、Thermus flavus(Tfl)、Thermus thermophilus(Th)、Thermus litoris(Tli)およびThermotoga maritima(Tma)。これらの酵素、これらの酵素の改変型、および酵素の組み合わせは、Roche、Invitrogen、Qiagen、StratageneおよびApplied Biosystemsを含む販売元から市販されている。代表的な酵素としては、以下を含む：PHUSION(登録商標)(New England Biolabs, Ipswich, MA)、Hot MasterTaq(登録商標)(Eppendorf)、PHUSION(登録商標)Mpx(Finnzymes)、PyroStart(登録商標)(Fermentas)、KOD(EMD Biosciences)、Z-Taq(TAKARA)、およびCS3 AC/LA(KlenTaq, University City, MO)。

10

20

30

40

50

【0046】

塩および緩衝液としては、当業者によく知られているものが挙げられ、これには、それぞれMgCl₂およびTris-HClおよびKClを含むものが含まれる。典型的には、1.5~2.0nMのマグネシウムがTaq DNAポリメラーゼに最適であるが、しかし最適なマグネシウム濃度は、鋳型、緩衝液、DNAおよびdNTPに依存し得、これはそれぞれがマグネシウムをキレート化する可能性があるからである。マグネシウム[Mg²⁺]の濃度が低すぎると、PCR産物が形成されない場合がある。マグネシウム[Mg²⁺]の濃度が高すぎると、望ましくないPCR産物が見られる場合がある。いくつかの態様において、マグネシウム濃度は、0.1mMまたは0.5mM増分で約5mMまでのマグネシウム濃度を補充することにより、最適化することができる。

【0047】

本開示に従って使用される緩衝液は、添加剤、例えば界面活性剤、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、ウシ血清アルブミン(BSA)およびポリエチレングリコール(PEG)など、ならびに当業者によく知られた他のものを含んでもよい。ヌクレオチドは一般に、デオキシリボヌクレオシド三リン酸、例えばデオキシアデノシン三リン酸(dATP)、デオキシシチジン三リン酸(dCTP)、デオキシグアノシン三リン酸(dGTP)およびデオキシチミジン三リン酸(dTTP)などであり、これらは、標的核酸の増幅についての反応適切量に添加される。いくつかの態様において、1つ以上のdNTP(例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP)の濃度は、約10μM~約500μMであり、これはPCR反応で生成されるPCR産物の長さおよび数に依存し得る。

【0048】

いくつかの態様において、本開示に従って使用されるプライマーは、改変される。プライマーは、それらの意図された標的(例えば、特定のSNV)のみに、高い特異性で結合し、さらなるヌクレオチド配列の差異に対して高い識別を示すように設計されてよい。プライマーは、特定の算出融解温度(T_m)、例えば、46~64の範囲の融解温度を有するように、改変することができる。所望の融解温度を有するプライマーを設計するために、プライマーの長さを変えることができ、および/またはプライマーのGC含量を変えることができる。典型的には、GC含量および/またはプライマーの長さを増加させることにより、プライマーのT_mが増加する。逆に、GC含量および/またはプライマーの長さを減少させると、プライマーのT_mが典型的に低下する。特定のSNV(または配列非同一性の他の形態)を別のものよりも高感度で検出するために、標的に対して意図的にミスマッチ(単数または複数)を組み込むことにより、プライマーを改変できることが理解されるべきである。したがってプライマーは、それらが結合するように設計された特定

の配列（例えば、特定の S N V）に関して、1つ以上のミスマッチを組み込むことにより、改変され得る。

【0049】

いくつかの態様において、P C R 反応において使用されるプライマーの濃度は、改変または最適化されてよい。いくつかの態様において、P C R 反応におけるプライマー（例えば、フォワードまたはリバースプライマー）の濃度は、例えば、約 0.05 μ M ~ 約 1 μ M であり得る。特定の態様において、各プライマーの濃度は、約 1 nM ~ 約 1 μ M である。本開示に従ったプライマーは、P C R 反応において同一または異なる濃度で使用され得ることが理解されるべきである。例えば、プライマー対のフォワードプライマーを 0.5 μ M の濃度で使用し、プライマー対のリバースプライマーを 0.1 μ M で使用することができる。プライマーの濃度は、限定はされないが、プライマー長、G C 含量、純度、標的 D N A とのミスマッチ、またはプライマー二量体を形成する可能性を含む因子に基づき得る。

10

いくつかの態様において、P C R 反応の熱プロファイルは、改変または最適化される。P C R 熱プロファイル改変の非限定的な例には、変性温度および持続時間、アニーリング温度および持続時間および伸長時間が含まれる。

【0050】

P C R 反応溶液の温度は、所定のサイクル数の間、変性状態、アニーリング状態、および伸長状態の間で順次循環させることができる。実際の時間および温度は、酵素、プライマーおよび標的に依存性であり得る。任意の所与の反応について、変性状態は、ある態様において約 70 ~ 約 100 の範囲であり得る。さらに、アニーリング温度および時間は、標的核酸内の特定の座位に結合するプライマーの特異性および効率に影響を及ぼし得る。特定の P C R 反応にとって重要であり得る。任意の所与の反応について、アニーリング状態は、ある態様において約 20 ~ 約 75 の範囲であり得る。いくつかの態様において、アニーリング状態は、約 46 ~ 64 であり得る。ある態様において、アニーリング状態は、室温（例えば、約 20 ~ 約 25）で行うことができる。

20

【0051】

伸長温度および時間もまた、アレル産物の収量に影響し得る。所与の酵素に対して、伸長状態は、ある態様において約 60 ~ 約 75 の範囲であることができる。

P C R アッセイからのアレルの量の定量化は、本明細書で提供されるように、または当業者に明らかな他のようにして、実施することができる。一例として、増幅トレースを、一貫性および堅牢な定量化のために分析する。内部標準を使用して、Cycle 閾値を入力核酸（例えば、D N A）の量に翻訳することができる。アレルの量は、性能（performant）アッセイの平均として算出することができ、遺伝子型について調整することができる。広範囲の効果的な増幅は、低濃度核酸でさえ成功した検出を示す。

30

本明細書で提供される方法および組成物は、試料中の、胎児特異的核酸のような非天然核酸などの低レベルの核酸を検出するために使用できることが見出されている。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、全 c f - D N A（例えば、天然および非天然）などの全核酸に対して試料中で少なくとも約 10 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 7 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 5 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 2.5 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 1 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 0.5 % である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約 0.25 % である非天然核酸を

40

50

検出することができる。

【 0 0 5 2 】

非天然核酸の量を、低レベルにおいても決定する能力により、本明細書で提供される方法および組成物は、胎児へのリスクなどの対象におけるリスクを評価するために使用することができる。本明細書で提供される「リスク」とは、対象における任意の望ましくない状態の存在または不在または進行、または、胎児または妊娠した対象など、胎児に有害な状態の存在または不在または進行の可能性の増加を指す。状態は、本明細書で提供される状態のいずれか 1 つであり得る。

いくつかの態様において、胎児は、徐脈(bradycardia)、双胎間輸血症候群(TTTS)、腹壁破裂、先天性肺気道形成異常(CPAMS)、胎児水腫、または胎児不整脈を有するかまたはこれを有するリスクがある。いくつかの態様において、胎児は、苦痛を有していたか、これを有するリスクがある。いくつかの態様において、妊娠した対象は、リスクがある。いくつかの態様において、妊娠した対象は、例えば、絨毛羊膜炎または早期分娩を含む状態のリスクがある。本明細書で提供される例から、c f f - D N A のパーセントまたは比率などの胎児特異的 c f - D N A (c f f - D N A) のレベルが、ベースラインと比較して減少し得ることが実証されており、それによって、減少が胎児の有害な状態を示す。したがって、妊娠した対象から得られた c f - D N A 試料からの胎児特異的 c f - D N A の量は、胎児の健康をモニタリングする感度があり非侵襲的な方法を提供し得、必要な場合、医療介入または早産を可能にする。本明細書で提供される「増加したリスク」とは、対象における任意の望ましくない状態の存在または進行、または、かかる状態の存在または進行の可能性の増加を指す。本明細書で提供される「リスクの減少」とは、対象における任意の望ましくない状態または進行の不在、または、かかる状態の存在または進行の可能性の低下(または不在または非進行の可能性の増加)を指す。いくつかの態様において、核酸は、c f - D N A を含み、これは、妊娠した対象の D N A および胎児の D N A を含み、ここで、妊娠した対象または前 D N A に対する胎児 D N A の量の減少は、胎児におけるリスクを示す、および/または、胎児における有害な状態の存在または進行を示す。

【 0 0 5 3 】

本明細書で使用する場合、「量」とは、核酸の測定のための任意の定量値を指し、絶対量または相対量で与えることができる。さらに、量は、総量、頻度、比率、パーセンテージなどであることができる。本明細書で使用する「レベル」という用語は、「量」の代わりに使用することができるが、同じ種類の値を指すことを意図する。次いで、妊娠した対象からの試料中の、胎児特異的 c f - D N A のパーセントまたは比率などの、胎児特異的核酸の決定された量は、胎児に関連するリスクを決定するために使用できる。これらの量は、閾値(ベースラインレベルなど)に対して比較することができ、および/または、かかる値の変化を経時的にモニタリングすることができる。例えば、閾値(例えば、ベースライン)からの差における変化を、非侵襲性臨床上指標として使用できる。この比率は、臨床状態における変化の測定を可能にし、および/または、正常な値またはベースラインレベルの算出を可能とする。好ましい態様において、量の形態が何であれ、量は、閾値レベルと比較され得る。

【 0 0 5 4 】

決定された量における閾値(例えばベースライン)を超える増加または減少、あるいは、経時的な増加または減少における変化は、胎児におけるリスクの増加または減少を示し得る。本明細書で使用する場合、「閾値(threshold)」は、状態の有無またはリスクの有無を示す、任意の所定のレベルを指す。閾値は、様々な形態をとることができる。これは、中央値または平均値などの単一カットオフ値であることができる。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、閾値は、例におけるような、本明細書で提供される中央値または平均値、あるいは、他に当該分野で既知のもののいずれかである。これは、1 つの定義群のリスクが別の定義群のリスクの 2 倍の場合などの、比較群に基づいて設定することができる。これは範囲であることができ、例えば、試験される集団を複数の群に等しく(または不等に)分割するか(低リスク群、中リスク群および高リ

スク群など)、またはクォードラント (quadrant) に分割して、最も低い象限はリスクが最も低い対象で、最も高い象限はリスクが最も高い対象である、などである。閾値は、選択された特定の集団に依存し得る。例えば、明らかに健康な集団は、異なる「正常」範囲を有するであろう。別の例として、閾値は、状態またはリスクの存在前または処置経過後のベースライン値から、決定することができる。別の例として、閾値は、以前の時点で作られた値である。かかる値は、試験されているリスクまたは状態と相関していない状態などの、対象における正常状態または他の状態を示すことができる。したがって、選択された所定の値は、対象が属するカテゴリーを考慮に入れてよい。適切な範囲およびカテゴリーは、当業者の通常の実験を用いて選択することができる。いくつかの態様において、閾値は、試験される対象のベースライン値であることができる。本明細書で提供される方法のいずれか1つの態様において、比較は、1以上のベースライン値またはその変化に関連していることが好ましい。かかるベースライン値は、胎児が健康な状態であるときの、胎児における状態の開始前の、または、有害な時点に進行する状態の前の、全 cf - DNA または非胎児特異的 cf - DNA に対するパーセントまたはその比率などの、胎児特異的核酸の量を示す。

10

20

30

40

50

【0055】

本明細書で使用する場合、かかる対象の「ベースラインレベル」は、対象 (例えば、妊娠中の女性または胎児) が、健康であったか健康であると考えられていた、本明細書で提供される状態を有していなかったか同状態を有すると考えられていなかった、または、本明細書で提供される状態を有していたか同状態を有すると考えられていたが、状態が処置または介入を必要としない段階にあったかあると考えられていた時間以前に、またはその時間にその後の試料に採取された対象由来の試料から特異的 cf - DNA などの胎児特異的核酸の量 (全 cf - DNA または非特異的 cf - DNA に対する胎児特異的 cf - DNA のパーセントまたは比率など) を含み得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、ベースラインに対する変化の減少は、胎児の健康の指標となり得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、2つ以上の時点でのベースラインとの差の変化は、胎児の健康の指標となり得る。したがって、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、胎児特異的 cf - DNA の量は、1つ以上の時点で決定され、1つ以上のベースライン値に対する増加または減少が決定される。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、胎児特異的核酸の量は2つ以上の時点で決定され、1つ以上のベースライン値に対する差の変化が決定される。本明細書で提供される方法のいずれかにおいて、方法は、胎児特異的核酸の定量を補助するために、内部標準で既知の量でスパイクするステップをさらに含み得る。

【0056】

提供される方法のいずれか1つはさらに、任意に本明細書で提供される方法の結果またはその結果の比較に基づいて、対象に別の試験を実施することを含む。かかる別の試験は、胎児などへのリスクの有無を決定するのに有用であることが当業者に知られている、任意の別の試験であることができる。かかる検査は、超音波バイオメトリックパラメータ、胎児心拍数、動脈圧、羊水レベル、腸管拡張、水症の発生、介入後の水症の解消および胎児喪失を含む胎児の健康の他の臨床的尺度を決定するものを含む。いくつかの態様において、pH、PaO₂、PaCO₂、および/または血液の乳酸塩レベルは、胎児および/または妊娠した対象において評価される。いくつかの態様において、別の試験は、1以上のさらなる時点において、本明細書で提供される方法を用いて、別の試験を実施することができる。提供される方法および/または追加の試験 (単数または複数) は、妊娠中の多数の時点のいずれかにおいて実施することができ、例えば、時点は、妊娠中、胎児介入時の疾患などの状態の進行中、および介入後の状態の解消時を含み得る。胎児特異的 cf - DNA のパーセントまたは比率などの胎児特異的核酸の量はまた、妊娠の間の任意の他の時間において決定してもよく、短期間または長期間の調査に利用してもよい。決定は、胎児の状態を評価するために現在使用されている他の検査の代わりに、またはそれに加えて実施され得る。非侵襲的方法など、胎児の早期リスクを検出する能力は、早期介入およびよ

り良好な患者結果をもたらすことができる。

【 0 0 5 7 】

何十年の研究にもかかわらず、胎児健康の非侵襲性解剖学的評価は、困難なままである。胎児喪失の増加したリスクを有する出産前異常を有する妊娠における評価の方法の必要性が存在する。進行した兆候の苦痛の発生の前に、胎児妥協を決定するための方法の利用可能性は、適切な介入または初期出産のための時間の幅を提供するだろう。超音波または生物物理学的プロファイルなどの方法による間接的および遅延した測定は、臨床医に、出産後の胎児水腫などの問題を警告する。この時点で、かなり多くの損傷が発生しており、胎児回復は、可能であっても、かなりの社会的資源を必要とする。本明細書で提供される方法などの、初期段階の胎児の病気を測定し、発生する前に胎児に水症または死亡の発生についてリスクがある時期を予測する方法は有利であり得る。提供される方法および関連する組成物は、妊娠結果を改善し、新生児死亡率を減少させることができる。高リスクの妊娠において必要性は特に急性であるが、提供される方法は、全ての妊娠において、早期分娩などのためのスクリーニングテストとして使用できる。

10

【 0 0 5 8 】

個体は、妊娠などにおいて、非天然 DNA 供給源を保有している。胎児および胎盤絨毛性組織由来の断片化した無細胞胎児 DNA (c f f - DNA) は、5 週以降から検出可能なレベルで母体血漿中で循環し得る。胎児健康における急性変化は、特にベースラインレベルに関連するレベルなどの、母体血漿中に検出可能な変更されたレベルの循環 c f f - DNA を生じ得ることが見い出されている。詳細には、ベースラインレベルと比較した場合の、変更されたレベルの循環胎児無細胞 DNA は、子宮胎児死亡、自発的中絶、および水腫に関連している。したがって、循環 c f f - DNA のレベルの変化は、早期分娩、胎児水腫および胎児喪失ならびに本明細書で提供される他の状態の発生を含む、胎児予後の実行可能な初期指標であり得、より初期の臨床介入および改善された予後を最終的に導き得る。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つを使用して、本明細書で提供されるいずれか 1 つの状態のリスクを評価することができる。

20

【 0 0 5 9 】

一般的に、c f - DNA などの胎児特異的核酸の、ベースラインなどの閾値に対する量（例えば、本明細書で提供される胎児特異的 c f - DNA のパーセントまたは比率）および/または量の変化は、胎児苦痛および関連する状態に相関し得る。例えば、低酸素/虚血に続発する胎児代謝の減少は、母体 c f f - DNA レベルの減少を導き、胎児妥協の伝統的な処置の出現に先行することが予測される。胎児特異的循環 c f - DNA の変更されたレベルは、本明細書で提供されるような望ましくない状態の発生に関連することが実証されている。したがって、母体血清中の胎児特異的 c f - DNA のフラクション（またはパーセントまたは比率）の定量を実施して、正常な発育をモニタリングし、早期分娩を減少させ、胎児水腫、子宮内死亡または他の有害な状態の発生前の適宜胎児介入または計画された早期分娩を可能にすることができる。したがって、適切な介入または早期分娩のための時間ウィンドウを提供し、子供の健康および予後を改善する際の重要な利点を提供する。

30

【 0 0 6 0 】

したがって、本明細書で提供される方法は、様々な胎児状態を同定および/またはモニタリングするために使用され得る。本明細書で使用する場合、「胎児状態」または「胎児の状態」は、経時的に変化し得る任意の健康状態または健康の評価を指す。かかる状態は、胎児異数性の存在または不在、胎児の性別または胎児の R h 血液型を含み得る。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、方法は、胎児異数性の存在または不在、胎児の性別または胎児の R h 血液型を決定するためのものではない。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、胎児の状態は、胎児苦痛（または胎児妥協）の存在または不在またはレベルである。

40

本明細書で提供されるアプローチは、母体試料中の胎児起源の無細胞 DNA などの核酸の検出および定量を含む。母体血液中の c c f - DNA の割合（またはパーセントまたは

50

比率)は、胎児の健康の関数として変化し、胎児の健康を評価するためのベースライン値などの閾値と比較され得ることが見出されている。胎児は、例えば、解剖学的、代謝、または胎児水腫、損傷した新生児、未熟児または自発的に終結した妊娠をもたらす母体環境の問題から苦痛を受ける間、細胞傷害を受け得る。胎児の状態は、胃腸炎、胎児性心臓不整脈、先天性肺腺腫様奇形、半葉全前脳胞症、胎児左心症候群、先天性欠損(神経、心臓およびその他)、低代謝率、胎児死亡および双子-双子輸血症候群を含む。提供される技術は、絨毛羊膜炎、早産、胎児心臓不整脈(胎児水腫および子宮衰弱のリスク増加に関連する)、(通常、全身紅はん性(SLE)などの母体のコラーゲン血管疾患にほとんど由来する様々な原因から生じ得る)胎児徐脈、大型先天性肺腺腫様奇形(CPAM)などのさらに他の状態において胎児妥協を検出するために、より広い適用性を有することができる。

10

【0061】

したがって、本明細書で提供される方法および組成物は、胎児の状態を評価するために様々な状況で使用することができる。例えば、先天性心疾患などの先天性異常と診断された胎児において、胎児の健康が評価され得る。別の例として、胎児性胃症および胎児徐脈症候群を有する妊婦において、胎児の健康が評価され得る。高リスクまたは低リスクの妊娠では、方法および組成物は、胎児喪失を防止するための早期介入または出産について胎児妥協の認識を可能にすることができる。したがって、方法および組成物は、女性の妊娠を計画する上で助けとなり、医学的介入、適切な出産の時期などを可能にする。かかる方法および組成物は、早期分娩および胎児死亡のさらなる理解を可能にし、許容できないほど高いままである未熟児および新生児死亡率を減少させることを可能にする。したがって、提供される方法または組成物のいずれか1つは、上記の状況などの本明細書で提供される状態のいずれか1つまたは上記の対象について使用するためのものであり得る。

20

【0062】

提供される方法は、胎児が本明細書で提供される状態のいずれか1つを有するか有すると疑われる(またはそのリスクがある)任意の妊娠をモニタリングするために使用することができる。例えば、全核酸または非胎児特異的核酸などに対して、cf-DNAなどの胎児特異的核酸のパーセンテージ、フラクション、または比率などのレベルまたは量は、本明細書中で提供される方法のいずれか1つを使用することによって決定され得る。リスクを評価する記載された方法は、任意の適切な様式で実施され得る。例えば、方法は、下に記載されるように、例および添付の図面に関連して、実施することができる。cff-DNAの変化を使用して、臨床上の変数、ならびに、水症、介入後の水症の解消、および胎児喪失を含む胎児状態の現在の非侵襲的方法と関連させることができる。提供される方法のいずれか1つは、母体重量および/または在胎齢に基づいて結果を修正するステップを含み得ることも理解されるべきである。したがって、本明細書で提供される方法は、妊娠中のいくつかの時点にわたる胎児の健康を同定および/またはモニタリングするために使用することができる。かかるモニタリングは、胎児の介入後にも生じ得る。

30

【0063】

したがって、提供される方法は、子宮内成長制限および母性血管疾患を含む低リスク妊娠ならびに高リスク妊娠をモニタリングするために使用することができる。「高リスク妊娠」は、臨床医がかかる合併症(単数または複数)に関連する1つ以上の合併症または状態のリスクがあると考えられる任意の妊娠を指すことを意味する。例えば、母親、赤ん坊、またはその両方に影響を及ぼす可能性のある合併症がある場合、妊娠は高リスクと考えられ得る。妊娠が高リスクであると示され得るさらなる例は、健康上の問題が存在する妊娠(例えば、糖尿病、がん、高血圧、腎臓疾患(例えば、慢性腎盂腎炎、慢性腎盂腎炎および腎不全)、てんかん)を含む。母親がアルコールまたは違法薬物を使用、または喫煙する場合、母親が17歳未満または35歳超である場合、母親が複数の妊娠歴がある場合、母親が以前の流産の病歴がある場合、または、胎児がダウン症候群、および/または心臓、肺または腎臓の問題などの遺伝的状态を有することが見出されている場合、妊娠もまた高リスクと考えられ得る。高リスク妊娠は、以前に妊娠に問題(例えば、早産、子癰前症ま

40

50

たは発作（子癇））があった人または現に妊娠に問題（例えば、早産、子癇前症または発作（子癇））を有する人、感染（例えば、H I V、C 型肝炎、サイトメガロウイルス（C M V）、水痘、風疹、トキソプラズマ症、または梅毒）を有する人、所定の薬物（例えば、リチウム、フェニトイン（Dilantinなど）、バルプロ酸（Depakene）、またはカルバマゼピン（Tegretolなど））を服用している人も含む。妊娠中の女性が所定の健康上の問題（例えば、心臓弁の問題、高血圧、鎌状赤血球症、喘息、狼瘡、または関節リウマチ）を有する妊娠も、高リスクと考えられ得る。高リスク妊娠の他の臨床指標は、当業者に知られている。

【0064】

態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、いずれか1以上の所定の量または閾値もしくはベースラインに対する量の変化について、閾値またはベースライン値との比較などの、本明細書で記載されるいずれか1つ以上の比較に基づいて、妊娠した対象に治療（または処置）を提供するステップまたは治療（または処置）に関する情報を提供するステップを含み得る。さらに他の態様において、方法のいずれか1つを使用して治療（または処置）の有効性を評価することができ、ここで、改善された値は治療の必要性をより少なく示し得るが、値の悪化は療法、異なる療法または増加した量の療法の必要性を示し得る。胎児特異的核酸の量（例えば、パーセンテージまたは比率）は、臨床介入と共に変化し得ることが予測される。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、1つ以上の時点での1つ以上の比較の結果に基づいて治療の必要性または用量を評価するステップを含み得る。いくつかの態様において、治療および介入は、子宮介入（例えば、外科的処置、薬物の投与など）または早期分娩を含む。いくつかの態様において、情報は、情報を含む書面を含む。書面は、書面による情報を電子形式で含み得る。いくつかの態様において、情報は、コンピュータ可読指示書として提供され得る。いくつかの態様において、情報は口頭で提供され得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、方法は、対象への治療の投与、対象への治療の情報の提供または対象への治療の示唆を記録することをさらに含み得る。治療は、本明細書で提供される療法または処置のいずれか1つであり得るか、または当業者に知られている。代替的に、量に基づいて変化なしまたは治療なしまたは処置なしを決定および示唆してもよく、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、かかる情報を対象に提供するステップを含み得る。

【0065】

本発明の側面は、1以上のベースライン値に対して妊娠した対象のサンプル中の胎児特異的核酸の量を比較すること、および任意には、処置することまたは処置に関する情報を提供することに関連する。臨床医が本明細書で提供される値（単数または複数）を含むレポートを有することは特に有用であり得る。したがって、一側面において、かかるレポートが提供される。いくつかの態様において、レポートは、全核酸（全無細胞DNAなど）または非胎児特異的核酸を用いるかまたは用いないで、胎児特異的核酸の量について複数の値を提供する。いくつかの態様において、臨床医は、対象の処置の必要性、または対象を経時的にモニタリングする必要性を量から評価することができる。

本明細書で提供されるアプローチは、喪失または水症の発生のリスクのある胎児の介入および計画的な分娩を適宜補助することができ、および、早期分娩のリスクを最小化するための支持療法のためのモニタリングを補助することもできる。最終的な利益は、胎児喪失の減少および胎児死亡率の減少であり得る。したがって、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、妊娠中の女性の子宮内死が生じる前に、胎児の介入または出産を実施または推奨するステップをさらに含み得る。いくつかの態様において、推奨は、妊娠中の女性への胎児介入および/または出産オプションなどの示唆された処置に関する情報を提供することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、妊娠した対象からの試料中の胎児特異的核酸の量を使用して、1以上のベースライン値に対する、胎児特異的核酸のパーセントまたは比率などの、胎児特異的核酸の量の差または差の変化を相関させる（または比較する）ことにより、胎児に対する治療の（例えば、正または負の）効果を評価することができる。適切な治療は、相関または比較に基づいて選

択することができ、および／または、妊娠した対象に投与される治療の量は、増加または減少され得る。代替的には、変化または治療は、相関または比較に基づいて決定されなくてもよい。治療の選択およびかかる治療に關与する投薬は、当業者の技能の範囲内である。

【 0 0 6 6 】

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、例えば妊娠した女性などの対象から得られた試料から、例えば無細胞 DNA などの核酸を抽出することを含み得る。かかる抽出は、当技術分野で知られている任意の方法または本明細書に提供される他の方法を用いて行うことができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、最新版または QIAamp 循環核酸キットまたは他の適切な市販キットを参照）。無細胞 DNA を血液から単離するための例示的な方法は、記載されている。EDTA または DTA などの抗凝固剤を含有する血液を、対象から採取する。cf-DNA を含む血漿を、血液中に存在する細胞から分離する（例えば、遠心分離または濾過によって）。所望の二次分離を行って、任意の残存する細胞を血漿から除去することができる（例えば、第 2 の遠心分離または濾過ステップ）。その後 cf-DNA を、当分野で知られている任意の方法、例えば Qiagen により製造されたものなどの市販のキットを用いて、抽出することができる。cf-DNA を抽出するための他の例示的な方法も、当技術分野で知られている（例えば、Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. Clin. Chem. 2008, v. 54, p. 1000-1007; Prediction of MYCN Amplification in Neuroblastoma Using Serum DNA and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. JCO 2005, v. 23, p. 5205-5210; Circulating Nucleic Acids in Blood of Healthy Male and Female Donors. Clin. Chem. 2005, v. 51, p. 1317-1319; Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. Clin. Chem. 2003, v. 49, p. 1953-1955; Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YMD. Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma. Clin Chem 2001;47:1607-1613; および Swinkels et al. Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma. Clinical Chemistry, 2003, vol. 49, no. 3, 525-526 を参照）。

【 0 0 6 7 】

本明細書で使用する場合、対象からの試料は、生物学的試料であり得る。かかる生物学的試料の例には、全血、血漿、血清、尿などが含まれる。いくつかの態様において、さらなる核酸、例えば標準の、試料への添加が行われ得る。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、増幅前ステップが実施される。例示的なかかる増幅方法は以下の通りであり、かかる方法は、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つに含めることができる。約 15 ng の無細胞血漿 DNA を、約 100 個の標的と Q5 DNA ポリメラーゼを用いて PCR で増幅する；ここでプールされたプライマーは合計で 6 μM であった。試料を、約 35 サイクルに供する。反応は合計で 25 μl である。増幅後、試料は、AMPURE ビーズクリーンアップ、ビーズ精製、または簡単に ExoSAP-IT (商標) it もしくは Zymo を含む、いくつかのアプローチを用いて洗浄することができる。

【 0 0 6 8 】

本開示はまた、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つにおいて使用するための複数の SNV 標的を決定する方法、またはプライマーの組成物のいずれか 1 つを誘導できる方法を提供する。複数の SNV 標的を決定する方法は、いくつかの態様において、a) 複数の高度にヘテロ接合性の SNV を個体の集団において同定すること、b) 各 SNV にわたる 1 以上のプライマーを設計すること、c) 十分に特異的なプライマーを選択すること、d) プライマーの多重化能力を、共通の融解温度および／または共通の溶液中において評価すること、および e) プライマーまたはそのサブセットで均一に増幅された配列を同定すること、を含む。

本明細書で使用する場合、「高度にヘテロ接合性の SNV」とは、集団において十分に

高いパーセンテージのマイナーなアレルを有するものである。いくつかの態様において、マイナーなアレルは、集団において少なくとも25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%または35%またはそれ以上である。これらの態様のいずれか1つにおいて、マイナーなアレルは、集団において50%、49%、45%、44%、43%、42%、41%、または40%未満である。かかるSNVは、天然核酸と非天然核酸との間で異なる標的を提供する可能性を増加させる。

【0069】

プライマーは、一般に70bpのウィンドウにまたがるように設計され得るが、他のウィンドウ、例えば65bpsと75bpsの間または60bpsと80bpsの間なども、選択することができる。また一般に、SNVはこのウィンドウの中央付近にあることが望まれ得る。例えば、70bpのウィンドウの場合、SNVは塩基10~60または20~50の間、例えば塩基30~40の間であった。本明細書で提供されるプライマーは、SNVに隣接するように設計され得る。

本明細書で使用する場合、「十分に特異的なプライマー」とは、意図されたアレルの増幅の、意図されていないアレルの増幅に対する識別を実証したものであった。したがってPCRでは、2つの増幅の間にサイクルギャップが必要であり得る。一態様において、サイクルギャップは、少なくとも5、6、7または8サイクルのギャップであり得る。

【0070】

さらに、配列は融解温度に基づいて選択され、一般に45~55の間の融解温度を有する配列が「中程度範囲の配列」として選択され得る。他の温度範囲が所望されてもよく、当業者によって決定することができる。「中程度範囲の配列」とは一般に、温度内の多重増幅形式で増幅され得るものである。いくつかの態様において、GC%含量は30~70%、例えば33~66%であった。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、困難領域に関連する配列を除外することを含むことができる。「困難領域」とは、標的配列に関する予測を確実に行うことが困難な、または多重増幅に適さないと考えられる、容量または特徴を有する任意の領域である。かかる領域は、症候性領域、低複雑性領域、高GC含量の領域、または連続タンデム反復を有する領域を含む。他のかかる特徴は、当業者に決定されるか、または他の方法で当業者に知られている。

【0071】

本開示はまた、試料中の非天然核酸の量を評価するために有用であり得る、組成物またはキットを提供する。いくつかの態様において、組成物またはキットは、複数のプライマー対を含む。組成物またはキットのプライマー対のそれぞれは、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含むことができ、ここで、本明細書に提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、プライマーの1つには3'ミスマッチがある（例えば、末端から2番目の3'ヌクレオチドにおいて）。本明細書に提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、このミスマッチは3'ヌクレオチドにおいて、SNV位置に隣接しており、ここで特定のSNVが存在しない場合、SNV標的の別のアレルに対して二重ミスマッチがある。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、プライマー対のミスマッチプライマーは、フォワードプライマーである。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、SNV標的の各アレルのリバースプライマーは、同一である。

【0072】

方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、情報提供的標的などのSNV標的のそれぞれについて少なくとも2つのプライマー対がある。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つは、SNV標的の数のいずれか1つにしたがって、本明細書で提供される情報提供的標的を含む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含み得る。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つにおいて、複数のSNV標的は、少なくとも6つの情報提供的

な S N V 標的である。提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、少なくとも 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または 32 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24 または 23 未満の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、6 ~ 10、6 ~ 15、6 ~ 20、6 ~ 25 または 6 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、7 ~ 10、7 ~ 15、7 ~ 20、7 ~ 25 または 7 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、8 ~ 10、8 ~ 15、8 ~ 20、8 ~ 25 または 8 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、10 ~ 15、10 ~ 20、10 ~ 25 または 10 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、15 ~ 20、15 ~ 25 または 15 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、17 ~ 20、17 ~ 25 または 17 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、20 ~ 25 または 20 ~ 30 の情報提供的標的である。

10

20

30

40

50

【0073】

本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つの態様において、複数の S N V 標的は、少なくとも 18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、93 または 96 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、100、99、97、96、93、90、87、84、81、78、75、72 または 69 未満の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、18 ~ 30、18 ~ 45、18 ~ 60、18 ~ 75、18 ~ 80、18 ~ 85、18 ~ 90、18 ~ 95 または 18 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、21 ~ 30、21 ~ 45、21 ~ 60、21 ~ 75、21 ~ 80、21 ~ 85、21 ~ 90、21 ~ 95 または 21 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、24 ~ 30、24 ~ 45、24 ~ 60、24 ~ 75、24 ~ 80、24 ~ 85、24 ~ 90、24 ~ 95 または 24 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、30 ~ 45、30 ~ 60、30 ~ 75、30 ~ 80、30 ~ 85、30 ~ 90、30 ~ 95 または 30 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、40 ~ 45、40 ~ 60、40 ~ 75、40 ~ 80、40 ~ 85、40 ~ 90、40 ~ 95 または 40 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、45 ~ 60、45 ~ 75、45 ~ 80、45 ~ 85、45 ~ 90、45 ~ 95 または 45 ~ 100 の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、50 ~ 60、50 ~ 75、50 ~ 80、50 ~ 85、50 ~ 90、50 ~ 95 または 50 ~ 100 の標的である。

【0074】

本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、少なくとも40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94または95の標的について、少なくとも2つのプライマー対などのプライマー対が存在する。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、105、104、103、102、101、100、99、98または97未満の標的について、少なくとも2つのプライマー対などのプライマー対が存在する。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、40～105、45～105、50～105、55～105、60～105、65～105、70～105、75～105、80～105、85～105、90～105、90～104、90～103、90～102、90～101、90～100、90～99、91～99、92～99、93、99、94～99、95～99、または90～95の標的について、少なくとも2つのプライマー対などのプライマー対が存在する。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、40～99、45～99、50～99、55～99、60～99、65～99、70～99、75～99、80～99、85～99、90～99、90～98、90～97、または90～96の標的について、少なくとも2つのプライマー対などのプライマー対が存在する。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、90～105、90～104、90～103、90～102、90～101、90～100、90～99、91～99、92～99、93、99、94～99、95～99、90～95の標的について、少なくとも2つのプライマー対などのプライマー対が存在する。提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つについて、方法または組成物またはキットは、前述の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つに向けられ得る。したがって、方法または組成物またはキットのいずれか1つは、前記の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つについての少なくとも2つのプライマー対に向けられ得る。

【0075】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、プライマー対は、定量PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイでの使用に適合するように設計される。例えば、プライマー対は、プライマー二量体を防止し、および/またはオフターゲット結合部位の数を制限するように設計される。提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの複数のプライマー対は、本明細書に記載の方法のいずれか1つに従って最適化または設計され得ることが、理解されるべきである。

いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つは、緩衝液をさらに含む。いくつかの態様において、緩衝液は、界面活性剤、ジメチルスルホキシド(DMSO)、グリセロール、ウシ血清アルブミン(BSA)およびポリエチレングリコール(PEG)または他のPCR反応添加剤などの添加剤を含む。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つが、例えばポリメラーゼをさらに含む場合、組成物またはキットは、以下を含んでよい：大腸菌DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、クレノウクラスのポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、バクテリオファージ29、REDTaq(商標)ゲノムDNAポリメラーゼ、またはシークエナーゼ。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つはさらに、1つ以上のdNTP(例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP)を含む。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つはさらに、プローブ(例えば、TAQMAN(商標)プローブ)を含む。

【0076】

本明細書で使用される「キット」とは、典型的には、例えば、前述のように、1つ以上の本発明の組成物、および/または本発明に関連する他の組成物を含む、パッケージまたはアセンブリを定義する。本明細書で提供されるキットのいずれか1つはさらに、少なく

とも1つの反応チューブ、ウェル、チャンバーなどを含んでよい。本明細書に記載のプライマー、プライマーシステム（複数の標的のためのプライマーのセットなど）またはプライマー組成物のいずれか1つは、キットの形態で提供され得るか、またはキット内に含まれ得る。

キットの各組成物は、液体形態（例えば、溶液）、固体形態（例えば、乾燥粉末）などで提供され得る。キットはいくつかの場合において、任意の形態における使用説明書を含んでよく、これは本発明の組成物と関連して提供され、使用説明書が本発明の組成物と関連していることを当業者が認識するような様式のものである。使用説明書は、本明細書で提供される方法のいずれか1つを実施するための使用説明書を含み得る。使用説明書は、組成物および/またはキットに付随する他の組成物の、使用、改変、混合、希釈、保存、投与、組み立て、保管、包装および/または調製のための使用説明書を含み得る。使用説明書は、かかる使用説明書を含むのに好適な媒体として当業者により認識され得る任意の形態で提供されてよく、例えば、任意の様式での書面または発表、口頭、聴覚的（例えば、電話による）、デジタル、光学的、視覚的（例えば、ビデオテープ、DVDなど）、または電子通信（インターネットまたはウェブベースの通信を含む）を含む。

【0077】

本発明の様々な側面は、単独で、組み合わせて、または前述の態様で具体的に論じられていない様々な構成で使用されてもよく、したがって、それらの用途においては、前述の説明または図面に示された構成要素の詳細および配置に限定されない。例えば、一態様に記載された側面は、他の態様に記載された側面と任意の様式で組み合わせてもよい。

また、本発明の態様は、その一例が提供されている、1つ以上の方法として実装されてもよい。方法の一部として実行される行為は、任意の適切な手段で順序付けられる。したがって、図示されていない順序で行為が実施される態様が構成されてもよく、これは、例示的な態様において連続的な行為として示されている場合でも、いくつかの行為を同時に実行することを含んでよい。

特許請求の範囲における順序を示す用語、例えば「第1」、「第2」、「第3」などの、クレーム要素を修飾するための使用は、それ自体、任意の優先順位、序列、または1つのクレーム要素の他の要素に対する順序、または方法の行為が実施される時間的順序を示さない。かかる用語は、特定の名称を有する1つのクレーム要素を、同じ名称を有する別の要素（但し、順序を示す用語の使用は除く）から区別するための、ラベルとしてのみ使用される。

【0078】

本明細書で使用される語法および専門用語は、説明目的のものであり、限定的であると見なされるべきではない。「含む（including）」、「含む（comprising）」、「有する」、「含有する（containing）」、「伴う（involving）」、およびそれらの変形の使用は、その後に列挙される項目および追加の項目を包含することを意味する。

本発明のいくつかの態様を詳細に説明したので、当業者には様々な改変および改良が容易に思い浮かぶであろう。かかる改変および改良は、本発明の精神および範囲内にあることが意図される。したがって、前述の説明は単なる例示に過ぎず、限定を意図するものではない。以下の説明は、本明細書で提供される方法の例を提供する。

【実施例】

【0079】

例1 - 遺伝子型情報を用いるMOMAアッセイ

SNV標的選択

開示による多重化のための標的の同定は、現在記載されているように、以下のステップの1つ以上を含み得る。第1に、既知の困難領域を除いて、いくつかの民族対照集団（Hardy-Weinberg $p > 0.05$ ）で高度にヘテロ接合性のSNPをスクリーニングする。困難領域は、患者および染色体の動原体およびテロメアを含む低い複雑性の領域で異常である可能性のある症候性領域を含み得る。次いで、所望の長さの標的フラグメントをin silicoで設計し得る。具体的には、例えば、それぞれのSNPの70bpウィンドウにわた

10

20

30

40

50

る2つの20～26bpプライマーを設計する。次いで、BLASTを使用して全ての候補プライマーをGCRh37に照会し得る。十分に特異的であることが見出されるプライマーは保持し得、オフターゲットヒット、特にフラグメントの3'末端でモニタリングし得る。オフターゲット候補のヒットを、サイズ選択を生き延びるペアワイズフラグメント生成について分析し得る。次いで、選択されたプライマーをin silico多重化評価に供し得る。プライマーの計算された融解温度およびグアニン・シトシンパーセンテージ(GC%)を使用して、中程度の範囲の配列をフィルタリングし得る。反復遺伝子アルゴリズムおよび模擬アニーリングを使用して、400の標的に適合する候補プライマーを選択し、最終的に800のプライマーを選択し得る。800のプライマーを生成し、共通の溶解温度で共通の溶液で多重能力を物理的に試験し得る。具体的には、マルチプレックス画面および中程度の読み取り深度ウィンドウにおいて偶数倍の増幅に基づいてプライマーをフィルタリングし得る。最高性能の多重化SNPを使用してMOMAについて48のアッセイを設計し得る。それぞれのSNPは、4つのミスマッチの選択肢でWT/MUTで設計されたプローブ、すなわち、アッセイ当たり8つのプローブを有し得る。新しく入れ子になったプライマーを、70bpの豊富なフラグメント内に設計し得る。最終的に、増幅効率を評価するために、既知のヘテロ接合性個体を用いてプライマーを実験的に増幅し得る(TAQMAN(商標)を使用して、3回で8プローブ×48アッセイ)。

10

【0080】

各アッセイの推測的遺伝子型決定の情報性(informativeness)

それぞれのアッセイされたSNPでの既知の母親および父親遺伝子型を使用して、情報提供的なアッセイのサブセットを選択し得る。父親の遺伝子型がわからない場合、それは推論することができる。遺伝子型は、シーケンシング、SNPマイクロアレイ、または既知の試料に対するMOMAアッセイの適用によっても学習することができる。

20

【0081】

多重アッセイ性能の後処理分析

患者特異的MOMAプローブバイアスを実験コホートにわたって推定し得る。反復的な選択を洗練して最終的な胎児特異的パーセント・コールを行い得る。

【0082】

再構成実験

アッセイの感度と精度を、既知の混合比で再構成された血漿試料を使用して評価した。

30

【0083】

例2 - 母親の遺伝子型情報を有するが父親の遺伝子型情報を有さないMOMAアッセイ

標的は、一般に、非情報提供的なものと情報提供的なもののいずれかとして同定する。胎児では、赤ん坊が母親に関連しているとき、すべての標的が半情報提供的である。代理妊娠では、標的は半情報提供的標的および完全情報提供的標的である。関連する妊娠の文脈に続き、すべての標的は非情報提供的なものまたは半情報提供的なもののいずれかである。半情報提供的は、5%の外因性(foreign)を示す標的が10%の全体的な割合を示すようなヘテロ接合性の振る舞いを示す。非情報提供的標的は、バックグラウンドノイズレベルでほぼ0%を示す。情報提供的標的が共通の分布を共有しているという前提に基づいて、それぞれの標的の最も可能性の高い割り当てを推測するために、期待値最大化(EM)アルゴリズムを使用できる。「ベータ」分布などの分布を使用して、0と1との間の連続確率分布を与えることができる。すべての標的がバックグラウンドノイズ分布または胎児特異的比率のいずれかであると仮定すると、EMアルゴリズムは未知の標的分類を満たす。

40

【0084】

例えば、それぞれがコールされた胎児特異的パーセンテージを有する、10の標的のセットを検討されたい。最初の推測は、25番目未満のパーセンタイルをコールする任意の標的はバックグラウンドノイズであり、その他は半情報提供的である。その場の最初の推測でEMが始まり得る。次に、最大化ステップを実施する。ベータ分布モデルなどの分布モデルをそれぞれの点群にフィッティングし、データ点の対数尤度関数の2次元モデルへ

50

の合計を最小にする。ベータ分布を2つの形状パラメータによって定義する。合計で、4つの形状パラメータを収集する(1つの標的情報提供的な群につき2つ)。非天然%の最大尤度の推定は、半情報提供的な群のベータモデルの平均の2倍に等しい。次の予測ステップでは、すべての標的が評価されて、それぞれが所属する可能性が高い群を見つける。標的は、どちらのモデルがより高い可能性を有するかに基づいて、非情報提供的なまたは半情報提供的な群に再割り当てする。任意の標的が群を変更した場合、最大化ステップを繰り返し、再び予想ステップが続く。収束すると、EMは完了し、すべての標的および最終モデルパラメータの最大尤度の情報提供的な分類をレポートする。

【0085】

遺伝子型を推測する例を図3および4に提供する。ここで、EMを使用して父の遺伝子型が知られていない胎児特異的な算出を決定した。方法は、非情報提供的な部位と半情報提供的な部位とを区別することができた。次いでこれらを2倍して胎児のフラクシオンを決定する。

さらに、本明細書で提供される方法は、胎児フラクシオンと胎児健康とを相関させる結果を提供することが見い出された。例えば、本明細書で提供される方法を使用して、低胎児フラクシオンが胎児死亡対象と相関していた。10週の胎児妊娠年齢の後に、1~10%の胎児フラクシオンが発達病理を示したことも見出した。図7は、異なる試料の胎児フラクシオンを示す散布図を提供する。母親試料を、示された妊娠の週(12~39週)に採取して、胎児フラクシオンを算出して、本明細書で記載される方法を使用して、父親の遺伝子型を推定した。次いで、パーセント胎児フラクシオンを、超音波結果と比較して、胎児妊娠10週齢以降の10%以下の胎児フラクシオンが、発達性病理を示すことを見出した。

【0086】

例3 - MOMA cf - DNAアッセイ

MOMA cf - DNAアッセイの原理と手順

この例示的アッセイは、移植レシピエントの血液試料中に存在する非天然cf - DNAのパーセンテージを決定するために設計される。この態様において、母親の血液試料をEDTAチューブに収集し、遠心分離して血漿とパフィーコートを分離する。血漿およびパフィーコートを2つの別個の15mLコニカルチューブに等分し、凍結させることができる。血漿試料は定量的遺伝子型決定(qGT)に使用することができ、パフィーコートは母親試料の基本的遺伝子型決定(bGT)に使用することができる。

プロセスの第1ステップは、血漿試料から無細胞DNA(qGTに使用される)を、パフィーコート、全血、または組織試料からゲノムDNA(gDNA)(bGTに使用される)を、抽出することであり得る。cfDNAの全量は、qPCRによって決定し、標的濃度に対して標準化することができる。このプロセスはcfDNA定量として知られている。UV分光光度法を使用してgDNAを定量し、標準化することができる。15ngのDNAは、一般に正確で有効な結果を提供する。

【0087】

標準化された患者のDNAは、例えばそれぞれがMOMA標的部位の1つを含む領域を増幅する96のプライマー対を含有する高度に多重化されたライブラリーPCR増幅への入力として使用することができる。得られたライブラリーは、MOMA標的プライマーおよびプローブ部位を有するPCRアンプリコンからなるため、bGTまたはqGTアッセイのいずれかのための入力として使用することができる。このステップは、高度に特異的なqPCR増幅の前にそれぞれの標的のコピー数を増加させることによって、アッセイ全体の感度を向上させることができる。対照とキャリブレーター/スタンダードは、多重ライブラリーを使用して対象の試料とともに増幅することができる。ライブラリー増幅の後、下流の増幅への干渉を防ぐために、過剰のプライマーおよび組み込まれていないデオキシヌクレオチド三リン酸(dNTP)を除去するために酵素的クリーンアップを行うことができる。

平行したワークフローで、マスターミックスを調製し、384ウェルPCRプレートに

移すことができる。次いで、増幅された試料、対照、およびキャリブレーター / スタンダードを、ライブラリー希釈緩衝剤で所定の体積および濃度に希釈することができる。希釈された試料および対照は、6 ウェルのリザーバープレートに等分し、アコースティック液体ハンドラー (acoustic liquid handler) を使用して 384 ウェル P C R プレートに移すことができる。次いで、プレートを密封し、リアルタイム P C R 増幅および検出システムに移すことができる。

【0088】

M O M A は、情報提供的であり得る両アレル S N P などの S N V を標的とすることにより、基本的小および定量的遺伝子型決定分析の両方を実施することができる。基本的遺伝子型決定は、レシピエントおよびドナーに、それぞれの標的 (例えば、ホモ接合性 R E F、ヘテロ接合性 R E F および V A R、およびホモ接合性 V A R) における3つの可能な遺伝子型を標識することができる。この情報は、標準曲線と共に定量的遺伝子型決定に使用して、それぞれの標的のアレル比率を定量することができ、これはマイナー種の割合として知られている。すべての情報提供的および品質管理されたアレル比率の中央値を使用して、胎児特異的 c f D N A の % を決定することができる。

10

【0089】

例4 - コンピュータで実施される態様の例

いくつかの態様において、上述の診断技術は、1つ以上のソフトウェアファシリティを実行する1つ以上の計算機器を介して実施され、経時的に対象の試料を分析し、試料中の核酸 (無細胞 D N A など) を測定し、1つ以上の試料に基づく診断結果を生み出すことができる。図8は、いくつかの態様が動作することができるコンピュータシステムの例を示しているが、態様は図8に示すタイプのシステムでの動作に限定されないことを理解されたい。

20

【0090】

図8のコンピュータシステムは、対象802から試料806を得ることができる対象802および臨床医804を含む。上記から理解されるように、試料806は、対象802のための任意の適切な生物学的材料の試料 (対象802の核酸 (無細胞 D N A など) の存在を測定するために使用され得、血液試料を含む) であり得る。試料806は分析装置808に提供することができ、これは、当業者が前述のことから理解するように、試料806を分析して、核酸 (無細胞 D N A など) の全量および試料806および / または対象802の非天然核酸 (無細胞 D N A など) の量を決定する (推定を含む)。図示を容易にするために、分析装置808は単一の装置として示されているが、分析装置808は、任意の適切な形態をとることができ、いくつかの態様において、複数の装置として実施することができることを理解されたい。試料806および / または対象802における核酸 (無細胞 D N A など) の量を決定するために、分析装置808は、上記の任意の技術を実施することができ、特定の分析を実施することに限定されない。分析装置808は、他のハードウェアを動作させ、他のハードウェアによって実施されるタスクの結果を受け取るようにプロセッサ (単数または複数) を駆動して、分析の全体的な結果 (試料806および / または対象802の核酸 (無細胞 D N A など) の量であってもよい) を決定するソフトウェアに実施された分析ファシリティを実行する1つ以上のプロセッサを含むことができる。分析ファシリティは、1つ以上のコンピュータ可読記憶媒体 (装置808のメモリーなど) に保存され得る。他の態様において、試料を分析するための本明細書に記載の技術は、特定用途向け集積回路 (A S I C) などの1つ以上の専用コンピュータ構成要素、またはソフトウェア実施の代わりになり得る他の適切な形態のコンピュータ構成要素で部分的または全体的に実行され得る。

30

40

【0091】

いくつかの態様において、臨床医804は、試料806を分析装置808に直接提供することができる。対象802から試料806を得ることに加えて装置808を作動させることができ、他の態様において、装置808は臨床医804および対象802から地理的に離れていてもよく、試料806は出荷され得、または分析装置808に場所へ転送され得

50

る。いくつかの態様において、試料 8 0 6 は、試料 8 0 6 が得られた日付および / または時間に関する試料 8 0 6 および / または対象 8 0 2、または試料 8 0 6 を記載または同定する他の情報の識別子（例えば、任意の適切なインターフェースを介した入力）とともに分析装置 8 0 8 に提供される。

【 0 0 9 2 】

分析装置 8 0 8 は、いくつかの態様において、試料 8 0 6 に対して実行された分析の結果を、データベースまたは他の適切なデータストアとして実施され得るデータストア 8 1 0 A を含み得る計算機器 8 1 0 に提供するように構成され得る。いくつかの態様において、計算機器 8 1 0 は、クラウドサービスプロバイダなどの分散計算プラットフォームの 1 つ以上の物理的および / または仮想的な機械を含む 1 つ以上のサーバとして実施され得る。他の態様において、装置 8 1 0 は、デスクトップまたはラップトップパーソナルコンピュータ、スマート携帯電話、タブレットコンピュータ、専用ハードウェア装置、または他の計算機器として実施することができる。

いくつかの態様において、分析装置 8 0 8 は、その分析の結果を、インターネットを含む 1 つ以上の有線および / または無線、ローカルおよび / またはワイドエリアコンピュータ通信ネットワークを介して装置 8 1 0 に通信することができる。分析の結果は、任意の適切なプロトコルを使用して通信されてもよく、試料 8 0 6 および / または対象 8 0 2 の識別子、または試料 8 0 6 が得られた日付および / または時間など、試料 8 0 6 を記載または同定する情報とともに通信され得る。

【 0 0 9 3 】

計算機器 8 1 0 は、本明細書に記載の診断技術を実行するためのプロセッサ（単数または複数）を駆動し得るソフトウェアに実施された診断ファシリティを実行するための 1 つ以上のプロセッサを含むことができる。診断ファシリティは、装置 8 1 0 のメモリなどの 1 つ以上のコンピュータ可読記憶媒体に保存することができる。他の態様において、試料を分析するための本明細書に記載された技術は、特定用途向け集積回路（ASIC）などの 1 つ以上の専用コンピュータ構成要素、またはソフトウェア実施の代わりになり得る他の任意の適切な形態のコンピュータ構成要素で部分的または全体的に実施することができる。

【 0 0 9 4 】

診断ファシリティは、分析の結果および試料 8 0 6 を記載または同定する情報を受け取り、その情報をデータストア 8 1 0 A に保存することができる。情報は、対象 8 0 2 の以前の試料に関する情報が診断ファシリティによって以前に受信され、保存されている場合など、対象 8 0 2 の他の情報に関連して、データストア 8 1 0 A に保存されてもよい。複数の試料に関する情報は、対象 8 0 2 の識別子などの共通の識別子を使用して関連付けることができる。いくつかの場合において、データストア 8 1 0 A は、複数の異なる対象について情報を含むことができる。

【 0 0 9 5 】

診断ファシリティはまた、対象 8 0 2 の診断を決定するために、ユーザ入力によって特定された特定の対象 8 0 2 に対する 1 つ以上の試料 8 0 6 の分析の結果を分析するように動作されてもよい。診断は、対象 8 0 2 が特定の状態を有している、有し得る、または将来的に発症し得るというリスクの結論であってもよい。診断ファシリティは、特定の試料 8 0 6 について決定された核酸（無細胞 DNA など）の量を 1 つ以上の閾値と比較すること、または試料 8 0 6 について経時的に決定された核酸（無細胞 DNA など）の量の経時的な変化を 1 つ以上の閾値と比較することを含む、上記の様々な例のいずれかを使用して診断を決定することができる。例えば、診断ファシリティは、1 つ以上の試料 8 0 6 に対する核酸（無細胞 DNA など）の量を閾値と比較することによって、ある状態の対象 8 0 2 に対するリスクを決定することができる。閾値との比較に基づいて、診断ファシリティは、ある状態の対象 8 0 2 に対するリスクを示す出力を生成することができる。

【 0 0 9 6 】

前述から理解されるように、いくつかの態様において、核酸（無細胞 DNA など）の量

10

20

30

40

50

を比較することができる異なる閾値で診断ファシリティを構成することができる。異なる閾値は、例えば、異なる人口統計学的群（年齢、性別、人種、経済的クラス、病歴における特定の処置／状態／他の有無、または他の人口統計学的分類）、異なる状態、および／または他のパラメータまたはパラメータの組み合わせに対応する。かかる態様において、診断ファシリティは、計算機器 810 のメモリに保存された異なる閾値を用いて、核酸（無細胞 DNA など）の量と比較される閾値を選択するように構成することができる。したがって、選択は、人口統計学的群に基づいて閾値が異なる態様における対象 802 の人口統計学的情報に基づき、これらの場合、対象 802 の人口統計学的情報は、診断ファシリティに提供されるか、または対象 802 の識別子を使用する診断ファシリティによって（別の計算機器、またはデータストア 810 A と同じかまたは異なるデータストア、または任意の他の適切な供給源から）回収される。選択は、追加的または代替的に、リスクが決定されるべき条件に基づいてもよく、診断ファシリティは、リスク受信を入力として条件を決定する前に、リスクの決定の基礎となる閾値を選択する条件を使用することができる。診断ファシリティは、複数の閾値がサポートされる態様において、任意の特定の 방법으로閾値を選択することに限定されないことを理解されたい。

10

20

30

40

50

【0097】

いくつかの態様において、診断ファシリティは、リスクの診断および／または対象 802 の診断のための基礎を含むユーザインターフェースをユーザに提示するために出力するように構成されてもよい。診断の基礎は、例えば、対象 802 について 1 つ以上の試料 806 に検出された核酸（無細胞 DNA など）の量を含み得る。いくつかの態様において、ユーザインターフェースは、上述の結果、値、量、グラフなどの任意の例を含み得る。それらは経時的な結果、値、量などを含み得る。例えば、いくつかの態様において、ユーザインターフェースは、本明細書で提供される図のいずれか 1 つに示されるものと同様のグラフを組み込むことができる。かかる場合、グラフには、グラフに表示されたデータの分析から生成され得る異なる診断に、グラフの異なる領域がどのように対応しているかをユーザに示すために注釈を付けることができる。例えば、グラフ化データと比較して分析を決定し得る閾値をグラフ（単数または複数）に課すことができる。

【0098】

グラフ、特に線および／または影を有するグラフを含むユーザインターフェースは、核酸（無細胞 DNA など）の量に基づいて対象 802 のリスクを決定するための、他のユーザインターフェースを介して提供され得るものよりも、より直感的で迅速なレビューインターフェースをユーザに提供し得る。しかしながら、態様は、任意の特定のユーザインターフェースで実施されることに限定されないことを理解されたい。

いくつかの態様において、診断ファシリティは、対象 802 および／または臨床医 804 または別の臨床医であり得る臨床医によって操作され得る 1 つ以上の他の計算機器 814（装置 814 A、814 B を含む）に診断またはユーザインターフェースをアウトプットし得る。診断ファシリティは、ネットワーク（単数または複数）812 を介して診断および／またはユーザインターフェースをデバイス 814 に送信することができる。

【0099】

本明細書で説明される原理に従って動作する技術は、任意の適切な方法で実施されてもよい。上記の議論には、核酸（無細胞 DNA など）の量の分析に基づく状態のリスクを決定する様々なプロセスのステップおよび動作を示す一連のフローチャートが含まれている。上述の処理ブロックおよび決定ブロックは、これらの様々なプロセスを実行するアルゴリズムに含まれ得るステップおよび動作を表す。これらのプロセスから導出されたアルゴリズムは、1 つ以上の単一または多目的プロセッサの動作に統合され、その動作を指示するソフトウェアとして実施されてもよく、デジタル信号処理（DSP）回路または特定用途向け集積回路（ASIC）などの機能的に等価な回路として実施されてもよく、あるいは他の適切な方法で実施することができる。態様は、任意の特定の回路または任意の特定のプログラミング言語またはプログラミング言語のタイプの任意の特定の構文または動作に限定されないことを理解されたい。むしろ、当業者であれば、上記の説明を使用して回

路を製作するか、または本明細書で説明したタイプの技術を実行する特定の装置の処理を実行するコンピュータソフトウェアアルゴリズムを実施することができる。本明細書で別段の指示がない限り、上述のステップおよび/または動作の特定のシーケンスは、本明細書に記載された原理の実施および態様において実施され、変更され得るアルゴリズムの単なる例示であることも理解されたい。

【0100】

したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載の技術は、アプリケーションソフトウェア、システムソフトウェア、ファームウェア、ミドルウェア、埋め込みコード、または任意の他の適切なタイプのコンピュータコードを含む、ソフトウェアとして実施されるコンピュータ実行可能命令で実行することができる。かかるコンピュータ実行可能命令は、任意の多数の適切なプログラミング言語および/またはプログラミングツールまたはスクリプトツールを使用して記述することができ、フレームワークまたは仮想機械上で実行される実行可能な機械言語コードまたは中間コードとしてコンパイルすることもできる。

10

【0101】

本明細書で説明される技術がコンピュータ実行可能命令として実行されるとき、これらのコンピュータ実行可能命令は、これらの技術に従って動作するアルゴリズムの実行を完了する1つ以上の動作をそれぞれ提供する多数の機能的ファシリティを含む任意の適切な方法で実施され得る。「機能的ファシリティ」は、例えば、1つ以上のコンピュータと統合され、実行されると、1つ以上のコンピュータに特定の動作上の役割を実施させるコンピュータシステムの構造的な構成要素である。機能的ファシリティは、ソフトウェア要素の一部または全部であってもよい。例えば、機能的ファシリティは、プロセスの機能として、または個別プロセスとして、または任意の他の適切な処理のユニットとして実施されてもよい。本明細書に記載された技術が複数の機能ファシリティとして実施される場合、それぞれの機能ファシリティはそれ自身の方法で実施されてもよく、すべて同じ方法で実施する必要はない。さらに、これらの機能的ファシリティは、必要に応じて並列および/または直列に実行することができ、それらが実行しているコンピュータ(単数または複数)上の共有メモリを使用して、メッセージパッシングプロトコルまたは他の適切な方法を使用して、互いに情報を渡し得る。

20

【図 1】

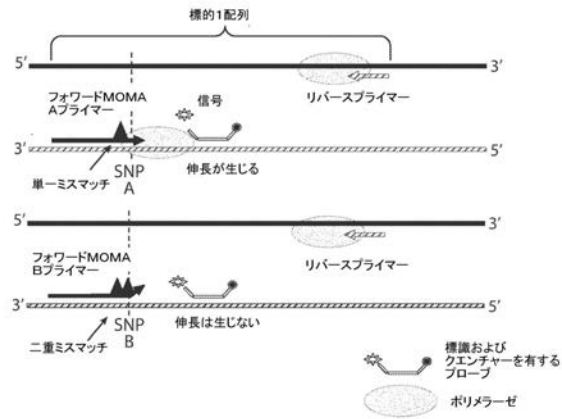


図 1

【図 2】

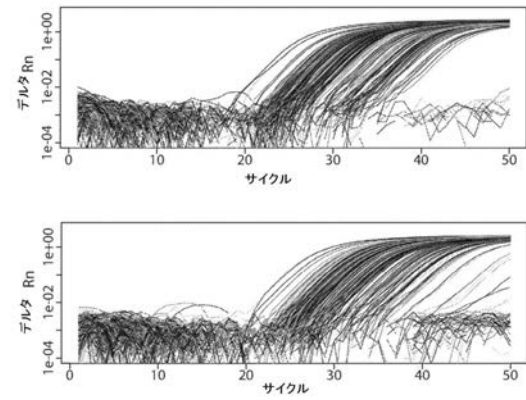


図 2

【図 3】

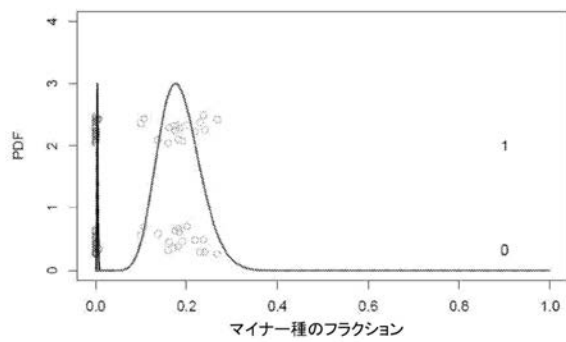


図 3

【図 5】

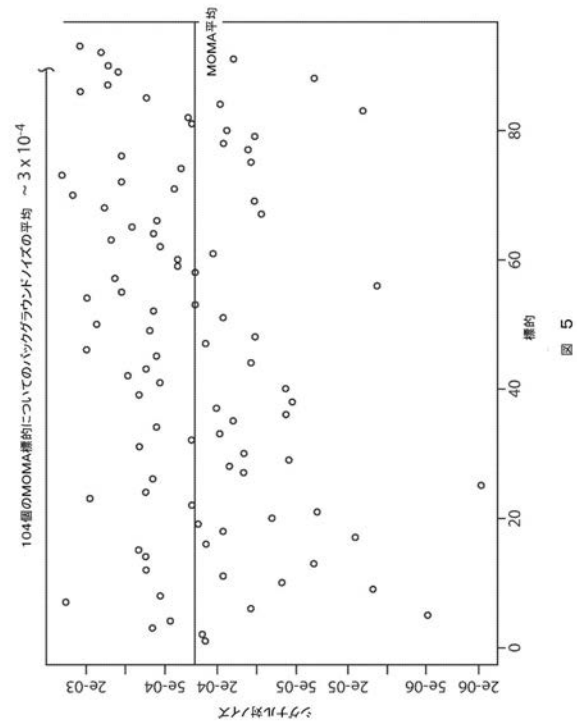


図 5

【図 4】

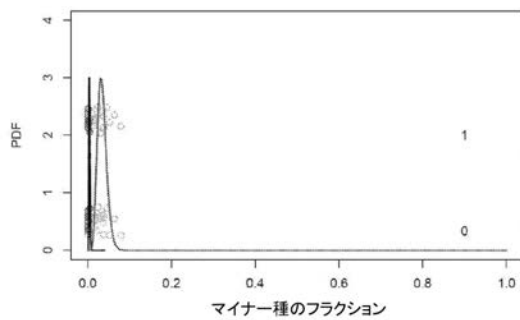
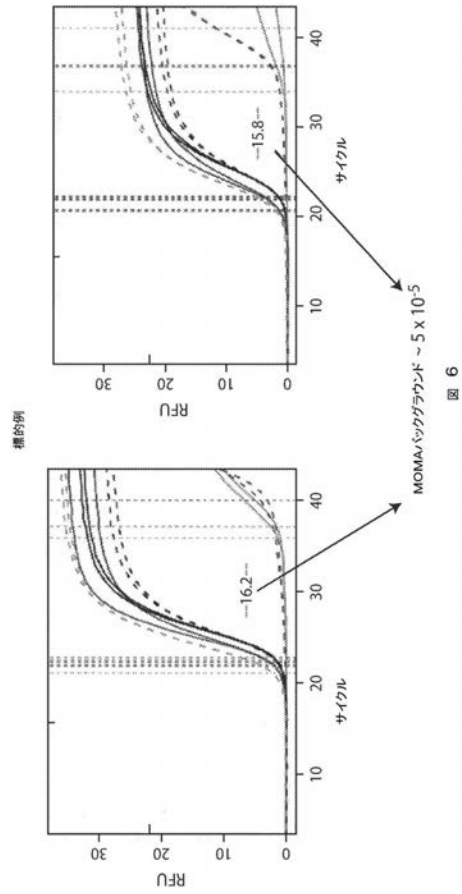
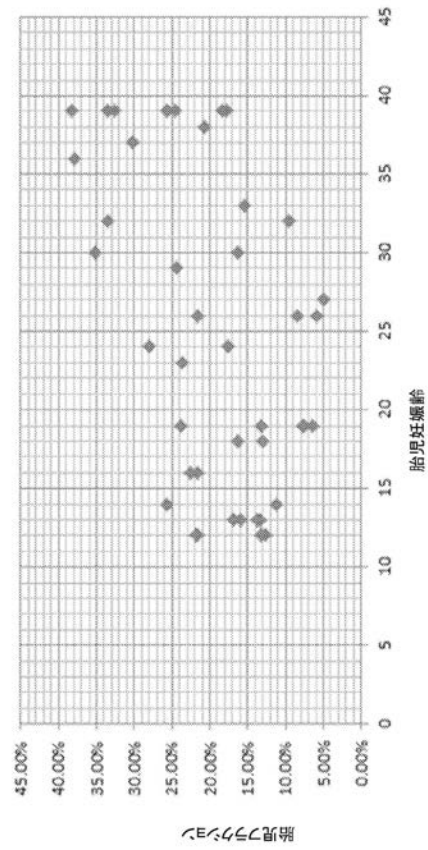


図 4

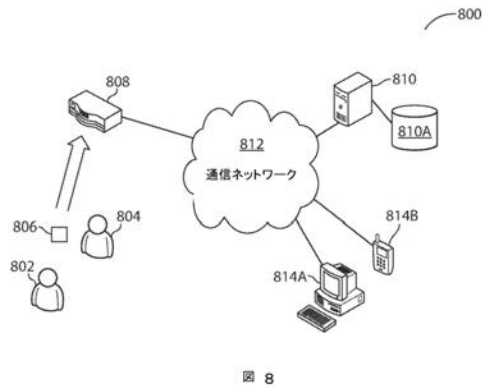
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 17/30292																								
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12Q 1/68 (2017.01) CPC - C12Q 1/6886, C12Q 1/686, C12Q 1/6851, C12Q 1/6806																										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																										
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document																										
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%; padding: 5px;">Category*</th> <th style="width: 70%; padding: 5px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%; padding: 5px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">X</td> <td style="padding: 5px;">Manage et al. "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms in Human Genomic DNA with an Automated and Self-Contained PCR Cassette" J Mol Diagn. 2014; 16(5):550-557 (doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.004) pg 551, col 1, para 2; pg 552, col 1, para 2; pg 556, col 2, para 2-3; Fig. 1; Table 1</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">45-48, 50-54</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">Y</td> <td style="padding: 5px;">US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Bai et al. "Detection and Quantification of Heteroplasmic Mutant Mitochondrial DNA by Real-Time Amplification Refractory Mutation System Quantitative PCR Analysis: A Single-Step Approach" Molecular Diagnostics and Genetics, 2004; 50(6):996-1001 (doi: 10.1373/di.chem.2004.031153) whole document</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7, 45-48, 50-54</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">Wilkins et al. "IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for Anopheles gambiae species identification, Mopli and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in Anopheles arabiensis" Malaria Journal, 2006; 5:125 (doi: 10.1186/1475-2875-5-125) whole document</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7, 45-48, 50-54</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">WO 2015/178978 A2 (The Board Of Regents Of The University Of Texas System) 26 November 2015 (26.11.2015) whole document</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7, 45-48, 50-54</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; vertical-align: top; padding: 5px;">A</td> <td style="padding: 5px;">US 2015/0056617 A1 (Whitt et al.) 26 February 2015 (26.02.2015) whole document</td> <td style="vertical-align: top; padding: 5px;">1-7, 45-48, 50-54</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Manage et al. "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms in Human Genomic DNA with an Automated and Self-Contained PCR Cassette" J Mol Diagn. 2014; 16(5):550-557 (doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.004) pg 551, col 1, para 2; pg 552, col 1, para 2; pg 556, col 2, para 2-3; Fig. 1; Table 1	45-48, 50-54	Y	US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]	1-7	Y	US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]	1-7	A	Bai et al. "Detection and Quantification of Heteroplasmic Mutant Mitochondrial DNA by Real-Time Amplification Refractory Mutation System Quantitative PCR Analysis: A Single-Step Approach" Molecular Diagnostics and Genetics, 2004; 50(6):996-1001 (doi: 10.1373/di.chem.2004.031153) whole document	1-7, 45-48, 50-54	A	Wilkins et al. "IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for Anopheles gambiae species identification, Mopli and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in Anopheles arabiensis" Malaria Journal, 2006; 5:125 (doi: 10.1186/1475-2875-5-125) whole document	1-7, 45-48, 50-54	A	WO 2015/178978 A2 (The Board Of Regents Of The University Of Texas System) 26 November 2015 (26.11.2015) whole document	1-7, 45-48, 50-54	A	US 2015/0056617 A1 (Whitt et al.) 26 February 2015 (26.02.2015) whole document	1-7, 45-48, 50-54
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																								
X	Manage et al. "Genotyping Single Nucleotide Polymorphisms in Human Genomic DNA with an Automated and Self-Contained PCR Cassette" J Mol Diagn. 2014; 16(5):550-557 (doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.004) pg 551, col 1, para 2; pg 552, col 1, para 2; pg 556, col 2, para 2-3; Fig. 1; Table 1	45-48, 50-54																								
Y	US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]	1-7																								
Y	US 2013/0231252 A1 (Mitchell et al.) 05 September 2013 (05.09.2013) para [0012]-[0013]; [0018]	1-7																								
A	Bai et al. "Detection and Quantification of Heteroplasmic Mutant Mitochondrial DNA by Real-Time Amplification Refractory Mutation System Quantitative PCR Analysis: A Single-Step Approach" Molecular Diagnostics and Genetics, 2004; 50(6):996-1001 (doi: 10.1373/di.chem.2004.031153) whole document	1-7, 45-48, 50-54																								
A	Wilkins et al. "IMP PCR primers detect single nucleotide polymorphisms for Anopheles gambiae species identification, Mopli and Savanna rDNA types, and resistance to dieldrin in Anopheles arabiensis" Malaria Journal, 2006; 5:125 (doi: 10.1186/1475-2875-5-125) whole document	1-7, 45-48, 50-54																								
A	WO 2015/178978 A2 (The Board Of Regents Of The University Of Texas System) 26 November 2015 (26.11.2015) whole document	1-7, 45-48, 50-54																								
A	US 2015/0056617 A1 (Whitt et al.) 26 February 2015 (26.02.2015) whole document	1-7, 45-48, 50-54																								
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.																										
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																						
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																									
Date of the actual completion of the international search 05 July 2017		Date of mailing of the international search report 03 AUG 2017																								
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774																								

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/30292

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 8-44, 49, 55-67
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(72)発明者 スタム, カール

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53213、ウォーワトサ、エヌ・グレンビュー アヴェニュー 868、 103

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ42 QR08 QR55 QR62 QS10 QS25 QS36
QX02