

【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7年4月1日(2025.4.1)

【国際公開番号】WO2022/204730

【公表番号】特表2024-511425(P2024-511425A)

【公表日】令和6年3月13日(2024.3.13)

【年通号数】公開公報(特許)2024-047

【出願番号】特願2023-558179(P2023-558179)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/06(2006.01)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01)

【F I】

C 1 2 Q 1/06

C 1 2 Q 1/6869 Z

10

【手続補正書】

【提出日】令和7年3月24日(2025.3.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

20

【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】

試料中のDNAを解析する方法であって、

a) 前記DNAを、前記DNA中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数の、第1の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有するDNAを含む、ステップ；

30

b) 前記複数の部分試料のうちの一つまたは複数からのDNAをシーケンシングするステップ；ならびに

c) DNA配列のレベルを検出して、前記DNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップであって、前記複数の免疫細胞タイプが、

i. ナイープリンパ球および活性化されたリンパ球；

ii. 単球およびマクロファージ；または

iii. 骨髄球、好中球、および好酸球

を含む、ステップ

を含む、方法。

【請求項2】

40

試料中のDNAを解析する方法であって、

a) 前記DNAを、前記DNA中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数の、第1の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有するDNAを含む、ステップ；

b) 前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記DNAを、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的的特異的プローブと接触させることを含み、前記エピジェネティック標的領域セットの前記標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化されるDNA配列を含み、前記複数の

50

免疫細胞タイプが、

- i . ナイープリンパ球および活性化されたリンパ球；
- i i . 単球およびマクロファージ；または
- i i i . 骨髄球、好中球、および好酸球

を含み、それによって、捕捉されたDNAを提供する、ステップ；ならびに

c ) 前記捕捉されたDNAをシーケンシングし、前記DNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々のレベルを決定するステップを含む、方法。

【請求項3】

前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記エピジェネティック標的領域セットの前記標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化されるDNA配列を含み、前記捕捉するステップが、前記シーケンシングするステップの前に実施される、ステップ、を含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項4】

(a) 前記エピジェネティック標的領域セットが、高メチル化可変標的領域セットおよび低メチル化可変標的領域セットを含む、ならびに/または

(b) 前記捕捉するステップが、配列可変標的領域を捕捉することを含み、例えば、前記捕捉するステップが、前記DNAを、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的的特異的プローブおよび前記配列可変標的領域に対して特異的な標的的特異的プローブと接触させることを含む、

20

請求項2または請求項3に記載の方法。

【請求項5】

(a) 前記複数の免疫細胞タイプが、ナイープリンパ球および活性化されたリンパ球を含み、例えば、前記複数の免疫細胞タイプが、ナイーブT細胞、ナイーブB細胞、エフェクターCD4 T細胞、エフェクターCD8 T細胞、Treg細胞、形質細胞、およびメモリー細胞を含み、例えば、前記エフェクターCD4 T細胞が、エフェクターメモリーCD4 T細胞およびセントラルメモリーCD4 T細胞を含み、前記エフェクターCD8 T細胞が、エフェクターメモリーCD8 T細胞およびセントラルメモリーCD8 T細胞を含む、

30

(b) 前記複数の免疫細胞タイプが、単球およびマクロファージを含む、

(c) 前記複数の免疫細胞タイプが、骨髄球、好中球、および好酸球を含み、例えば、前記複数の免疫細胞タイプが、後骨髄球を含む、ならびに/または

(d) 前記複数の免疫細胞タイプが、ナチュラルキラー(NK)細胞を含む、

先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

(a) 前記複数の免疫細胞タイプの各々のレベルが、総血液細胞のレベルと比較して決定される、

(b) 前記試料が血液試料、血漿試料であるか、もしくは組織試料から得られ、例えば、前記組織試料が、生検、微細針吸引物、もしくはホルマリン固定パラフィン包埋組織試料である、および/または

40

(c) 前記DNAが、無細胞DNA(cfDNA)を含むか、もしくは前記DNAが、前記試料中に本来存在するインタクトな細胞から単離されたDNAを含む、

先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

(a) 前記複数の免疫細胞タイプの前記決定されたレベルもしくは量に基づいて、免疫細胞タイプのレベルもしくは量の比率、例えば、

(i) 前記比率の分子が、好中球、単球、もしくは好中球および単球の両方のレベルもしくは量を含む、

(i i) 前記比率の分母が、T細胞、B細胞、NK細胞、もしくは総リンパ球のレベ

50

ルもしくは量を含む、

\_\_\_\_ ( i i i ) 前記比率の分子が、好中球のレベルまたは量を含み、前記比率の分母が、総リンパ球のレベルもしくは量を含む、ならびに / または

\_\_\_\_ ( i v ) 前記比率の分子が、単球のレベルもしくは量を含み、前記比率の分母が、T細胞のレベルまたは量を含む、  
比率、

\_\_\_\_ ( b ) 前記複数の免疫細胞タイプのうち少なくとも1つのターンオーバーの頻度、例えば、

\_\_\_\_ ( i ) 前記ターンオーバーが、増殖を含む、もしくは

\_\_\_\_ ( i i ) 前記ターンオーバーが、アポトーシスを含む、

頻度、ならびに / または

\_\_\_\_ ( c ) 前記DNAが起源とする免疫細胞タイプ以外の少なくとも1つの細胞タイプのレベル、例えば、

\_\_\_\_ ( i ) 前記方法が、前記試料もしくは部分試料中の全ての他の細胞タイプを起源とするDNA中の同じ標的領域と比較して、免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプを起源とするDNA中の標的領域において配列非依存的な差を含む少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップを含む、および / または

\_\_\_\_ ( i i ) 免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプが、血液細胞タイプではない、例えば、免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプが、結腸直腸、肺、乳房、前立腺、皮膚、胃、膀胱、肝臓、卵巣、膵臓、扁平上皮、唾液腺、喉頭、下咽頭、鼻、副鼻腔、鼻咽頭、もしくは腎臓である、

レベル

を決定するステップを含む、

直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

前記試料が、対象から得られる試料であり、必要に応じて、DNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々の量、またはDNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々のレベルは、前記対象が以下

\_\_\_\_ ( a ) がんまたは前がん、例えば、

\_\_\_\_ ( i ) 前記がんが、免疫細胞タイプのがんであり、例えば、前記がんがリンパ球性がんであり、および / または前記がんが、白血病、リンパ腫、もしくは骨髄腫である、

\_\_\_\_ ( i i ) 前記がんが骨髄性がんである、

\_\_\_\_ ( i i i ) 前記がんが、免疫細胞タイプ以外の細胞もしくは組織タイプのがんである、

\_\_\_\_ ( i v ) 前記がんもしくは前がんが、血液学のがんもしくは前がん以外のがんもしくは前がんであるか、または前記がんもしくは前がんが固形腫瘍がんであり、必要に応じて、前記固形腫瘍がんが、癌腫もしくは肉腫である、

\_\_\_\_ ( v ) 前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、膵臓がん、頭頸部がん、もしくは腎臓がんである、

\_\_\_\_ ( v i ) 前記前がんが腺腫であり、例えば、前記腺腫が、進行した腺腫である、または

\_\_\_\_ ( v i i ) 前記前がんが、結腸直腸前がん、肺前がん、乳房前がん、前立腺前がん、皮膚前がん、胃前がん、膀胱前がん、肝臓前がん、卵巣前がん、膵臓前がん、頭頸部前がん、もしくは腎臓前がんである、

がんまたは前がん、

\_\_\_\_ ( b ) 感染症、ならびに / または

\_\_\_\_ ( c ) 移植片拒絶

を有する可能性の指標であり、必要に応じて、前記複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定する前記ステップまたは前記シーケンシングするステップが、複数のシーケンシング読み取りデータを生成することを含み、前記方法が、前記複数の配列読み取りデータを、1つまたは複数の参照配列にマッピングして、マッピングされた配列読み取りデータを生成するステップ、ならびに前記マッピングされた配列読み取りデータをプロセッシングして、

10

20

30

40

50

前記対象ががん、前がん、感染症または移植片拒絶を有する可能性の指標を決定するステップをさらに含む、

直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記試料が、がんを有すると以前に診断されており、1つまたは複数の以前のがん処置を受けている対象から得られる試料であり、必要に応じて、前記試料が、前記1つまたは複数の以前のがん処置後の1つまたは複数の事前に選択された時点で得られる試料であり、前記方法は、必要に応じて、

(a) がん再発スコアを、前記対象のがん再発ステータスの指標として決定するステップをさらに含み、必要に応じて、前記対象の前記がん再発ステータスが、前記がん再発スコアが既定の閾値もしくはそれより上であると決定される場合にがん再発のリスクがあると示されるか、または前記対象の前記がん再発ステータスが、前記がん再発スコアが前記既定の閾値より下である場合にがん再発のリスクがより低いと示される、および、必要に応じて、

10

(b) 対象がその後のがん処置の候補である指標として、前記対象の前記がん再発スコアを、既定のがん再発閾値と比較するステップをさらに含み、前記対象が、前記がん再発スコアが前記がん再発閾値より上である場合、その後のがん処置の候補であると示されるか、または前記がん再発スコアが前記がん再発閾値より下である場合、その後のがん処置の候補ではないと示される、

直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 10】

(a) 前記改変シトシンがメチルシトシンである、

(b) 改変シトシンを認識する前記作用剤がメチル結合試薬であり、例えば、前記メチル結合試薬が抗体であるか、または改変シトシンを認識する前記作用剤が、メチル結合タンパク質であるか、もしくはメチル結合ドメインを含み、例えば、

(i) 前記メチル結合試薬が、5-メチルシトシンを特異的に認識する、および/もしくは

(ii) 前記メチル結合試薬が、固体支持体上に固定化される、

(c) 前記分配するステップが、メチル化DNAの免疫沈降を含む、ならびに/または

(d) 前記分配するステップが、タンパク質への結合に基づいて分配することを含み、

30

(i) 必要に応じて、前記タンパク質が、メチル化されたタンパク質、アセチル化されたタンパク質、非メチル化タンパク質、非アセチル化タンパク質であり；および/もしくは必要に応じて、前記タンパク質がヒストンである、ならびに/または

(ii) 必要に応じて、前記分配するステップが、前記試料の前記DNAを、前記タンパク質に対して特異的であり、固体支持体上に固定化された結合試薬と接触させることを含む、

直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

少なくとも1つの部分試料を、前記捕捉するステップまたは前記シーケンシングするステップの前に、制限酵素と接触させるステップを含み、必要に応じて、前記接触させるステップが、前記試料を前記複数の部分試料に分配した後に行われ、例えば、

40

(a) 前記制限酵素がMDREであり、例えば、前記第2の部分試料が、前記MDREと接触させられる、および/または

(b) 前記制限酵素がMSREであり、例えば、前記第1の部分試料が、前記MSREと接触させられる、

直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

(a) 前記方法は、アダプターを前記DNAにライゲーションし、それによって、アダプターライゲーションしたDNAを産生するステップを含み、必要に応じて、前記アダプターライゲーションしたDNAが、前記シーケンシングするステップの前に増幅される、お

50

よび/または

（b）前記部分試料が、前記シーケンシングするステップの前にプールされる、直前に先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化されるDNA配列を含む低メチル化可変標的領域を含み、例えば、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記DNA配列が、

（a）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、

（b）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、

（c）1つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、

（d）1つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、

（e）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも1つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含み、前記試料中の少なくとも1つの非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、または

（f）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも1つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含み、前記試料中の任意の非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含み、

例えば、前記検出可能に低い程度のメチル化が、

（i）前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも1つ少ないメチル化シトシン、

（i i）前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも2つ少ないメチル化シトシン、

（i i i）前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも3つ少ないメチル化シトシン、

（i v）前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも4つ少ないメチル化シトシン、または（v）前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも5つまたはそれよりも少ないメチル化シトシン

である、請求項2～12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化されるDNA配列を含む高メチル化可変標的領域を含み、例えば、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記DNA配列が、

（a）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含むか、

（b）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含むか、

（c）1つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含むか、

（d）1つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含むか、

（e）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも1つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含み、前記試料中の少なくとも1つの非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含むか、または

（f）少なくとも1つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも1つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含み、前記試料中の任意の非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い

10

20

30

40

50

程度のメチル化を含み、

例えば、前記検出可能に高い程度のメチル化が、

( i ) 前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 1 つ多いシトシンメチル化、

( i i ) 前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 2 つ多いシトシンメチル化

( i i i ) 前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 3 つ多いシトシンメチル化

( i v ) 前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 4 つ多いシトシンメチル化、または

( v ) 前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 5 つ多いまたは 5 つよりも多いシトシンメチル化

である、

請求項 2 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 1 5】

( a ) 赤血球もしくは赤血球前駆体、および / または

( b ) 顆粒細胞

を起源とする前記試料中の DNA の量を決定するステップ、またはそのレベルを検出するステップを含む、先行する請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記検出可能に低いまたは高い程度のメチル化が、別の群のドナーと比較して、少なくとも 1 つの群のドナー由来の試料中に存在し、必要に応じて、前記少なくとも 1 つの群のドナーが、治療に应答するがんを有し、前記別の群のドナーが、前記治療に应答しないがんを有する、請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 4 5 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 4 5 1】

ビオチン化 RNA 標的的特異的プローブ ( DNA にハイブリダイズした ) を、ストレプトアビジン磁気ビーズによって捕捉し、塩に基づく一連の洗浄によって、捕捉されない増幅された DNA から分離し、それによって試料を富化する。富化後、富化された試料のアリコート、Illumina NovaSeq シーケンサーを使用してシーケンシングする。次いで、シーケンサーによって生成された配列読み取りデータを、バイオインフォマティックツール / アルゴリズムを使用して解析する。分子バーコードを、一意的分子を同定するため、ならびに差次的に分配された分子への試料のデコンボリューションのために使用する。配列可変標的領域配列を、真の腫瘍変異体を技術的エラー ( 例えば、PCR エラー、シーケンシングエラー ) から区別する十分な根拠でコールすることができるゲノム変更、例えば、SNV、挿入、欠失および融合を検出することによって解析する。エピジェネティック標的領域配列を、独立して解析して、正常細胞と比較して異なる免疫細胞においておよびがんにおいて差次的にメチル化されることが示された領域におけるメチル化 cf DNA 分子を検出する。最後に、両方の解析の結果を組み合わせ、試料が得られる対象におけるがんまたは前がんの可能性の最終的決定を生成する。

30

40

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

( 項目 1 )

試料中の cf DNA を解析する方法であって、

a ) 前記 cf DNA をシーケンシングし、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化される DNA 配列を含む複数の標的領域を含むエピジェネティック標的領域セットに関して、メチル化レベルを決定するステップ ; ならびに

b ) 前記メチル化レベルに基づいて、前記 cf DNA が起源とする複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップであって、前記複数の免疫細胞タイプが、

i . ナイーブリンパ球および活性化されたリンパ球 ;

i i . 単球およびマクロファージ ; または

50

i i i . 骨髄球、好中球、および好酸球  
を含む、ステップ  
を含む、方法。

(項目2)

試料中の c f D N A を解析する方法であって、

a) 前記 c f D N A またはその部分試料から、少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記 c f D N A またはその部分試料を、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的特異的プローブと接触させることを含み、前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化される D N A 配列を含む標的領域を含む、ステップ；

10

b) 前記標的領域に関してメチル化レベルを決定するステップ；ならびに

c) 前記 D N A が起源とする前記複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップであって、前記複数の免疫細胞タイプが、

    i . ナイーブリンパ球および活性化されたリンパ球；

    i i . 単球およびマクロファージ；または

    i i i . 骨髄球、好中球、および好酸球

を含む、ステップ

を含む、方法。

(項目3)

試料中の c f D N A を解析する方法であって、

a) 前記 c f D N A をシーケンシングし、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される D N A 配列を含む複数の低メチル化可変標的領域を含むエピジェネティック標的領域セットに関して、メチル化レベルを決定するステップ；および

20

b) 前記メチル化レベルに基づいて、前記 c f D N A が起源とする複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップ

を含む、方法。

(項目4)

試料中の c f D N A を解析する方法であって、

a) 前記 c f D N A またはその部分試料から、少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記 c f D N A またはその部分試料を、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的特異的プローブと接触させることを含み、前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される D N A 配列を含む低メチル化可変標的領域を含む、ステップ；

30

b) 前記標的領域に関してメチル化レベルを決定するステップ；および

c) 前記 D N A が起源とする前記複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップ

を含む、方法。

(項目5)

試料中の D N A を解析する方法であって、

a) 前記 D N A を、前記 D N A 中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有する D N A を含む、ステップ；

40

b) 前記複数の部分試料のうちの1つまたは複数からの D N A をシーケンシングするステップ；ならびに

c) D N A 配列のレベルを検出して、前記 D N A が起源とする複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定するステップであって、前記複数の免疫細胞タイプが、

    i . ナイーブリンパ球および活性化されたリンパ球；

    i i . 単球およびマクロファージ；または

    i i i . 骨髄球、好中球、および好酸球

50

を含む、ステップ

を含む、方法。

(項目6)

試料中のDNAを解析する方法であって、

a) 前記DNAを、前記DNA中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数が、第1の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有するDNAを含む、ステップ；

b) 前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記DNAを、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的的特異的プロローブと接触させることを含み、前記エピジェネティック標的領域セットの前記標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化されるDNA配列を含み、前記複数の免疫細胞タイプが、

i. ナイーブリンパ球および活性化されたリンパ球；

ii. 単球およびマクロファージ；または

iii. 骨髄球、好中球、および好酸球

を含み、それによって、捕捉されたDNAを提供する、ステップ；ならびに

c) 前記捕捉されたDNAをシーケンシングし、前記DNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々のレベルを決定するステップ

を含む、方法。

(項目7)

試料中のDNAを解析する方法であって、

a) 前記DNAを、前記DNA中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数が、第1の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有するDNAを含む、ステップ；

b) 前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットが、低メチル化可変標的領域セットを含み、それによって、捕捉されたDNAを提供する、ステップ；

c) 前記捕捉されたDNAをシーケンシングするステップ；ならびに

d) 捕捉されたDNA配列のレベルを検出し、前記DNAが起源とする複数の免疫細胞タイプの各々のレベルを決定するステップ

を含む、方法。

(項目8)

試料中のDNAを解析する方法であって、

a) 前記DNAを、前記DNA中の改変シトシンを認識する作用剤と接触させることによって、前記試料を複数の部分試料に分配するステップであって、前記複数が、第1の部分試料および第2の部分試料を含み、前記第1の部分試料が、前記第2の部分試料よりも大きい割合で前記改変シトシンを有するDNAを含む、ステップ；

b) 前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記DNAを、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的的特異的プロローブと接触させることを含み、前記エピジェネティック標的領域セットの前記標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて低メチル化されたDNA配列を含み、それによって、捕捉されたDNAを提供する、ステップ；ならびに

c) 前記捕捉されたDNAをシーケンシングするステップ

を含む、方法。

(項目9)

10

20

30

40

50

前記第1および第2の部分試料のうち少なくとも一方から、DNAの少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップであって、前記エピジェネティック標的領域セットの前記標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的にメチル化されるDNA配列を含み、前記捕捉するステップが、前記シーケンシングするステップの前に実施される、ステップ、を含む、項目5または7に記載の方法。

(項目10)

前記エピジェネティック標的領域セットが、高メチル化可変標的領域セットおよび低メチル化可変標的領域セットを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目11)

前記複数の免疫細胞タイプが、ナイーブリンパ球および活性化されたリンパ球を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目12)

前記複数の免疫細胞タイプが、ナイーブT細胞、ナイーブB細胞、エフェクターCD4 T細胞、エフェクターCD8 T細胞、Treg細胞、形質細胞、およびメモリー細胞を含む、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目13)

前記エフェクターCD4 T細胞が、エフェクターメモリーCD4 T細胞およびセントラルメモリーCD4 T細胞を含み、前記エフェクターCD8 T細胞が、エフェクターメモリーCD8 T細胞およびセントラルメモリーCD8 T細胞を含む、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目14)

前記複数の免疫細胞タイプが、単球およびマクロファージを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目15)

前記複数の免疫細胞タイプが、骨髄球、好中球、および好酸球を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目16)

前記複数の免疫細胞タイプが、後骨髄球を含む、直前に先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目17)

前記複数の免疫細胞タイプが、ナチュラルキラー(NK)細胞を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目18)

前記複数の免疫細胞タイプの各々のレベルが、総血液細胞のレベルと比較して決定される、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目19)

前記試料が血液試料である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目20)

前記試料が血漿試料である、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目21)

前記試料が、組織試料から得られる、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目22)

前記組織試料が、生検、微細針吸引物、またはホルマリン固定パラフィン包埋組織試料である、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目23)

前記DNAが、無細胞DNA(cfDNA)を含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目24)

前記DNAが、前記試料中に本来存在するインタクトな細胞から単離されたDNAを含む、項目5~23のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

( 項目 2 5 )

前記複数の免疫細胞タイプの前記決定されたレベルまたは量に基づいて、免疫細胞タイプのレベルまたは量の比率を決定するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 6 )

前記比率の分子が、好中球、単球、または好中球および単球の両方のレベルまたは量を含む、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 2 7 )

前記比率の分母が、T細胞、B細胞、NK細胞、または総リンパ球のレベルまたは量を含む、項目 2 5 または 2 6 に記載の方法。

( 項目 2 8 )

前記比率の分子が、好中球のレベルまたは量を含み、前記比率の分母が、総リンパ球のレベルまたは量を含む、項目 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 2 9 )

前記比率の分子が、単球のレベルまたは量を含み、前記比率の分母が、T細胞のレベルまたは量を含む、項目 2 5 ~ 2 7 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 0 )

前記複数の免疫細胞タイプのうち少なくとも1つのターンオーバーの頻度を決定するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 1 )

前記ターンオーバーが、増殖を含む、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 3 2 )

前記ターンオーバーが、アポトーシスを含む、項目 3 0 に記載の方法。

( 項目 3 3 )

前記DNAが起源とする免疫細胞タイプ以外の少なくとも1つの細胞タイプのレベルを決定するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 4 )

前記試料または部分試料中の全ての他の細胞タイプを起源とするDNA中の同じ標的領域と比較して、免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプを起源とするDNA中の標的領域において配列非依存的な差を含む少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットを捕捉するステップを含む、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 3 5 )

免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプが、血液細胞タイプではない、項目 3 3 または 3 4 に記載の方法。

( 項目 3 6 )

免疫細胞タイプ以外の前記細胞タイプが、結腸直腸、肺、乳房、前立腺、皮膚、胃、膀胱、肝臓、卵巣、膵臓、扁平上皮、唾液腺、喉頭、下咽頭、鼻、副鼻腔、鼻咽頭、または腎臓である、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 3 7 )

前記試料が、対象から得られる、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 3 8 )

前記対象ががんまたは前がんを有する可能性を決定するステップを含む、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 3 9 )

前記対象ががんを有する可能性を決定するステップを含む、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 4 0 )

前記がんが、免疫細胞タイプのがんである、直前に先行する項目に記載の方法。

( 項目 4 1 )

前記がんがリンパ球性がんである、直前に先行する項目に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 4 2)

前記がんが、白血病、リンパ腫、または骨髄腫である、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目 4 3)

前記がんが骨髄性がんである、項目 3 8 ~ 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 4)

前記がんが、免疫細胞タイプ以外の細胞または組織タイプのがんである、項目 3 8 または 3 9 に記載の方法。

(項目 4 5)

前記がんもしくは前がんが、血液学のがんもしくは前がん以外のがんもしくは前がんであるか、または前記がんもしくは前がんが固形腫瘍がんであり、必要に応じて、前記固形腫瘍がんが、癌腫または肉腫である、項目 3 8、3 9 または 4 4 のいずれか一項に記載の方法。 10

(項目 4 6)

前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、膀胱がん、肝臓がん、卵巣がん、膵臓がん、頭頸部がん、または腎臓がんである、項目 4 4 または 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

前記対象が前がんを有する可能性を決定するステップを含む、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 8)

前記前がんが腺腫である、直前に先行する項目に記載の方法。 20

(項目 4 9)

前記腺腫が、進行した腺腫である、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目 5 0)

前記前がんが、結腸直腸前がん、肺前がん、乳房前がん、前立腺前がん、皮膚前がん、胃前がん、膀胱前がん、肝臓前がん、卵巣前がん、膵臓前がん、頭頸部前がん、または腎臓前がんである、項目 4 7 ~ 4 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 1)

前記対象が感染症を有する可能性を決定するステップを含む、項目 3 7 ~ 5 0 のいずれか一項に記載の方法。 30

(項目 5 2)

前記対象が移植片拒絶を有する可能性を決定するステップを含む、項目 3 7 ~ 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記複数の免疫細胞タイプの各々の量を決定する前記ステップまたは前記シーケンシングするステップが、複数のシーケンシング読み取りデータを生成することを含み、前記方法が、前記複数の配列読み取りデータを、1つまたは複数の参照配列にマッピングして、マッピングされた配列読み取りデータを生成するステップ、ならびに前記マッピングされた配列読み取りデータをプロセッシングして、前記対象ががん、前がん、感染症または移植片拒絶を有する可能性を決定するステップをさらに含む、項目 3 8 ~ 5 2 のいずれか一項に記載の方法。 40

(項目 5 4)

前記試料が、がんを有すると以前に診断されており、1つまたは複数の以前のがん処置を受けている対象から得られ、必要に応じて、前記試料が、前記1つまたは複数の以前のがん処置後の1つまたは複数の事前に選択された時点で得られる、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 5)

がん再発スコアを決定するステップをさらに含み、必要に応じて、前記対象のがん再発ステータスが、前記がん再発スコアが既定の閾値もしくはそれより上であると決定される場合にがん再発のリスクがあると決定されるか、または前記対象の前記がん再発ステータ 50

すが、前記がん再発スコアが前記既定の閾値より下である場合にがん再発のリスクがより低いと決定される、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目56)

前記対象の前記がん再発スコアを、既定のがん再発閾値と比較するステップをさらに含み、前記対象が、前記がん再発スコアが前記がん再発閾値より上である場合、その後のがん処置の候補であると分類され、前記がん再発スコアが前記がん再発閾値より下である場合、その後のがん処置の候補ではないと分類される、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目57)

前記捕捉するステップが、配列可変標的領域を捕捉することを含む、項目2、4、6または8～56のいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

前記捕捉するステップが、前記DNAを、前記少なくとも1つのエピジェネティック標的領域セットに対して特異的な標的的特異的プローブおよび前記配列可変標的領域に対して特異的な標的的特異的プローブと接触させることを含む、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目59)

前記改変シトシンがメチルシトシンである、項目5～58のいずれか一項に記載の方法。

(項目60)

改変シトシンを認識する前記作用剤がメチル結合試薬である、項目5～58のいずれか一項に記載の方法。

(項目61)

前記メチル結合試薬が抗体である、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目62)

改変シトシンを認識する前記作用剤が、メチル結合タンパク質であるか、またはメチル結合ドメインを含む、項目60に記載の方法。

(項目63)

前記メチル結合試薬が、5-メチルシトシンを特異的に認識する、項目60～62に記載の方法。

(項目64)

前記メチル結合試薬が、固体支持体上に固定化される、項目60～63に記載の方法。

(項目65)

前記分配するステップが、メチル化DNAの免疫沈降を含む、項目5～64のいずれか一項に記載の方法。

(項目66)

前記分配するステップが、タンパク質への結合に基づいて分配することを含み、必要に応じて、前記タンパク質が、メチル化されたタンパク質、アセチル化されたタンパク質、非メチル化タンパク質、非アセチル化タンパク質であり；および/または必要に応じて、前記タンパク質がヒストンである、項目5～58のいずれか一項に記載の方法。

(項目67)

前記分配するステップが、前記試料の前記DNAを、前記タンパク質に対して特異的であり、固体支持体上に固定化された結合試薬と接触させることを含む、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目68)

少なくとも1つの部分試料を、前記捕捉するステップまたは前記シーケンシングするステップの前に、制限酵素と接触させるステップを含み、必要に応じて、前記接触させるステップが、前記試料を前記複数の部分試料に分配した後に行われる、項目5～67のいずれか一項に記載の方法。

(項目69)

前記制限酵素がMDREである、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目70)

10

20

30

40

50

前記第 2 の部分試料が、前記 M D R E と接触させられる、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目 7 1)

前記制限酵素が M S R E である、項目 6 8 ~ 7 0 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 2)

前記第 1 の部分試料が、前記 M S R E と接触させられる、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目 7 3)

アダプターを前記 D N A にライゲーションし、それによって、アダプターライゲーションした D N A を産生するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 4)

前記アダプターライゲーションした D N A が、前記シーケンシングするステップの前に増幅される、直前に先行する項目に記載の方法。

(項目 7 5)

前記部分試料が、前記シーケンシングするステップの前にプールされる、項目 5 ~ 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 6)

前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される D N A 配列を含む低メチル化可変標的領域を含む、項目 1 ~ 4 または 6 ~ 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 7)

前記低メチル化可変標的領域が、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される D N A 配列を含む、項目 3、4、7 または 1 0 ~ 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 8)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 D N A 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、7 6 または 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 7 9)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 D N A 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、7 6 または 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 0)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 D N A 配列が、1 つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、7 6 または 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 1)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 D N A 配列が、1 つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、7 6 または 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 2)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 D N A 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも 1 つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含み、前記試料中の少なくとも 1 つの非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、7 6 または 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 8 3)

10

20

30

40

50

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に低メチル化される前記 DNA 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも 1 つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含み、前記試料中の任意の非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 3、4、76 または 77 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 84)

前記検出可能に低い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 1 つ少ないメチル化シトシンである、項目 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 85)

前記検出可能に低い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 2 つ少ないメチル化シトシンである、項目 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目 86)

前記検出可能に低い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 3 つ少ないメチル化シトシンである、項目 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 87)

前記検出可能に低い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 4 つ少ないメチル化シトシンである、項目 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 88)

前記検出可能に低い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも 5 つまたはそれよりも少ないメチル化シトシンである、項目 78 ~ 83 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 89)

前記エピジェネティック標的領域セットが、複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される DNA 配列を含む高メチル化可変標的領域を含む、項目 1 ~ 4 または 6 ~ 88 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 90)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含む、項目 89 に記載の方法。

30

(項目 91)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含む、項目 89 に記載の方法。

(項目 92)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、1 つの免疫細胞タイプにおいて、前記試料中の任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含む、項目 89 に記載の方法。

(項目 93)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、1 つの免疫細胞タイプにおいて、任意の他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含む、項目 89 に記載の方法。

40

(項目 94)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、少なくとも 1 つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも 1 つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含み、前記試料中の少なくとも 1 つの非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目 89 に記載の方法。

(項目 95)

複数の免疫細胞タイプにおいて差次的に高メチル化される前記 DNA 配列が、少なくと

50

も1つの免疫細胞タイプにおいて、少なくとも1つの他の免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に高い程度のメチル化を含み、前記試料中の任意の非免疫細胞タイプにおける同じ配列のメチル化の程度よりも検出可能に低い程度のメチル化を含む、項目89に記載の方法。

(項目96)

前記検出可能に高い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも1つ多いシトシンメチル化である、項目90～95のいずれか一項に記載の方法。

(項目97)

前記検出可能に高い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも2つ多いシトシンメチル化である、項目90～95のいずれか一項に記載の方法。

10

(項目98)

前記検出可能に高い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも3つ多いシトシンメチル化である、項目90～95のいずれか一項に記載の方法。

(項目99)

前記検出可能に高い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも4つ多いシトシンメチル化である、項目90～95のいずれか一項に記載の方法。

(項目100)

前記検出可能に高い程度のメチル化が、前記他の細胞タイプにおける同じ配列よりも5つ多いまたは5つよりも多いシトシンメチル化である、項目90～95のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目101)

赤血球または赤血球前駆体を起源とする前記試料中のDNAの量を決定するステップ、またはそのレベルを検出するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目102)

顆粒細胞を起源とする前記試料中のDNAの量を決定するステップ、またはそのレベルを検出するステップを含む、先行する項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目103)

前記検出可能に低いまたは高い程度のメチル化が、別の群のドナーと比較して、少なくとも1つの群のドナー由来の試料中に存在し、必要に応じて、前記少なくとも1つの群のドナーが、治療に应答するがんを有し、前記別の群のドナーが、前記治療に应答しないがんを有する、項目3、4または76～102のいずれか一項に記載の方法。

30

40

50