

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7323462号

(P7323462)

(45)発行日 令和5年8月8日(2023.8.8)

(24)登録日 令和5年7月31日(2023.7.31)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 Q 1/6851(2018.01)

C 1 2 Q 1/6851

C 1 2 Q 1/686(2018.01)

C 1 2 Q 1/686

G 0 1 N 33/50 (2006.01)

G 0 1 N 33/50

P

請求項の数 9 (全82頁)

(21)出願番号 特願2019-571025(P2019-571025)

(86)(22)出願日 平成30年6月20日(2018.6.20)

(65)公表番号 特表2020-529194(P2020-529194  
A)

(43)公表日 令和2年10月8日(2020.10.8)

(86)国際出願番号 PCT/US2018/038609

(87)国際公開番号 WO2018/237081

(87)国際公開日 平成30年12月27日(2018.12.27)

審査請求日 令和3年6月21日(2021.6.21)

(31)優先権主張番号 62/522,570

(32)優先日 平成29年6月20日(2017.6.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/576,631

(32)優先日 平成29年10月24日(2017.10.24)

最終頁に続く

(73)特許権者 510321893

ザ メディカル カレッジ オブ ウィスコ  
ンシン, インコーポレイテッド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  
ールド コート 13835

(72)発明者 ミッチェル, ミカエル

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 セルフリーDNAによる移植患者のモニタリング

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

心臓移植レシピエントである移植対象からの試料を評価する方法であって、

(a) 移植の8日以内に各々異なる時点において対象から採取された少なくとも2つの試料中のドナー特異的セルフリーDNA(DS cf-DNA)および全cf-DNAの量を決定すること; ならびに

(b) より早い時点において採取された試料のDS cf-DNAおよび全cf-DNAの量を、より後の時点において採取された試料のDS cf-DNAおよび全cf-DNAの量と比較して、対象にとっての移植合併症のリスクを決定すること、ここで、より後の時点において採取された試料のDS cf-DNAおよび全cf-DNAの量が、より早い時点において採取された試料のDS cf-DNAおよび全cf-DNAの量と比較して低下しない場合、リスクは、より高いかまたは増大中である、を含む、前記方法。

## 【請求項2】

(i) 少なくとも1つの試料が、移植の7、6、5または4日以内に採取される;

(ii) 少なくとも1つの試料が、クロスクランプ除去の時点から36時間以内に採取される;

(iii) 他の試料がまた、移植の8日以内に採取される;

(iv) 試料が、移植後の最初の4、5、6、7または8日にわたり毎日採取される;

(v) 1つ以上のさらなるDS cf-DNAおよび全cf-DNAの量が、各々が対象

10

20

から異なる時点において採取された試料から得られる；および／または  
 (v i) 対象が、6 ヶ月まで、8 ヶ月まで、10 ヶ月まで、または1年までにわたり評価  
 される、  
 請求項1に記載の方法。

【請求項3】

DS c f - DNAの量が、移植後最初の8日以内の各1日に、少なくとも0.98%  
 低下しない場合、リスクは、より高いかまたは増大中である、および／または、全c f -  
 DNAの量が、移植後最初の8日以内の各1日に、少なくとも7%低下しない場合、リス  
 クは、より高いかまたは増大中である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

1つ以上の閾値を提供することをさらに含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の方  
 法。

【請求項5】

量および／または値が、レポートにおいて提供されるかまたは、データベースにおいて  
 記録される、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

DS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量が、  
 (a) 複数の単一ヌクレオチドバリエーション(SNV)標的について、試料またはその一部  
 に対して、少なくとも2つのプライマーペアを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)  
 定量アッセイなどの増幅ベースの定量アッセイを行うこと、ここで、各々のプライマーペ  
 アは、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  
 のプライマーペアのうち一方は、プライマー中に、SNV標的の1つのアレルと比較し  
 て、3'の最後から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルと比較した3'  
 の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  
 のプライマーペアの他方は、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、ならびに  
 (b) 結果に基づいて、DS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量を評価す  
 ること

により決定されるかまたは得られる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

DS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量が、  
 (a) 複数の遺伝子座の各々のアレルを決定すること；  
 (b) アレルの決定に基づいて、複数の遺伝子座から少なくとも1つのインフォーマティ  
 ブな遺伝子座を選択すること；  
 (c) 複数の遺伝子座、対象の第1の核酸および対象にとってネイティブではない第2の  
 核酸を含む核酸を同定すること；  
 (d) 統計学的分布を用いて、少なくとも1つのインフォーマティブな遺伝子座における  
 第1のアレルの推定アレル頻度を計算すること；ならびに  
 (e) 推定アレル頻度に基づいて、DS c f - DNAの量を決定すること  
 により決定されるかまたは得られる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

ドナーの遺伝子型が既知であるか、またはドナーの遺伝子型が不明である、請求項6ま  
 たは7に記載の方法。

【請求項9】

(i) 閾値よりも高いか、および／または、より早い時点からの量と比較して高いかもし  
 くは増大中のDS c f - DNAおよび全c f - DNAの量が、より高いかまたは増大中  
 のリスクを表し、閾値より低い、および／またはより早い時点からの量と比較して低い  
 かもしくは低下中のDS c f - DNAおよび全c f - DNAの量が、より低いまたは  
 低下中のリスクを表す；

(i i) DS c f - DNAおよび全c f - DNAの量が、閾値またはより早い時点から  
 の量と比較してより高い場合、試料採取の間の時間が短縮される；

10

20

30

40

50

( i i i ) 試料が、血液、血漿または血清試料である；

( i v ) 移植対象が、小児心臓移植対象である；および / または

( v ) 対象が、少なくとも 1 回、拒絶のために処置されたことがある、  
請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願

本願は、2017年6月20日に出願された米国仮出願番号 62 / 522, 570、2017年10月24日に出願された米国仮出願番号 62 / 576, 631、2018年4月5日に出願された米国仮出願番号 62 / 653, 213、2018年4月5日に出願された米国仮出願番号 62 / 653, 517、および2018年4月9日に出願された米国仮出願番号 62 / 655, 030 に対する、35 U.S.C. § 119 下における優先権の利益を主張し、これらの各々の全内容は、本明細書において参照として組み込まれる。

10

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、移植対象からの試料中の全セルフリー核酸の量および / またはドナー特異的セルフリー核酸の量を評価するための方法および組成物に関する。かかる量は、移植後の対象をモニタリングするために用いることができる。本発明はさらに、多数の多様な技術を用いて、例えば多重最適化ミスマッチ増幅 (multiplexed optimized mismatch amplification: MOMA) および / または配列決定技術を用いて、ドナー特異的セルフリーデオキシリボ核酸および / または全 cf - DNA の量を評価するための方法および組成物に関する。

20

【発明の概要】

【 0 0 0 3 】

発明の要旨

ドナー特異的 cf - DNA (DS cf - DNA) が、細胞性拒絶グレード、抗体媒介性拒絶、移植片脈管障害、心停止などと相関することを見出した。また、全 cf - DNA が、多様な移植合併症、例えば心停止、感染、死亡などと相関することを見出した。したがって、これらの核酸の量をモニタリングすることは、移植対象を評価し、任意の必要とされる介入を可能にするために、有益であり得る。また、「正常な」または望ましい経過を有する対象における DS cf - DNA および / または全 cf - DNA のレベルは、移植後の最初の数日間にわたり (例えば、4、5、6、7 または 8 日以内に) 基線レベルまで低下することを見出した。したがって、本明細書において提供される方法および組成物は、移植対象を移植後に経時的にモニタリングするために用いることができる。「正常な」または望ましい経過からの逸脱は、1つ以上の移植合併症および / またはさらなるモニタリングまたは処置の必要性の指標であり得る。移植対象からの試料中の全セルフリー DNA および / またはドナー特異的セルフリー DNA を定量するための多様な手段のいずれか 1 つを用いて、移植の後の合併症のリスクを、決定すること、ならびに経時的にモニタリングすることができる。

30

40

【 0 0 0 4 】

本明細書において提供されるのは、かかる決定に関する方法、組成物およびキットである。方法、組成物、またはキットは、それぞれ、本明細書において提供される方法、組成物、またはキットのいずれか 1 つであってよく、これは、例または図面のもののいずれか 1 つを含む。

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、対象から試料を得ることをさらに含む。

一態様において、本明細書において提供される方法についての態様のいずれか 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 つについての態様であってよい。

50

一態様において、本明細書において提供される組成物、キットまたはレポートについての態様のいずれか1つは、本明細書において提供される方法のいずれか1つについての態様であってよい。

一側面において、本明細書において提供される量の1つ以上を含む、レポートまたはデータベースが提供される。

#### 【0005】

一側面において、全セルフリーDNAおよび/もしくはドナー特異的セルフリーDNAの量または本明細書において提供される分析の方法のいずれか1つに基づいて、対象を処置する、対象のための処置レジメンを決定する、または対象に対する処置についての情報を提供する方法が提供される。かかる方法のいずれか1つの一態様において、方法は、対象を処置するステップ、または対象に対する処置についての情報を提供するステップを含む。処置の方法のいずれか1つの一態様において、処置は、本明細書において提供される処置のいずれか1つであってよい。処置の方法のいずれか1つの一態様において、処置は、本明細書において提供される状態のいずれか1つのためのものである。その例は、本明細書において提供されるか、さもなければ当業者に公知である。

10

一側面において、本明細書において提供される方法のいずれか1つは、心臓移植対象などの移植対象を処置する方法であってよい。

#### 【0006】

添付の図面は、原寸において描写されることは意図されていない。図面は、単なる説明であり、本開示の実施可能要件のために必要とされるものではない。

20

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0007】

【図1】図1は、MOMAプライマーの例示的な非限定的な図を提供する。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)アッセイにおいて、SNVAを含む配列の伸長が起こることが期待され、これはSNVAの検出をもたらし、これはその後定量することができる。しかし、SNVBの伸長は、二重ミスマッチに起因して起こらないと期待される。

【図2】図2は、再構築実験からの結果を示す。

【図3】図3は、ドナーの遺伝子型を予測するための期待値最大化の使用を示す。破線 = 第1の反復(first iteration)、実線 = 第2の反復(second iteration)、最終コール(Final call) = 10%。

30

【図4】図4は、ドナーの遺伝子型を予測するための期待値最大化の使用を示す。最終コール(Final call) = 5%。再構築実験からの結果を示す。

【図5】図5は、ドナー遺伝子型を予測する能力を示す再構築実験データを提供する。データは、95のSNV標的のセットにより作製した。

#### 【0008】

【図6】図6は、これによりいくつかの態様を作動させることができるコンピューターシステムの例を説明する。

【図7】図7は、移植後のcf-DNAの中央値レベルを経時的に示す。

【図8】図8は、MOMA(既知のドナー遺伝子型によるもの;左)、MOMA(不明なドナー遺伝子型によるもの;中央)、およびMOMA(不明なドナー遺伝子型によるもの;右)を用いた、移植後の日数による二変数適合度を示す。

40

【図9】図9は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA(ドナー遺伝子型情報あり、上左;ドナー遺伝子型情報なし、上右)を用いた、ならびに全cf-DNAを用いた(下)死亡についての閾値点の実験によるM12決定を示す。

【図10】図10は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA(ドナー遺伝子型情報あり、左;およびドナー遺伝子型情報なし、中央)を用いた、ならびに全cf-DNA(右)を用いた、心停止についての閾値点の実験による決定を示す。

#### 【0009】

【図11】図11は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA(ドナー遺伝子型情報あり、上左;ドナー遺伝子型情報なし、上右)を用いた、ならびに全cf-DNA(下)を

50



用いた、感染についての閾値点の実験による決定を示す。

【図12】図12は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり、上左；ドナー遺伝子型情報なし、上右）を用いた、ならびに全cf-DNA（下）を用いたQuilty病変についての閾値点の実験による決定を示す。

【図13】図13は、細胞性グレード2（以上）の拒絶の閾値（カットポイント）を決定するための異なる方法の感度および特異度を示すグラフを含む。方法1（既知のドナー遺伝子型情報あり）および方法2（未知のドナー遺伝子型情報あり）（上の行）は、移植患者からのドナー特異的セルフリーDNA（cf-DNA）を用いて示す。

【図14】図14は、ドナー特異的cf-DNAおよび2つの異なる方法を用いた、CR0およびCR1（上の行）、ならびにCR0およびCR2（下の行）についての閾値（「カットポイント」）の実験による決定を示す。

10

【図15】図15は、MOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、CR0についての閾値の実験による決定を示す。

【0010】

【図16】図16は、MOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、CF0についての閾値の実験による決定を示す。

【図17】図17は、異なる方法のMOMA（ドナー遺伝子型情報ありおよびなし）の結果の比較を示す。

【図18】図18は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。

20

【図19】図19は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

【図20】図20は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。

【0011】

【図21】図21は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

30

【図22】図22は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図23】図23は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図24】図24は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。

40

【図25】図25は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード2（CR2）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【0012】

【図26】図26は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。

【図27】図27は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、除外した。

50

【図28】図28は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

【図29】図29は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。

【図30】図30は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、除外した。

【0013】

【図31】図31は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード1（CR1）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

【図32】図32は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。

【図33】図33は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、除外した。

【図34】図34は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

【図35】図35は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。

【0014】

【図36】図36は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、除外した。

【図37】図37は、ドナー特異的cf-DNAおよびMOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、細胞性拒絶グレード0（CR0）についての閾値点の実験による決定を示す。各々の対象から得られた最後の試料を、分析のために用いた。

【図38】図38は、実験により決定された抗体媒介性拒絶（グレード0対グレード1または2）についての閾値（カットポイント）を表す2つのグラフを示す。

【図39】図39は、MOMA（既知のドナー遺伝子型）を用いた、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図40】図40は、MOMA（既知のドナー遺伝子型）を用い、機械的サポートを受けている対象からの試料を除外した、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【0015】

【図41】図41は、MOMA（既知のドナー遺伝子型）および各々の対象からの最後の試料を用いた、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図42】図42は、MOMA（ドナー遺伝子型不明）を用いた、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図43】図43は、MOMA（ドナー遺伝子型不明）を用い、機械的サポートを受けている対象からの試料を除外した、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図44】図44は、MOMA（ドナー遺伝子型不明）および各々の対象からの最後の試料を用いた、抗体媒介性拒絶についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示す

10

20

30

40

50

グラフである。

【図 4 5】図 4 5 は、2 つの異なる方法（ドナー遺伝子型情報ありおよびなし）（上の行）によるドナー特異的セルフリー DNA（DS cf - DNA）を用いた、心臓同種移植片脈管障害のカットポイント（閾値）の実験による決定を示す。

【0 0 1 6】

【図 4 6】図 4 6 は、2 つの異なる方法（ドナー遺伝子型情報ありおよびなし）（上の行）によるドナー特異的セルフリー DNA（DS cf - DNA）を用いた、心停止のカットポイント（閾値）の実験による決定を示す。

【図 4 7】図 4 7 は、2 1 4 の試料を用いて MOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

10

【図 4 8】図 4 8 は、機械的サポートを受けている対象からの試料を除外して MOMA（ドナー遺伝子型情報あり）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

【図 4 9】図 4 9 は、2 1 4 の試料を用いて MOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

【図 5 0】図 5 0 は、機械的サポートを受けている対象からの試料を除外して MOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

【0 0 1 7】

【図 5 1】図 5 1 は、各々の対象から得られた最後の試料（N = 7 9）を用いて MOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

20

【図 5 2】図 5 2 は、MOMA（ドナー遺伝子型情報なし）を用いた、移植片脈管障害についての閾値の実験による決定を示す。

【図 5 3】図 5 3 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（ドナー遺伝子型あり）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。

【図 5 4】図 5 4 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（ドナー遺伝子型あり）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図 5 5】図 5 5 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（ドナー遺伝子型あり）を用い、各々の対象から得られた最後の試料を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。

30

【0 0 1 8】

【図 5 6】図 5 6 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（既知のドナー遺伝子型なし）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。

【図 5 7】図 5 7 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（既知のドナー遺伝子型なし）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示し、機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図 5 8】図 5 8 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（既知のドナー遺伝子型なし）を用い、各々の対象から得られた最後の試料を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。

40

【図 5 9】図 5 9 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（既知のドナー遺伝子型なし）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示す。

【図 6 0】図 6 0 は、ドナー特異的 cf - DNA および MOMA（既知のドナー遺伝子型なし）を用いた、心停止についての閾値の実験による決定を示し、機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【0 0 1 9】

【図 6 1】図 6 1 は、異なる試料の全セルフリー DNA（cf - DNA）、および対象が試料採取の時点において感染のための処置を受けていたか否かを表すグラフである。

【図 6 2】図 6 2 は、異なる試料の全セルフリー DNA（cf - DNA）、および各々の

50

対象が心停止に至った（１）か否か（０）を表すグラフである。

【図６３】図６３は、異なる試料の全セルフリーＤＮＡ（cf-DNA）、および各々の対象が死亡したか（１）または生存したか（０）を表すグラフである。

【図６４】図６４は、各々の対象からの最後の試料（N＝８８）を用いた、感染についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図６５】図６５は、機械的サポートを受けている対象を除外した全cf-DNA（N＝２９２）を用いた、感染についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【００２０】

【図６６】図６６は、２９８の試料からの全cf-DNAを用いた、心停止についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

10

【図６７】図６７は、２９２の試料からの全cf-DNAを用いた、心停止についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図６８】図６８は、２９８の試料からの全cf-DNAを用いた、死亡についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図６９】図６９は、全cf-DNAを用いた、死亡についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。機械的サポートを受けている対象からの試料は、分析から除外した。

【図７０】図７０は、各々の対象からの最後の試料からの全cf-DNA（N＝８８）を用いた、死亡についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

20

【００２１】

【図７１】図７１は、２９８の試料からの全cf-DNAを用いた、感染についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図７２】図７２は、各々の対象の最後の試料からの全cf-DNA（N＝８８）を用いた、心停止についてのカットポイント（閾値）の実験による決定を示すグラフである。

【図７３】図７３は、多数の心臓移植対象における移植後の最初の数日間にわたるcf-DNA値の低下を示す。

【図７４】図７４は、DF cf-DNAの％（DF cf-DNAの濃度を全cf-DNAの濃度で除算したものと計算される）と時間との間の関連を対数-対数スケールにおいて示す。

30

【図７５】図７５は、拒絶処置に関連する初期の減少に続くDF cf-DNAのリバウンドを有さず、顕著な有害効果を有さなかった患者におけるドナー画分セルフリーＤＮＡ（DF cf-DNA）の長期的（longitudinal）測定を示す

【００２２】

【図７６Ａ】図７６Ａ～７６Ｂは、拒絶処置に関連する初期の減少に続くDF cf-DNAのリバウンドを示し、顕著な有害効果を経験した４人の患者からの、長期的DF cf-DNAのデータを示す。

【図７６Ｂ】図７６Ａ～７６Ｂは、拒絶処置に関連する初期の減少に続くDF cf-DNAのリバウンドを示し、顕著な有害効果を経験した４人の患者からの、長期的DF cf-DNAのデータを示す。

40

【図７７】図７７は、拒絶処置に関連する初期の減少に続くDF cf-DNAのリバウンドを示し、顕著な有害効果を経験しなかった２人の患者からの、長期的DF cf-DNAのデータを示す。

【図７８】図７８は、DF cf-DNAと、方法１（既知のドナー遺伝子型によるもの；左グラフ）による、および方法２（不明なドナー遺伝子型によるもの；右グラフ）による、細胞性拒絶（CR）グレード（CR 0対CR 1またはCR 2）との関連を、受信者動作特性（ROC）曲線により示す、２つのグラフを含む。

【図７９】図７９は、プレ生検（pre-biopsy）およびポスト生検（post-biopsy）のドナー特異的画分（DF）セルフリーＤＮＡ（cf-DNA）の％の増大を示す。

50

【図 8 0】図 8 0 は、プレ生検およびポスト生検の血漿 1 m L あたりのドナーゲノム当量 ( G E ) の増大を示す。

【 0 0 2 3 】

【図 8 1】図 8 1 は、全試料において M O M A ( 既知のドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。

【図 8 2】図 8 2 は、M O M A ( 既知のドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 0 を有する健常試料は、以下のいずれをも有さないものであった：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん。

【図 8 3】図 8 3 は、対象 1 人あたり 1 つの試料を用いて M O M A ( 既知のドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 1 / 2 / 3 群の第 1 の拒絶を試料として用い、「健常」群の各々のメンバーからの第 1 の試料を用いた。

10

【図 8 4】図 8 4 は、血漿試料を用いて M O M A ( 既知のドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 0 を有する健常試料は、以下のいずれをも有さないものであった：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん。

【図 8 5】図 8 5 は、健常な対象 ( 以下のいずれをも有さないもの：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん ) からの全血試料を用いて M O M A ( 既知のドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。

20

【 0 0 2 4 】

【図 8 6】図 8 6 は、全試料において M O M A ( 不明なドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。

【図 8 7】図 8 7 は、M O M A ( 不明なドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 0 を有する健常試料は、以下のいずれをも有さないものであった：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん。

【図 8 8】図 8 8 は、M O M A ( 不明なドナー遺伝子型によるもの ) を用い、対象 1 人あたり 1 つの試料を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 1 / 2 / 3 群の第 1 の拒絶を試料として用い、「健常」群の各々のメンバーからの第 1 の試料を用いた。

30

【図 8 9】図 8 9 は、血漿試料を用いて M O M A ( 不明なドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 0 を有する健常試料は、以下のいずれをも有さないものであった：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん。

【図 9 0】図 9 0 は、全血試料を用いて M O M A ( 不明なドナー遺伝子型によるもの ) を用いた、C R 1 / 2 / 3 および C R 0 の実験による識別を示す。C R 0 を有する健常試料は、以下のいずれをも有さないものであった：死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、およびがん。

40

【 0 0 2 5 】

【図 9 1】図 9 1 は、8 5 の試料からの全 c f - D N A を用いた、死亡についてのカットポイント ( 閾値 ) の実験による決定を示す表である。

【図 9 2】図 9 2 は、8 5 の試料からの全 c f - D N A を用いた、死亡についてのカットポイント ( 閾値 ) の実験による決定を示す、図 9 1 の結果のグラフ表示である。

【図 9 3】図 9 3 は、8 5 の試料からの全 c f - D N A を用いた、心停止についてのカットポイント ( 閾値 ) の実験による決定を示す表である。

【図 9 4】図 9 4 は、8 5 の試料からの全 c f - D N A を用いた、心停止についてのカットポイント ( 閾値 ) の実験による決定を示す、図 9 3 の結果のグラフ表示である。

【図 9 5】図 9 5 は、2 9 2 の試料からの全 c f - D N A を用いた、感染 ( すなわち、対

50

象が試料採取の時点において感染のための処置を受けていたか否か) についてのカットポイント(閾値)の実験による決定を示す表である。

【図96】図96は、292の試料からの全cf-DNAを用いた、感染(すなわち、対象が試料採取の時点において感染のための処置を受けていたか否か)についてのカットポイント(閾値)の実験による決定を示す、図95の結果のグラフ表示である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

発明の詳細な説明

ドナー特異的cf-DNA(DS cf-DNA)が、細胞性拒絶グレード、抗体媒介性拒絶、移植片脈管障害、心停止などと相関することを見出した。また、全cf-DNAが、多様な移植合併症、例えば心停止、感染、死亡などと相関することを見出した。したがって、これらの核酸の量をモニタリングすることは、移植対象を評価し、任意の必要とされる介入を可能にするために、有益である。また、「正常な」または望ましい経過を有する対象におけるDS cf-DNAおよび/または全cf-DNAのレベルは、移植後の最初の数日間にわたり(例えば、4、5、6、7または8日以内に)基線レベルまで低下することを見出した。したがって、本明細書において提供される方法および組成物は、移植対象を移植後に経時的にモニタリングするために用いることができる。「正常な」または望ましい経過からの逸脱は、移植合併症および/またはさらなるモニタリングまたは処置の必要性の指標となり得る。したがって、本開示の側面は、少なくとも部分的に、対象の健康および/または移植を評価または決定するために、対象からの多数の試料中のドナー特異的セルフリーDNA(DS cf-DNA)および/または全cf-DNAを定量する方法に関する。本明細書において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、対象は、機械的サポート(例えば人工呼吸器)を受けている。

【0027】

本明細書において用いられる場合、「ドナー特異的核酸」とは、移植レシピエントにおいて見出すことができる、移植ドナーからのものである核酸を指す。かかる核酸は、好ましくは、セルフリーDNAである。「セルフリーDNA」(または「cf-DNA」)とは、細胞の外側、例えば対象の血液、血漿、血清、尿などにおいて存在するDNAである。「全セルフリーDNA」(または「全cf-DNA」)は、試料中に存在するcf-DNAの量であって、移植レシピエントからの試料を評価する場合、ドナーおよびレシピエントの両方のcf-DNAを含み得る。本明細書において用いられる場合、本明細書において提供される組成物および方法は、DS cf-DNAおよび/または全セルフリーDNAの量、ならびに移植に関連する対象の合併症のリスクを決定するために用いることができる。本明細書において用いられる場合、「移植」は、レシピエントの損傷を受けたかまたは欠損している臓器または組織を置き換えることを目的として、ドナーからレシピエントに臓器または組織を移動することを指す。本明細書において提供される方法または組成物のいずれか1つは、臓器または組織の移植を受けた対象からの試料に対して用いてもよい。いくつかの態様において、移植は、心臓移植である。

【0028】

DS cf-DNAの量は、低いグレードの拒絶をも含む移植拒絶のグレードを評価または決定するために用いることができる。本明細書において提供される場合、CR2以下の細胞性拒絶グレードを有するか、またはこれを有することが疑われる対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。また、本明細書において提供される場合、CR2以上の細胞性拒絶グレードを有するか、またはこれを有することが疑われる対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。本明細書において用いられる場合、「有することが疑われる」とは、それにより対象が特定の状態、例えば特定の細胞性拒絶グレードを有する可能性が存在すると医師が信じる対象を指す。本明細書において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、本明細書において提供されるグレードのいずれか1つの拒絶を有するもの、または本明細書において提供される拒絶のグレードのいずれか1つを有する可能性が存在すると医師が信じるものであってよ

10

20

30

40

50

い。かかる対象は、細胞性拒絶グレードの症状（および／またはその不在）に基づいて、特定のグレードの細胞性拒絶を有することが疑われるものであってもよい。しかし、いくつかの態様において、対象は、1つ以上の他の検査により、例えば生検により、特定のグレードの拒絶を有すると決定されているものである。かかる態様において、本明細書において提供される方法は、かかる知見を確認するか、またはかかる対象を拒絶の状態を悪化させるかまたはこれを改善することについてモニタリングするために用いることができる。

【0029】

細胞性拒絶は、国際心肺移植学会（International Society for Heart and Lung Transplantation：ISHLT）のグレード付けスキームに従うもののよう、グレードにより、CR0、CR1、CR2またはCR3として、分類することができる。例示的なグレード付けスキームを、以下に提供する。

【表A】

ISHLT-2004 急性細胞性拒絶グレード付けスキーム

グレード	組織病理学的知見
0R, なし	なし
1R, 温和	1つまでの筋細胞傷害の病巣を伴う間質および／または血管周囲の浸潤
2R, 中程度	付随する筋細胞傷害を伴う2つ以上の浸潤の病巣
3R, 重篤	多巣性筋細胞傷害±浮腫±出血±血管炎を伴うびまん性浸潤

From Stewart et al JHLT, 2005

【0030】

対象の細胞性拒絶グレードは、DS-cf-DNA 1つ以上の量を決定することまたはこれを得ることにより、評価することができる。

DS-cf-DNAの量はまた、抗体媒介性拒絶を評価または決定するために用いることができる。本明細書において提供される場合、抗体媒介性拒絶を有するか、またはこれを有することが疑われる対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。本明細書において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、抗体媒介性拒絶を有するもの、または抗体媒介性拒絶を有する可能性が存在すると医師が信じるものであってもよい。かかる対象は、抗体媒介性拒絶の症状（および／またはその不在）に基づいて、抗体媒介性拒絶を有することが疑われるものであってもよい。しかし、いくつかの態様において、対象は、1つ以上の他の検査により、例えば生検により、抗体媒介性拒絶を有すると決定されているものである。かかる態様において、本明細書において提供される方法は、かかる知見を確認するか、またはかかる対象を拒絶の状態を悪化させるかまたはこれを改善することについてモニタリングするために用いることができる。

【0031】

DS-cf-DNAの量はまた、心臓同種移植片脈管障害および／または心停止、またはそれらのリスクを評価または決定するために用いることができる。本明細書において提供される場合、心臓同種移植片脈管障害および／または心停止を有するか、これを有することが疑われるか、これを有したことがあるか、またはこれを有するリスクがある対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。本明細書において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、心臓同種移植片脈管障害および／または心停止を有するか、これを有したことがあるもの、あるいは、心臓同種移植片脈管障害および／または心停止を有する可能性が存在すると医師が信じるものであってもよい。かかる対象は、症状（および／またはその不在）に基づいて、心臓同種移植片脈管障害および

／または心停止を有することが疑われるか、またはその可能性があるものであってよい。しかし、いくつかの態様において、前述のものは、1つ以上の他の検査に基づくもの、例えば生検によるものであってもよい。かかる態様において、本明細書において提供される方法は、かかる知見を確認するか、またはかかる対象を状態の悪化または改善についてモニタリングするために用いることができる。

#### 【0032】

さらに、全cf-DNAの量は、用いることができる移植合併症のリスクを評価または決定するために用いることができる。移植合併症として、心停止、感染および死亡が挙げられる。本明細書において提供される場合、移植合併症を有するか、またはこれを有することが疑われる対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。本明細書において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、移植合併症を有するもの、または移植合併症を有する可能性が存在すると医師が信じるものであってよい。いくつかの態様において、移植合併症を有していたか、またはこれを有するリスクがある対象を評価するために、方法のいずれか1つを用いることができる。対象は、症状（および／またはその不在）に基づいて、移植合併症を有することが疑われるか、これを有していたことが決定されているか、またはこれを有する可能性もしくはリスクを有することが決定されているものであってよい。しかし、いくつかの態様において、対象は、1つ以上の他の検査に基づいて、移植合併症を有することが疑われるか、これを有していたことが決定されているか、またはこれを有する可能性もしくはリスクを有することが決定されているものである。かかる態様において、本明細書において提供される方法は、かかる知見を確認するか、またはかかる対象を状態の悪化または改善についてモニタリングするために用いることができる。

#### 【0033】

cf-DNA（DSおよび／または全て）の量は、本明細書において別の場所で提供されるものなどの実験技術を用いて決定することができる。「得ること」とは、本明細書において用いられる場合、それによりそれぞれの情報または材料を得ることができる任意の方法を指す。したがって、それぞれの情報は、実験方法により得ることができる。それぞれの材料は、いくつかの態様において、多様な実験または研究方法を用いて作製、設計などを行うことができる。それぞれの情報または材料はまた、レポートなどの情報、または材料を与えられるかまたはこれを提供されることにより得ることができる。いくつかの態様において、材料は、商業的手段を通して（すなわち、購入することにより）与えられるかまたは提供されてもよい。

#### 【0034】

cf-DNAなどの核酸の量および移植条件との相関を決定する能力に起因して、本明細書において提供される方法および組成物は、対象を評価するために用いることができる。したがって、拒絶の状態を改善するかまたは悪化させるリスクを、かかる対象において決定することができる。「リスク」とは、本明細書において提供される場合、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、またはかかる状態の存在または不在または進行の可能性の増大を指す。本明細書において提供される場合、「リスクの増大」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大を指す。本明細書において提供される場合、「リスクの低下」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（または不在または非進行の可能性の増大）の可能性の低下を指す。

#### 【0035】

本明細書において提供される場合、早期検出またはモニタリングは、処置を容易にし、臨床成績を改善し得る。提供される方法のいずれか1つは、本明細書において提供される対象のいずれか1つに対して行うことができる。かかる方法は、対象を、処置と共に、または処置することなく、経時的にモニタリングするために用いることができる。さらに、かかる方法は、処置または治療の選択、投与および／またはモニタリングを補助することができる。したがって、本明細書において提供される方法は、処置またはモニタリングの



レジメンを決定するために用いることができる。

【0036】

「処置レジメンを決定すること」、本明細書において用いられる場合、対象の処置の行為のコースの決定を指す。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、処置レジメンを決定することは、対象に提供されるべき適切な治療に関する適切な治療または情報を決定することを含む。本明細書において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、決定することは、対象に対する適切な治療に関して適切な治療または情報を提供することを含む。本明細書において用いられる場合、処置または治療またはモニタリングに関する情報は、書面の形態または電子形態において提供されてもよい。いくつかの態様において、情報は、コンピューター可読の指示として提供されてもよい。いくつかの態様において、情報は、口頭で提供されてもよい。

10

【0037】

治療は、例えば細胞性拒絶を処置するためのもの、例えば抗拒絶反応治療であってよい。抗拒絶反応治療として、例えば免疫抑制剤が挙げられる。免疫抑制剤として、これらに限定されないが、以下が挙げられる：副腎皮質ステロイド（例えば、プレドニゾンまたはヒドロコルチゾン）、糖質コルチコイド、細胞分裂阻害剤、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード（シクロホスファミド）、ニトロソウレア、白金化合物、シクロホスファミド（Cytosan））、代謝拮抗薬（例えば、メトトレキサートなどの葉酸アナログ、アザチオプリンおよびメルカプトプリンなどのプリン、ピリミジンアナログ、およびタンパク質合成阻害剤）、細胞傷害性抗生物質（例えば、ダクチノマイシン、アントラサイクリン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、ミトラマイシン）、抗体（例えば、抗CD20、抗IL-1、抗IL-2Rアルファ、抗T細胞または抗CD-3モノクローナルおよびポリクローナル、例えばAtgamおよびサイモグロブリン）、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスポリン、タクロリムス、シロリムス、インターフェロン、オピオイド、TNF結合タンパク質、ミコフェノール酸、フィンゴリモドおよびミリオシン。いくつかの態様において、抗拒絶反応治療は、血液移植（blood transfer）または骨髄移植を含む。治療はまた、静脈内注射用流体（intravenous fluid）、抗生物質、外科的排膿法、早期目標指向型治療（early goal directed therapy: EGDT）、昇圧剤、ステロイド、活性化タンパク質C、ドトロレコギンアルファ（活性化型）、酸素および臓器不全のための適切なサポートを含んでもよい。これは、腎不全における血液透析、肺機能不全における人工呼吸、血液製剤の輸血、ならびに循環不全における薬物および輸液療法を含んでもよい。適切な栄養を確保すること（好ましくは経腸栄養により、しかし必要な場合には非経口栄養により）もまた、長期の疾病の間には特に含まれ得る。他の関連する治療は、インスリンならびに深部静脈血栓症および胃潰瘍を予防するための医薬を含んでもよい。

20

30

【0038】

治療は、例えば、抗体媒介性拒絶を処置するためのものであってよい。抗体媒介性拒絶治療として、例えば、免疫抑制剤、プラスマフェレーシス/血漿交換、免疫グロブリン静注、副腎皮質ステロイド、抗リンパ球抗体および脾摘出術が挙げられる。

心臓同種移植片脈管障害治療として、例えば、再移植、経皮的冠動脈形成術（PCI）、冠動脈バイパス移植術（CABG）、経心筋レーザー血行再建術および/またはヘパリン誘導性/媒介性体外LDLプラスマフェレーシス（HELP）、ならびにスタチン、降圧剤、および/または抗サイトメガロウイルス（抗CMV）剤の投与が挙げられる。

40

【0039】

心停止が示される症例のための治療として、これらに限定されないが、経皮的冠動脈形成術（冠動脈形成術）、冠動脈バイパス形成術、または植込み型除細動器（ICD）の付加が挙げられる。さらなる治療として、これらに限定されないが、抗不整脈剤、不随意神経系遮断薬または血圧の医薬が挙げられる。さらに、対象に、冠動脈カテーテルおよび/または心臓除細動器（cardioverter-defibrillator）を移植してもよい。

【0040】

別の態様において、処置は、感染のための処置であってよい。いくつかの態様において

50

、感染を処置するための治療として、細菌、真菌および／またはウイルス感染を処置するための治療が挙げられる。かかる治療は、抗生物質を含む。他の例として、これらに限定されないが、抗アメーバ薬、アミノグリコシド、駆虫薬、抗真菌剤、アゾール抗真菌剤、エキノカンディン、ポリエン、ジアリールキノリン、ヒドラジド誘導体、ニコチン酸誘導体、リファマイシン誘導体、ストレプトマイシス誘導体、抗ウイルス剤、ケモカイン受容体アンタゴニスト、インテグラーゼ鎖伝達阻害剤 (integrase strand transfer inhibitor)、ノイラミニダーゼ阻害剤、NNRTI、NS5A阻害剤、ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NRTI)、プロテアーゼ阻害剤、プリンヌクレオシド、カルバペネム、セファロsporin、グリシルサイクリン (glycylcycline)、抗らい薬 (leprostatic)、リンコマイシン誘導体、マクロライド誘導体、ケトライド、マクロライド、オキサゾリジノン抗生物質、ペニシリン、ベータ-ラクタマーゼ阻害剤、キノロン、スルホンアミド、およびテトラサイクリンが挙げられる。

他のかかる治療は、当業者に公知である。

#### 【0041】

処置または治療の投与は、当該分野において公知の任意の方法により達成することができる (例えば、Harrison's Principle of Internal Medicine, McGraw Hill Inc.を参照)。好ましくは、処置または治療の投与は、治療有効量において起こる。投与は、局所性または全身性であってよい。投与は、非経口 (例えば、静脈内、皮下、または皮内) または経口であってよい。投与の様々な経路のための組成物は、当該分野において公知である (例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martinを参照)。

#### 【0042】

処置および臨床経過は、対象の細胞性拒絶グレードおよび／または関連する期待される結果により決定することができる。例えば、DS c f - DNAの量が0.8以上である場合、CR2以上の細胞性拒絶グレードが示され、対象は、上記のもののように、抗拒絶反応治療により処置されるか、またはそれに関連する情報を提供され得る。別の例として、DS c f - DNAの量が0.2以上である場合、抗体媒介性拒絶が示され得、対象は、上記のもののように、抗拒絶反応治療により処置されるか、またはそれに関連する情報を提供され得る。さらなる例として、DS c f - DNAの量が0.2または0.3と等しいかまたはこれらより高い場合、心臓同種移植片脈管障害および／または心停止が示され得、対象は、上記のもののように、治療により処置されるか、またはそれに関連する情報を提供され得る。別の例として、全c f - DNAの量が8 ng/mL以上である場合、対象は、上記のもののように、治療により処置されるか、またはそれに関連する情報を提供され得る。

#### 【0043】

「モニタリングのレジメンを決定すること」とは、本明細書において用いられる場合、対象における状態を経時的にモニタリングするために行為のコースを決定することを指す。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、モニタリングのレジメンを決定することは、経時的に、またはその後の時点において、対象におけるDS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量を決定するため、またはかかるモニタリングを対象に提案するための、行為の適切なコースを決定することを含む。このことは、臨床状態におけるバリエーションの測定を可能にし得るか、および／または、正常値または基線レベルの計算 (ならびにそれらとの比較) を可能にし得る。本明細書において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モニタリングのレジメンを決定することは、対象から試料を得るタイミングおよび／もしくは頻度を決定すること、ならびに／またはDS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量を決定するかもしくはこれを得ることを含む。

#### 【0044】

いくつかの態様において、DS c f - DNAおよび／または全c f - DNAの量を、経時的にプロットしてもよい。いくつかの態様において、この時点についての閾値もまた、プロットしてもよい。例えば、閾値は、「正常な」c f - DNAの経時的な低下の経過

10

20

30

40

50

を表すか、および／または移植対象の望ましいまたは健常な状態の経過を表し得る。かかる「正常な変化 (declension) の図表」は、移植合併症のリスクを決定するため、および／または対象の進行をモニタリングするために役立ち得る。かかる閾値は、十分な数の対象からのデータを用いて決定することができる。かかる閾値に対する対象の c f - D N A レベルとの一定の期間 (移植後の短いウィンドウ内のものを含む) にわたる比較を、リスクを予測するために用いることができる。

#### 【 0 0 4 5 】

本明細書において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、D S c f - D N A および／または全 c f - D N A は、移植の 3 6 時間以内 (すなわち、クロスクランプ除去の 3 6 時間以内) に初めに評価することができる。本明細書において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、D S c f - D N A および／または全 c f - D N A は、第 0 日 (例えば、クロスクランプ除去の日において、またはクロスクランプ除去とほぼ同じ時間において)、第 4 日および第 8 日において初めに評価することができる。D S c f - D N A および／または全 c f - D N A は、最初の試料評価の後、毎日、例えば移植の最初の少なくとも 4、5、6、7 または 8 日以内に毎日、評価してもよい。他の態様において、D S c f - D N A および／または全 c f - D N A は、定量するか、または、移植後 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 または 20 日以内にまた定量してもよい。試料は、採取しても、または 1 カ月ごと、2 カ月ごと、または 1 カ月ごとの追加 (increment) において、6 カ月まで、8 カ月まで、10 カ月まで、12 カ月まで、またはそれより長くにわたり、また採取してもよい。D S c f - D N A および／または全 c f - D N A のレベルの増大は、移植合併症のリスクの増大と相関することが見出されたことから、医師は、対象の D S c f - D N A および／または全 c f - D N A が複数の時点の間で増大することが見出される場合、より頻繁な試料採取を受けるべきであることを決定することができる。対象が、複数の時点の間で低下している D S c f - D N A および／または全 c f - D N A のレベルを有することが見出される場合、医師は、より頻度が低い試料採取が十分であることを決定することができる。

#### 【 0 0 4 6 】

例えば、移植後の各々の日は、移植後の第 8 日を通して、約 0 . 9 8 % の D S c f - D N A の低下と関連することが見出された。したがって、対象が、かかる低下を示さない場合、医師は、さらなる検査および／または処置が必要であり得ることを決定することができる。加えて、移植後の各々の日は、移植後の第 8 日を通して、約 7 % の全 c f - D N A の低下と関連することが見出された。したがって、対象がかかる低下を示さない場合、医師は、さらなる検査および／または処置が必要であり得ることを決定することができる。

#### 【 0 0 4 7 】

モニタリングのタイミングおよび／または頻度はまた、閾値との比較によっても決定することができる。例えば、D S c f - D N A の量が、0 . 2 (または本明細書において提供される閾値のいずれか 1 つ) と等しいかまたはこれより高い、および／または増大中である場合、より頻繁な試料採取が必要であり得るが、一方、D S c f - D N A の量が、0 . 2 (または本明細書において提供される閾値のいずれか 1 つ) より低い、増大中ではない場合、より頻度が低い試料採取が必要とされ得る。別の例として、D S c f - D N A の量が、0 . 3 (または本明細書において提供される閾値のいずれか 1 つ) と等しいかまたはこれより高い、および／または増大中である場合、より頻繁な試料採取が必要であり得るが、一方、D S c f - D N A の量が、0 . 3 (または本明細書において提供される閾値のいずれか 1 つ) より低く、および／または増大中ではない場合、より頻度が低い試料採取が必要とされ得る。

#### 【 0 0 4 8 】

さらなる例として、全 c f - D N A の量が、8 n g / m L (または本明細書において提供される閾値のいずれか 1 つ) と等しいかまたはこれより多いか、および／または増加している場合、より頻繁な試料採取が必要であり得、一方、全 c f - D N A の量が、8 n g

／mL（または本明細書において提供される閾値のいずれか１つ）未満であるか、および／または増加していない場合、より頻度が低い試料採取が必要とされ得る。一般に、より高いかまたは増大中の全cf-DNAの量を有する対象は、より近いモニタリングおよびより頻繁な試料採取を必要とする。

本明細書において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、各々の量および時点は、レポートにおいて、またはデータベースにおいて、記録することができる。閾値もまた、レポートにおいて、またはデータベースにおいて、記録することができる。

【0049】

本明細書において提供されるような値のいずれか１つ以上によるレポートがまた、一側面において提供される。レポートは、口頭、書面（またはハードコピー）、または電子形態におけるもの、例えば可視化または表示することができる形態におけるものであってよい。好ましくは、レポートは、試料中のドナー特異的核酸および／または全核酸の量を提供する。いくつかの態様において、レポートは、対象からの試料中のドナー特異的核酸および／または全核酸の量を経時的に提供し、いくつかの態様においては、対応する閾値をさらに含んでもよい。

【0050】

いくつかの態様において、量および／または閾値は、データベース中にあるか、またはデータベース中に入力される。一側面において、かかる量および／または値を有するデータベースが提供される。量から、医師は、対象の処置またはモニタリングの必要性を評価することができる。したがって、本明細書において提供される方法のいずれか１つにおいて、方法は、１つより多くの時点において対象における核酸の量を評価することを含んでもよい。かかる評価は、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか１つにより行うことができる。

【0051】

本明細書において用いられる場合、「量」とは、任意の定量的値を指し、絶対量または相対量において示され得る。さらに、量は、合計量、頻度、比、パーセンテージなどであってもよい。本明細書において用いられる場合、「レベル」という用語は、「量」の代わりに用いることができるが、同じ型の値を指すことが意図される。一般に、別段に提供されない限り、本明細書において提供される量は、DS cf-DNAを参照する場合、試料中の、合計に対して相対的な比またはパーセンテージを表す。

【0052】

いくつかの態様において、本明細書において提供される方法のいずれか１つは、リスクが増大または低下した対象を同定するために、ドナー特異的核酸および／または全核酸の量を閾値と、または１つ以上の前の量と比較することを含んでもよい。本明細書において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、閾値と、または１つ以上の前の量と比較して核酸の量が高い対象は、リスクが増大したものとして同定される。本明細書において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、閾値と、または１つ以上の前の量と比較して核酸の量が低いと同様の対象は、リスクが低下したか増大していないものとして同定される。

【0053】

「閾値」または「閾値」または「カットポイント」とは、本明細書において用いられる場合、状態の存在もしくは不在、またはリスクの存在もしくは不在の指標となる、任意の予め決定されたレベルまたはレベルの範囲を指す。閾値は、多様な形態をとってよい。それは、中央値または平均値などの単一のカットオフ値であってもよい。それは、例えば１つの規定群におけるリスクが、別の規定群におけるリスクの２倍となる場合などには、閾値は、比較群に基づいて確立してもよい。それは、例えば、検査集団を、等分に（または不等分に）群に、低リスク群、中リスク群および高リスク群に、または四分位に（最も低い四分位は、最も低いリスクを有する対象であり、最も高い四分位は、最も高いリスクを有する対象である）分ける場合には、閾値は、範囲であってもよい。閾値は、選択された特定の集団に依存し得る。例えば、見かけ上健常な集団は、異なる「正常」範囲を有す

10

20

30

40

50

るであろう。別の例として、閾値を、状態もしくはリスクが存在する前に、または処置の経過の前もしくは後に、基線値から決定することができる。かかる基線は、それについて検査がなされているリスクまたは状態と相関しない、対象における正常または他の状態の指標となり得る。いくつかの態様において、閾値は、検査されている対象の基線値であってよい。したがって、選択された予め決定された値は、対象が該当するカテゴリーを考慮し得る。当業者は、慣用的な実験のみを用いて、適切な範囲およびカテゴリーを選択することができる。本明細書において提供される方法、レポート、データベースなどのいずれか1つの閾値は、本明細書において提供される閾値のいずれか1つ、例えば例または図面におけるものであってよい。

#### 【0054】

10

本明細書において提供される閾値は、いくつかの態様においては、対象にとっての細胞性拒絶グレードを決定するか、またはこれを対象に当てはめるために用いることができる。したがって、測定されたDS cf-DNAの量が0.2未満である場合、対象を、CR0の細胞性拒絶グレードに当てはめることができる。量が0.2~0.8である場合、対象を、CR1の細胞性拒絶グレードに当てはめることができる。量が0.8以上である場合、対象を、CR2以上の細胞性拒絶グレードに当てはめることができる。拒絶グレードの指定は、本明細書において提供されるような比較のいずれか1つに基づいて、かかるグレードの他の指標を用いてまたはこれを用いずに、行うことができる。

#### 【0055】

20

閾値はまた、処置および/またはモニタリングの決定を行うための比較のために用いることができる。例えば、DS cf-DNAの量が0.2または0.3と等しいかまたはこれより高い、および/または経時的に増加中である場合、さらなるモニタリングが示され得る。さらなる例として、量が0.8以上である場合、対象の処置が示され得る。量が0.3~0.5である場合、例えば、対象のさらなる検査、例えば生検によるものが示され得る。

#### 【0056】

30

本明細書において提供される閾値は、いくつかの態様においては、対象における抗体媒介性拒絶またはこれに関連するリスクの存在または不在を決定するために用いることができる。したがって、測定されたDS cf-DNAの量が0.2未満である場合、対象が抗体媒介性拒絶を有しない可能性がある。量が0.2以上である場合、対象は、抗体媒介性拒絶を有する可能性がある。抗体媒介性拒絶の存在または不在の決定は、本明細書において提供されるような比較のいずれか1つに基づいて、かかる状態の他の指標を用いてまたはこれを用いずに、行うことができる。

#### 【0057】

40

本明細書において提供される閾値は、いくつかの態様においては、対象における心臓同種移植片脈管障害および/または心停止を決定するために用いることができる。したがって、測定されたDS cf-DNAの量が0.2または0.3と等しいかまたはこれより高い場合、心臓同種移植片脈管障害および/または心停止が示され得る。評価または決定は、本明細書において提供されるような比較のいずれか1つに基づいて、心臓同種移植片脈管障害および/または心停止の他の指標を用いてまたはこれを用いずに、行うことができる。

#### 【0058】

本明細書において提供される閾値は、いくつかの態様においては、対象における移植合併症のリスクを決定するために用いることができる。したがって、測定される全cf-DNAの量が、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19または20 ng/mLと等しいかまたはこれより高い場合、対象は、合併症のリスクが高いと決定され得る。例えば、8または9 ng/mLと等しいかまたはこれより高い量は、心停止の指標であり得る。別の例として、20 ng/mL以上の量は、感染の指標の指標であり得る。決定は、本明細書において提供されるような比較のいずれか1つに基づいて、かかる合併症の他の指標を用いてまたはこれを用いずに、行うことができる。

50

## 【 0 0 5 9 】

したがって、本明細書において提供される方法のいずれか1つは、対象を評価するためのさらなる検査、または対象にかかるさらなる検査を提案する（またはかかるさらなる検査についての情報を提供する）ステップをさらに含んでもよい。さらなる検査は、本明細書において提供される方法のいずれか1つであってよい。さらなる検査は、適宜、本明細書において提供されるかまたは当該分野において他に公知の他の方法のいずれか1つであってよい。

## 【 0 0 6 0 】

例示的な対象のためのさらなる検査として、これらに限定されないが、心エコー、冠動脈造影、血管内超音波検査（IVUS）、生検（例えば、心内膜心筋生検）、負荷心エコー、CT冠動脈造影、冠血流予備比評価（造影心エコー）、負荷心筋血流シンチグラフィ、ポジトロン断層撮影（PET）走査、ならびにBNPおよび/またはトロポニンなどの血清バイオマーカーの測定が挙げられる。本明細書において提供される方法のいずれか1つの他の態様において、BNPおよび/またはトロポニンのレベルに加えての、またはそれらに代わる他の検査は、心エコーである。

## 【 0 0 6 1 】

例示的なさらなる検査として、これらに限定されないが、ドナー特異的抗体（HLA抗体）の存在、生検（例えば、腎生検、心内膜心筋生検）における陽性C4d染色、および抗体により媒介される傷害の病理組織学的エビデンス（例えば、糸球体炎、尿細管周囲毛細血管炎、動脈炎）が挙げられる。

さらなる検査の他の例として、これらに限定されないが、例えば感染が疑われる対象については、これらに限定されないが、血液検査、尿検査、咽喉スワブ、および脊椎穿刺が挙げられる。

さらなる検査の型は、対象の状態の重篤度に依存するか、および/または十分に当業者の決定の範囲内である。

## 【 0 0 6 2 】

DS c f - DNAおよび/または全c f - DNAの量は、多数の方法により決定することができる。いくつかの態様において、かかる方法は、配列決定に基づく方法である。例えば、c f - DNAは、試料のDNAを分析して複数の遺伝子座を同定することにより測定することができ、遺伝子座の各々のアレルを決定してもよく、決定されたアレルに基づいてインフォーマティブな遺伝子座を選択してもよい。本明細書において用いられる場合、「遺伝子座」とは、核酸中のヌクレオチドの位置、例えば、染色体上または遺伝子中のヌクレオチドの位置を指す。本明細書において用いられる場合、「インフォーマティブな遺伝子座」とは、対象の遺伝子型がメジャーアレルについてホモ接合型であり、一方、ドナーの遺伝子型がマイナーアレルについてホモ接合型またはヘテロ接合型である遺伝子座を指す。本明細書において用いられる場合、「マイナーアレル」とは、ある遺伝子座について核酸の集団において頻度がより低いアレルを指す。いくつかの態様において、マイナーアレルは、ドナーの核酸中での当該遺伝子座におけるヌクレオチド同一性である。一方、「メジャーアレル」とは、集団においてより頻繁なアレルを指す。いくつかの態様において、メジャーアレルは、対象の核酸中での当該遺伝子座におけるヌクレオチド同一性である。

## 【 0 0 6 3 】

いくつかの態様において、インフォーマティブな遺伝子座およびアレルは、対象の核酸およびドナーの核酸の前の遺伝子型判定に基づいて決定することができる。例えば、レシピエントおよびドナーの遺伝子型を比較して、インフォーマティブな遺伝子座を、あるヌクレオチド同一性についてレシピエントがホモ接合型であり、異なるヌクレオチド同一性についてドナーがヘテロ接合型またはホモ接合型である遺伝子座として同定することができる。遺伝子型判定のための方法は、当該分野において周知であり、本明細書においてさらに記載される。この例において、マイナーおよびメジャーアレルは、インフォーマティブな遺伝子座における各々のアレルの相対量を決定することにより同定してもよく、およ

び／または、ドナーDNA（マイナーアレル）およびレシピエントDNA（メジャーアレル）中のインフォーマティブな遺伝子座におけるヌクレオチド同一性として同定してもよい。したがって、提供される方法は、レシピエントおよびドナーを遺伝子型判定するステップ、またはかかる遺伝子型を得るかまたはこれらを提供されるステップを、さらに含んでもよい。

#### 【0064】

インフォーマティブな遺伝子座における推定アレル頻度（推定されるマイナーアレル頻度など）を、次いで、好適な様式において計算することができる。いくつかの態様において、推定されるアレル頻度は、統計学的分布を用いてインフォーマティブな遺伝子座におけるアレル（マイナーアレルなど）のカウント数をモデリングすることに基づいて、計算することができる。例えば、推定されるアレル頻度は、二項分布を用いてアレルのリードカウント（read count）をモデリングすることにより、計算することができる。いくつかの態様において、かかる分布のピークが決定され、これは、ドナー特異的cf-DNAのパーセントの指標である。インフォーマティブな遺伝子座におけるマイナーアレルの頻度もまた、最尤法を用いて計算することができる。いくつかの態様において、マイナーアレル頻度（MAF）は、対象の血漿DNAからの遺伝子型により計算することができ、インフォーマティブな遺伝子座についてのドナー遺伝子型は、期待値最大化を用いて推測することができる。いくつかの態様において、メジャーおよび／またはマイナーアレルについてのリードカウントは、アレル頻度を推定することに先立って訂正することができる。

#### 【0065】

DNAは、任意の好適な次世代のまたはハイスループットな配列決定および／または遺伝子型判定の技術を用いて分析することができる。次世代のおよびハイスループットな配列決定および／または遺伝子型判定の技術の例として、これらに限定されないが、大規模並列シグネチャー配列決定（massively parallel signature sequencing：MPSS）、ボロニーシーケンシング（polony sequencing）、454パイロシーケンシング、Illumina（Solexa）シーケンシング、SOLiDシーケンシング、イオン半導体シーケンシング、DNAナノボールシーケンシング、ヘリスコープ（heliscope）単分子シーケンシング、単分子リアルタイム（SMRT）シーケンシング、MassARRAY（登録商標）、およびDigital Analysis of Selected Regions（DANSR（商標））が挙げられる（例えば、Stein RA（2008年9月1日）、「Next-Generation Sequencing Update」、Genetic Engineering & Biotechnology News 28(15)；Quail, Michael；Smith, Miriam E；Coupland, Paul；Otto, Thomas D；Harris, Simon R；Connor, Thomas R；Bertoni, Anna；Swerdlow, Harold P；Gu, Yong（2012年1月1日）、「A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers」、BMC Genomics 13(1): 341；Liu, Lin；Li, Yinhu；Li, Siliang；Hu, Ni；He, Yimin；Pong, Ray；Lin, Danni；Lu, Lihua；Law, Maggie（2012年1月1日）、「Comparison of Next-Generation Sequencing Systems」、Journal of Biomedicine and Biotechnology 2012: 1-11；Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry（MassARRAY（登録商標））、Methods Mol Biol. 2009;578:307-43；Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma. Prenat Diagn 2010;30:1226-9；およびSuzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry 2008;387:55-8を参照）。

#### 【0066】

一態様において、cf-DNAを決定するための方法のいずれか1つは、米国公開番号2015-0086477-A1の方法のいずれか1つであってよく、かかる方法は、その全体において本明細書において参考として援用される。

c f - DNA の量はまた、MOMA アッセイにより決定することができる。一態様において、c f - DNA を決定するための方法のいずれか 1 つは、PCT 公開番号 WO 2016 / 176662 A1 の方法のいずれか 1 つであってよく、かかる方法は、その全体において本明細書において参考として援用される。

【0067】

DS c f - DNA および / または全 c f - DNA は、対象の遺伝子型とドナーの遺伝子型との間の配列同一性の差異を用いて決定することができる。かかる差異は、単一ヌクレオチドバリエーション (SNV) であってよい；しかし、本明細書において SNV が言及される場合は常に、レシピエント特異的核酸とドナー特異的核酸との間の配列同一性の任意の差異もまた、適用可能であると意図される。したがって、本明細書において提供される方法または組成物のいずれか 1 つは、配列同一性に差異が存在する場合には、レシピエント特異的核酸、対、ドナー特異的核酸に適用することができる。本明細書において用いられる場合、「単一ヌクレオチドバリエーション」とは、好ましくはいくつかの態様においては単一のヌクレオチドにおいて、その中で配列変異性が存在する核酸配列を指す。これらの SNV は、DS c f - DNA に対して特異的な、またはこれを同定することができる、任意の変異を含む。SNV のいずれか 1 つ以上に対して、本明細書において提供されるようにプライマーを調製することができる。

【0068】

その中で配列同一性の変異性が存在する核酸配列は、一般に、「標的」として言及される。本明細書において用いられる場合、「SNV 標的」とは、その中で、例えば単一のヌクレオチドにおいて、配列変異性が存在する核酸配列を指す。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、両アレル型である。核酸、例えばドナー特異的核酸は、NV 標的に対して特異的なプライマーを用いて増幅ベースの定量アッセイ、例えば定量 PCR アッセイを行うことにより、極めて低いレベルにあってすら、定量することができる。いくつかの態様において、核酸の量は、複数の SNV 標的に対するプライマーを用いて増幅ベースの定量アッセイ、例えば定量 PCR を試みることにより決定される。「複数の SNV 標的」とは、各々の標的について少なくとも 2 つのアレルが存在する、1 つより多くの SNV 標的を指す。好ましくは、いくつかの態様において、各々の SNV 標的が、両アレル型であることが期待され、SNV 標的の各々のアレルに対して特異的なプライマーペアを用いて各々のアレルの核酸を特異的に増幅し、ここで、特異的アレルの核酸が試料中に存在する場合には、増幅が起こる。本明細書において用いられる場合、1 つのアレルは、標的配列のドナー特異的バージョンであってよく、別のアレルは、当該配列のレシピエント特異的バージョンである。

【0069】

本明細書において提供される方法または組成物のいずれか 1 つの一態様において、SNV 標的に対する 1 つ以上のプライマーペアは、SNV 標的がインフォーマティブであろうという知識に基づいて（例えばドナーの）遺伝子型の知識などにより）、予め選択することができる。かかる態様において、ドナーの遺伝子型は、既知であるか、または決定することができる。したがって、本明細書において提供される方法のいずれか 1 つは、ドナーを遺伝子型判定するステップ、またはドナーの遺伝子型を得るステップを含んでもよい。

【0070】

本明細書において提供される方法のいずれか 1 つの他の態様においては、ドナーの遺伝子型が不明である。かかる場合の一態様においては、ドナー遺伝子型は、期待値最大化法により推測することができる。一例として、既知のレシピエント遺伝子型を用いて、レシピエントにおいてホモ接合型であると知られている標的を選択することができる。任意の混入物がドナー特異的核酸に起因し得、結果として生じるアッセイのコレクションは、三峰性分布；非インフォーマティブなアッセイ、半インフォーマティブなアッセイおよび完全にインフォーマティブなアッセイからなるであろう。十分な数のレシピエントホモ接合型アッセイにより、ドナーの完全インフォーマティブなアッセイの存在を推測することができる。

10

20

30

40

50



## 【 0 0 7 1 】

例えば、レシピエント遺伝子型がホモ接合型であり既知である場合、レシピエント遺伝子型と関連しない測定値（真にドナー - ホモ接合型であるもの）は、最も高いクラスターを有し、半予想値（half the guess）でしかない（半インフォーマティブ）ドナー - ヘテロ接合型であるものと比較して、予想値（guess）に等しい（完全インフォーマティブ）。次いで、確率分布をプロットし、期待値最大化アルゴリズム（EM）を用いてドナー遺伝子型を推測することができる。EMアルゴリズムを用いて、本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、ドナー遺伝子型頻度を推測することができる。したがって、EMアルゴリズムは、全てのアッセイされたSNV標的において最も確率が高いドナー遺伝子型を推測するために用いてもよい。推測されたドナー遺伝子型を用いて、定量は、上で議論される全情報シナリオにおけるもののように行進することができる。EMは、アッセイにおいて見出されるマイナーアレル比が三峰性分布に従う（レシピエント（A）およびドナー（B）の各組み合わせ、すなわち、AA、ABおよびBBについて1つずつ）という推定において始まり得る。全ての不明なドナー遺伝子型により、ほぼゼロのマイナーアレルを示す任意のアッセイは、ドナーAA（すなわち、レシピエントアレル）であり、最高のものは、ドナーBBであるという知識からブートストラップすることが可能である。全てのドナー遺伝子型についての最初の予想値を記録してもよく、各々のクラスターの平均を計算することができる。ドナーBBアッセイの平均がドナーABのものの2倍となるように強制することは、検索を制限する。アルゴリズムは、次いで、クラスターおよびビルトイン仮説に基づいて、予想されたドナー遺伝子型を再割り当てする。プロセスは、それ以上変更が行われなくなるまでは、反復性である。最終結果は、それらの測定されたバックグラウンドからの発散（divergence）を考慮して、最も確率が高いドナー遺伝子型のセットである。一般に、全ての標的が、モデルに該当する；結果は、最大化の後の群の間にあれば、除外することができる。

10

20

## 【 0 0 7 2 】

本明細書において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、複数のSNV標的に対するプライマーペアを、少なくとも1つ（またはより多くの）がインフォーマティブであり得る可能性のために選択することができる。かかる態様において、本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、SNV標的のパネルに対するプライマーペアを用いる。いくつかの態様において、SNV標的のパネルは、少なくとも30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95またはそれより多くの可能な標的のパネルである。

30

## 【 0 0 7 3 】

本明細書において用いられる場合、「インフォーマティブなSNV標的」とは、本明細書において提供されるようなプライマーによる増幅が起こるものであり、その結果は、インフォーマティブである。「インフォーマティブな結果」とは、本明細書において提供される場合、試料中の核酸のレベルを定量するために用いることができる結果である。いくつかの態様において、インフォーマティブな結果は、「コールなし（no call）」とみなされる結果、または誤ったコール結果を除外する。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、インフォーマティブな結果から、標準曲線を用いて、アレルパーセンテージを計算することができる。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、ドナー特異的核酸の量は、それぞれ、ドナー特異的核酸についてのインフォーマティブな結果の間の平均を表す。

40

## 【 0 0 7 4 】

核酸の量は、メジャーおよびマイナーアレルの量、ならびにレシピエントの遺伝子型により決定することができる。いくつかの態様において、本明細書において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、対象の前の遺伝子型判定に基づいて、決定することができる。遺伝子型判定のための方法は、当該分野において周知である。かかる方法は、次世代、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイ、他の分離技術またはPCRアッセイなどの配列決定法を含む。本明細書において提供される方法のいずれか

50

1つは、かかる遺伝子型を得るステップを含んでもよい。

【0075】

MOMAアッセイにおける使用のためのプライマーを得てもよく、本明細書において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ベースの定量アッセイを行うための1つ以上のプライマーペアを得るステップを含んでもよい。一般に、プライマーは、核酸の量を定量することにおけるそれらの使用を促進するユニークな特性を有する。例えば、プライマーペアのフォワードプライマーは、3'ヌクレオチド(例えば、最後から2番目の3'ヌクレオチド)においてミスマッチを有していてもよい。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'ヌクレオチドにおけるものであるが、SNVの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の位置に対して相対的なプライマーのミスマッチの配置を、図1において示す。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反応などの増幅反応において増幅生成物を生成し(好適なりバースプライマーと組み合わせ)、それにより、それぞれのSNVによる核酸の増幅と、結果としてその検出を可能にする。特定のSNVが存在しない場合、かつSNV標的の他のアレルに関して二重ミスマッチが存在する場合、増幅生成物は、一般に、生成されないであろう。好ましくは、本明細書において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、各々のSNV標的に対して、それにより各々のアレルの特異的な増幅が他のアレルの増幅を伴うことなく起こり得るプライマーペアを得る。「特異的な増幅」とは、別の核酸の実質的な増幅を伴わない、またはバックグラウンドもしくはノイズより高い別の核酸配列の増幅を伴わない、標的の特異的なアレルの増幅を指す。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。

【0076】

本明細書において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、両アレル型である各々のSNV標的に対して、2つのプライマーペアが存在し、各々が、2つのアレルのうち的一方に対して特異的であり、したがって、それが増幅すべきアレルに関して単一のミスマッチ、およびそれが増幅すべきではないアレル(これらのアレルの核酸が存在する場合)に関して二重ミスマッチを有する。本明細書において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。本明細書において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、各々のSNV標的に対する2つのプライマーペアのリバースプライマーは、同じである。

【0077】

これらの概念は、本明細書において提供される方法および組成物のいずれか1つについて、プライマーペアの設計において用いることができる。フォワードおよびリバースプライマーは、鋳型の特異的な遺伝子座のフラグメントを増幅させるために、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。プライマーペアのフォワードおよびリバースプライマーは、例えば本開示によるSNV標的のアレルの存在を検出するために、任意の好適なサイズの核酸フラグメントを増幅するように設計することができる。本明細書において提供される方法のいずれか1つは、本明細書において記載されるような1つ以上のプライマーペアを得るための1つ以上のステップを含んでもよい。

【0078】

本明細書において記載されるプライマーペアは、PCRアッセイなどの多重増幅ベースの定量アッセイにおいて用いてもよいことが理解されるべきである。したがって、本明細書において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、プライマーペアは、PCR反応において他のプライマーペアと適合可能であるように設計される。例えば、プライマーペアは、PCR反応において、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5などの他のプライマーペアと適合可能であるように、設計されてもよい。本明細書において用いられる場合、PCR反応におけるプライ

マーペアは、それらが同じPCR反応においてそれらの標的を増幅することができる場合に、「適合可能である」。いくつかの態様において、プライマーペアは、当該プライマーペアが、同じPCR反応において多重化された場合に、それらの標的DNAを増幅することを、1%以下、2%以下、3%以下、4%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、阻害される場合に、適合可能である。プライマーペアは、限定されないが、プライマーダイマーの形成および別のプライマーペアを妨害し得る鋳型上のオフターゲット部位への結合を含む多数の理由のために、適合可能ではない場合がある。したがって、本開示のプライマーペアは、他のプライマーペアとのダイマーの形成を防止するか、またはオフターゲット結合部位の数を限定するように設計されていてもよい。多重PCRアッセイにおける使用のためのプライマーを設計するための例示的な方法は、当該分野において公知であるか、本明細書において別段に記載される。

#### 【0079】

いくつかの態様において、本明細書において記載されるプライマーペアは、ドナー特異的核酸の量を定量するために、PCRアッセイなどの多重増幅ベースの定量アッセイにおいて用いられる。したがって、本明細書において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、プライマーペアは、潜在的に非二倍体であるゲノム領域を検出するために設計されたプライマーペアを除外して、二倍体であるゲノム領域を検出するために設計される。本明細書において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、本開示により用いられるプライマーペアは、既知のコピー数が可変の領域であるリピートマスク領域(repeat-masked region)、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。

#### 【0080】

本明細書において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、増幅ベースの定量的アッセイは、任意の定量的アッセイであって、それにより核酸が増幅され、核酸の量を決定することができるようなものである。かかるアッセイは、それにより、本明細書において記載されるようなMOMAプライマーにより核酸が増幅され、定量されるものを含む。かかるアッセイは、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、次世代配列決定法などを含む。

#### 【0081】

本明細書において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、定量PCRであり、これは、核酸の量を決定することができることを意味する。定量PCRとして、リアルタイムPCR、デジタルPCR、TAQMAN(商標)などが挙げられる。本明細書において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、増幅プロセスがなお進行している間に、液相において反応動態学を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。特異的な色素からの蛍光強度の増大に基づいて、増幅がプラトーに達する前であっても、標的の濃度を決定することができる。

#### 【0082】

複数のプローブの使用は、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、複数のプローブベースのアッセイを用い、ここで、各々のアッセイがユニークな蛍光色素で標識された特異的プローブを有してよく、これにより、各々のアッセイについて観察される色が異なるものとなる。リアルタイムPCR機器は、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、各々がユニークな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、スペクトルシグナルは、別々の光学素子により収集され、一連のフィルターセットを通過して、検出器のアレイにより収集される。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(deconvolute)ために、色素間のスペクトルのオーバーラップは、純粋な色素のスペクトルを用いて補正してもよい。

## 【 0 0 8 3 】

プローブは、本開示の方法のために、特に定量ステップを含む方法のために、有用であり得る。本明細書において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いてプローブの使用を含んでもよく、一方、本明細書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、1つ以上のプローブを含んでもよい。重要なことに、本明細書において提供される方法のいずれか1つ以上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、反対の鎖上にはない。PCR反応においてプローブをそのように組み込むことにおいて、さらなるアレル特異的な区別を提供することができることを見出した。

## 【 0 0 8 4 】

一例として、TAQMAN (商標) プローブは、FAM (商標) またはVIC (登録商標) 色素標識を5'末端に、副溝結合剤(MGB) 非蛍光消光剤(NFQ) を3'末端に有する、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、相補的プローブ結合領域へのハイブリダイゼーションおよびフルオロフォアベースの検出の間に二重標識TAQMAN (商標) プローブを切断するために、Taq (登録商標) ポリメラーゼの5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性に依存する。TAQMAN (商標) プローブは、定量PCR反応の対数ステージの間の定量的測定における検出の特異度を増大することができる。

## 【 0 0 8 5 】

PCR系は、一般に、そのシグナルが、反応におけるPCR生成物の量に対して直接比例して増大する、蛍光色素またはレポーターの検出および定量に依存する。例えば、最も単純かつ最も経済的な形式において、そのレポーターは、二本鎖DNAに特異的な色素SYBR (登録商標) Green (Molecular Probes) であってよい。SYBR (登録商標) Green は、二本鎖DNAの副溝に結合する色素である。SYBR (登録商標) Green 色素が二本鎖DNAに結合すると、蛍光強度が増大する。より多くの二本鎖アンプリコンが生成されるにつれ、SYBR (登録商標) Green 色素シグナルは増大するであろう。

## 【 0 0 8 6 】

本明細書において提供されるPCR条件は、本明細書において記載される方法のいずれか1つに従って機能するために、改変または最適化してもよいことが、理解されるべきである。典型的には、PCR条件は、用いられる酵素、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つ以上のコンポーネントが、改変または最適化される。最適化することができるPCR反応のコンポーネントの非限定的な例として、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、バッファー、プローブ(例えばリアルタイムPCRを行う場合)、バッファー、および反応容積が挙げられる。

## 【 0 0 8 7 】

前述の態様のいずれかにおいて、熱安定性ポリメラーゼを含む任意のDNAポリメラーゼ(DNAヌクレオチドのDNA鎖への重合を触媒する酵素)を利用することができる。好適なポリメラーゼ酵素は、当業者には公知であり、E. coli DNAポリメラーゼ、E. coli DNAポリメラーゼIのKlenowフラグメント、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、Klenow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、またはシーケナーゼを含む。例示的なポリメラーゼとして、これらに限定されないが、Bacillus stearothermophilusのpol I、Thermus aquaticus (Taq) pol I、Pyrococcus furiosus (Pfu)、Pyrococcus woesei (Pwo)、Thermus flavus (Tfl)、Thermus thermophilus (Tth)、Thermus litoris (Tli) およびThermotoga maritima (Tma) が挙げられる。これらの酵素、これらの酵素の改変されたバージョン、および酵素の組み合わせは、Roche、Invitrogen、Qiagen、StratageneおよびApplied Biosystemsを含むベンダーから市販されている。代表的な酵素として、PHUSION (登録商標) (New England Biolabs, Ipswich, MA)、Hot M

10

20

30

40

50

asterTaq (商標) (Eppendorf)、PHUSION (登録商標) Mpx (Finnzymes)、Pyro Start (登録商標) (Fermentas)、KOD (EMD Biosciences)、Z-Taq (TAKARA)、およびCS3AC/LA (KlenTaq, University City, MO) が挙げられる。

【0088】

塩およびバッファーは、当業者が精通しているものを含み、これは、それぞれ、 $MgCl_2$ 、ならびにTris-HClおよびKClを含むものを含む。典型的には、Taq DNAポリメラーゼにとって1.5~2.0 nMのマグネシウムが最適であるが、最適マグネシウム濃度は、鋳型、バッファー、DNAおよびdNTPに依存し得る。なぜならば、各々が、マグネシウムをキレートする可能性を有するからである。マグネシウムの濃度 $[Mg^{2+}]$ が低すぎる場合、PCR生成物が形成されない可能性がある。マグネシウム $[Mg^{2+}]$ が高すぎる場合、望ましくないPCR生成物が観察される場合がある。いくつかの態様において、マグネシウム濃度は、マグネシウム濃度を0.1 mMまたは0.5 mMの増加において約5 mMまで補充することにより、最適化することができる。

【0089】

本開示に従って用いられるバッファーは、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)、ならびに当業者が精通している他のものなどの添加物を含んでもよい。ヌクレオチドは、一般に、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)などのデオキシリボヌクレオシド三リン酸であって、これらはまた、標的核酸の増幅のために適切な量で反応に添加される。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10  $\mu M$ ~約500  $\mu M$ であり、これは、PCR反応において生成されるPCR生成物の長さおよび数に依存し得る。

【0090】

いくつかの態様において、PCR反応において用いられるプライマーの濃度を、改変または最適化してもよい。いくつかの態様において、PCR反応中のプライマー(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  $\mu M$ ~約1  $\mu M$ であってよい。特定の態様において、各々のプライマーの濃度は、約1 nM~約1  $\mu M$ である。本開示に従うプライマーは、PCR反応において同じまたは異なる濃度で用いてもよいことが、理解されるべきである。例えば、プライマーペアのフォワードプライマーを0.5  $\mu M$ の濃度で用いてもよく、当該プライマーペアのリバースプライマーを0.1  $\mu M$ で用いてもよい。プライマーの濃度は、これらに限定されないが、プライマーの長さ、GC含有量、純度、標的DNAとのミスマッチまたはプライマーダイマーを形成する可能性を含む要因に基づき得る。

【0091】

いくつかの態様において、PCR反応の熱プロフィールを、改変または最適化する。PCRの熱プロフィールの改変の非限定的な例として、変性の温度および持続時間、アニーリングの温度および持続時間、ならびに伸長時間が挙げられる。

PCR反応溶液の温度は、変性状態、アニーリング状態、および伸長状態の間で、予め決定されたサイクルの数にわたり、連続的に周回され得る。実際の時間および温度は、酵素、プライマー、および標的に依存的であり得る。任意の所与の反応について、変性状態、ある態様においては、約70~約100の範囲であり得る。加えて、アニーリングの温度および時間は、プライマーが標的核酸中の特定の遺伝子座に結合する特異度および効率に影響を及ぼし得、特定のPCR反応について重要であり得る。任意の所与の反応について、アニーリング状態は、ある態様においては、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°C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)において行うことができる。

【0092】

10

20

30

40

50

伸長の温度および時間はまた、アレル生成物の収率に影響を及ぼし得る。所与の酵素について、伸長状態は、ある態様においては、約 60 ～ 約 75 の範囲であり得る。

PCR アッセイからのアレルの量の定量は、本明細書において提供されるように行うことができるか、別段に当業者には明らかであろう。一例として、一貫性および強力な定量のために、増幅のトレースを分析する。サイクルの閾値をインプット核酸（例えば DNA）の量に換算するために、内部標準を用いてもよい。アレルの量は、性能（performant）アッセイの平均として計算することができ、遺伝子型について補正することができる。

試料中の全セルフリー DNA を決定するための他の方法は、当該分野において公知である。本明細書において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、全セルフリー DNA は、RNase P を標的として用いて、TAQMAN（商標）リアルタイム PCR により決定される。

10

#### 【0093】

本明細書において提供される方法のいずれか 1 つは、対象から得られた試料からセルフリー DNA などの核酸を抽出することを含んでもよい。かかる抽出は、当該分野において公知の任意の方法を用いて、または本明細書において別段に提供されるように、行うことができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、最新版を参照、または QIAamp 循環用核酸キットまたは他の適切な市販のキット）。血液からセルフリー DNA を単離するための例示的な方法を記載する。EDTA または DTA などの抗凝固剤を含む血液を、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、遠心分離またはろ過により）。任意の残留する細胞を血漿から取り除くために、任意の二次的な分離を行ってもよい（例えば、第 2 の心分離またはろ過ステップ）。次いで、当該分野において公知の任意の方法を用いて、例えば市販のキット（Qiagen により製造されるものなど）を用いて、cf-DNA を抽出する。cf-DNA を抽出するための他の例示的な方法は、当該分野において公知である（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）。

20

30

#### 【0094】

本明細書において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、プレ増幅ステップを行う。かかる増幅の例示的な方法は、以下のとおりであり、かかる方法は、本明細書において提供される方法のいずれか 1 つにおいて含まれ得る。約 15 ng のセルフリー血漿 DNA を、Q5 DNA ポリメラーゼを用いて、約 13 の標的により、PCR において増幅し、ここで、プールされたプライマーは、合計で 4 uM であった。試料は、約 25 サイクルを経る。反応は、合計で 25 uL である。増幅後、試料を、AMPURE ビーズ クリーンアップ、ビーズ精製、または単純に ExoSAP-IT（商標）または Zymo を含むいくつかのアプローチを用いて、クリーンアップしてもよい。

40

#### 【0095】

本明細書において用いられる場合、対象からの試料は、生物学的試料であってよい。かかる生物学的試料の例として、全血、血漿、血清、尿などが挙げられる。いくつかの態様において、さらなる核酸、例えば標準物の、試料への添加を行ってもよい。

別の側面において、本明細書において提供されるような 1 つ以上のプライマーペアを含

50

む組成物およびキットが提供される。PCRアッセイなどのアッセイを行うための他の試薬もまた、組成物またはキット中に含まれていてもよい。

【0096】

本発明の多様な側面は、単独で、組み合わせて、または前述のものにおいて記載される態様においては具体的には議論されていない多様な配置において用いてもよく、したがって、それらの適用において、前述の説明において記載される、または図面において説明されるコンポーネントの詳細および配置に限定されない。例えば、一態様において記載される側面は、他の態様において記載される側面と、任意の様式において組み合わせることができる。

また、本発明の態様は、そのうちの一例が提供されている1つ以上の方法として実行してもよい。方法の一部として行われる行為は、任意の好適な方法において指令することができる。したがって、説明されたものとは異なる順序において行為が行われる態様が構築されてもよく、これは、いくつかの行為を、それが説明的態様においては連続的な行為として示されるものであっても、同時に行うことを含んでもよい。

【0097】

通常用語、例えば「第1」、「第2」、「第3」などの、請求の範囲において請求項の要素を修飾するための使用は、それ自体によっては、1つの請求項の要素の、別の要素に対するいかなる優先順位、先行もしくは順序、または方法の行為が行われる時間的順序を暗示しない。かかる用語は、単に、ある名称を有する1つの請求項の要素を、(当該通常用語の使用がなければ)同じ名称を有する別の要素と区別するための標識として用いられる。

本明細書において用いられる語法および用語法は、記載を目的とするものであり、限定するものとしてみなされるべきではない。「含むこと(including)」、「含むこと(comprising)」、「有すること(having)」、「含むこと(containing)」、「含むこと(involving)」、およびこれらのバリエーションの使用は、その後列記される項目およびさらなる項目を包含することを意図される。

【0098】

本発明のいくつかの態様を詳細に説明したことを考慮すれば、当業者には、多様な改変および改善が容易に想起されるであろう。かかる改変および改善は、本発明の精神および範囲の内であることが意図される。したがって、前述の記載は、単なる例であり、限定するものとして意図されるものではない。以下の記載は、本明細書において提供される方法の例を提供する。

【0099】

例

例1 - レシピエントおよびドナーの遺伝子型情報を用いるMOMAアッセイ  
SNV標的選択

本開示に従って多重化するための標的の同定は、以下のステップの1つ以上を含んでもよい。初めに、いくつかの人種対照集団において、高度にヘテロ接合型のSNPをスクリーニングし(ハーディ・ワインベルグ $p > 0.25$ )、既知の困難な領域を除外した。困難な領域として、患者において異常である可能性が高い症候性の領域、ならびに染色体のセントロメアおよびテロメアを含む低複雑度領域が挙げられる。所望される長さの標的フラグメントを、次いでコンピューターシミュレーションにより設計した。具体的には、各々のSNPの70bpのウィンドウにわたる2つの20~26bpのプライマーを設計した。全ての候補プライマーを、次いで、BLASTを用いてGCRh3に対して問い合わせた。十分に特異的であることが見出されたプライマーを保持し、オフターゲットヒットについて(特にフラグメントの3'末端において)モニタリングした。オフターゲット候補ヒットを、サイズ選択を通るであろうペアワイズフラグメント作製について分析した。選択されたプライマーを、次いで、コンピューターシミュレーションによる多重化評価に供した。計算されたプライマーの融解温度およびグアニン・シトシンパーセンテージ(GC%)を用いて、中程度の範囲の配列についてフィルタリングした。反復遺伝子アルゴリズム

ムおよびシミュレーションされたアニーリングを用いて、400の標的について適合可能な候補プライマーを選択し、最終的に800のプライマーの選択肢がもたらされた。800のプライマーを作製し、共通の融解温度において共通の溶液中で、多重化能力について物理的に試験した。具体的には、プライマーを、多重スクリーンにおける一様な増幅および中程度の読み取り深度(read depth)ウィンドウに基づいてフィルタリングした。最上の性能の多重化SNPを用いるMOMAのために、48のアッセイを設計した。各々のSNPは、WT/MUTにおいて4つのミスマッチの選択において設計されたプローブを有した；1アッセイあたり8つのプローブが存在した。70bpの濃縮されたフラグメント中に新たなネステッドプライマーを設計した。最後に、既知のヘテロ接合型個体により、プライマーを実験的に増幅し、増幅効率を評価した(TAQMAN(商標)を用いて、8プローブ×48アッセイを3部)。

10

#### 【0100】

各アッセイの演繹的遺伝子型判定のインフォーマティブ性

各々のアッセイされたSNPにおいて既知のレシピエントおよびドナー遺伝子型を用いて、インフォーマティブなアッセイのサブセットを選択した。ドナーが任意の他の遺伝子型であるレシピエントホモ接合型部位を用いることができることに留意する。加えて、ドナー遺伝子型が不明である場合、それは、例えば血漿データの矛盾を用いることにより、推測することができる。遺伝子型はまた、配列決定、SNPマイクロアレイ、または既知の0%(クリーンな(clean)レシピエント)の試料に対するMOMAアッセイの適用を通して、学習することができる。

20

#### 【0101】

多重アッセイ性能のポストプロセッシング分析

患者特異的MOMAプローブの偏りを、実験コホートの間で推定した。選択を、反復的に精密化して、最終的なドナーのパーセントのコールを行った。さらに、自動外れ値検出が、患者特異的な異常ゲノム領域を提供した。

再構築実験

既知の混合比により再構築された血漿試料を用いて、アッセイの感度および正確性を評価した。具体的には、1:10、1:20、1:100、1:200および1:1000の比を評価した。

再構築実験の結果を、図2において示す。ホモ接合型レシピエントに対するホモ接合型ドナーが存在する1つの標的は、完全にインフォーマティブである(網掛けされたデータポイント)。ホモ接合型レシピエントに対するヘテロ接合型ドナーが存在する他の標的は、半インフォーマティブである(オープンなデータポイント)。

30

#### 【0102】

例2 - レシピエントの遺伝子型情報を用いるがドナーの遺伝子型情報を用いないMOMAアッセイ

ドナー遺伝子型情報なしで研究するために、インフォーマティブなアッセイを推測して、血漿試料中のドナー特異的セルフリーDNAの定量を可能にするために、以下の手順を行うことができる。全アッセイを、完全な情報のシナリオにおいて性能について評価した。この手順は、したがって、各々のアッセイにおけるクリーンなAA/AB/BB遺伝子型および各々の定量の不偏挙動を推測した。レシピエントの遺伝子型により、レシピエントにおいてホモ接合型であると知られるアッセイを選択した。任意の混入物が、ドナー核酸に起因し得、アッセイの集合は、非インフォーマティブ、半インフォーマティブおよび完全インフォーマティブなアッセイに対応する3つのアッセイのクラスターによる三峰性分布を作成した。十分な数のレシピエントホモ接合型アッセイにより、ドナーの完全にインフォーマティブなアッセイの存在を推測することができる。

40

#### 【0103】

レシピエント遺伝子型がホモ接合型かつ既知である場合、レシピエントの遺伝子型ではない測定値が観察され、真にドナー - ホモ接合型であるプローブは、最も高いクラスターを有し、予想値に等しく、一方、ナーヘテロ接合型であるものは、予想値の半分となるで

50



あろう。確率分布を、プロットしてもよく、期待値最大化アルゴリズム (EM) を使用して、ドナー遺伝子型を推定してもよい。このようなものを用いて、本明細書において提供される方法のいずれか1つにおいて、ドナー遺伝子型頻度を推測することができる。したがって、EMアルゴリズムを用いて、全てのアッセイされたSNV標的において最も確率が高いドナー遺伝子型を推定した。推測されたドナー遺伝子型により、定量は、完全な情報のシナリオにおけるもののよう進行し得る。EMは、あるアッセイにおいて見出されるマイナーアレル比は、全てのアッセイがレシピエントにおいて「AA」である（または一般性を失うことなく「BB」からはじき出された）と仮定して、三峰性分布（1つずつ、レシピエントおよびドナーの各々の組み合わせについて）に従うという推測から始まり得る。全ての不明なドナー遺伝子型により、ほぼゼロのマイナーアレルを示す任意のアッセイは、ドナーAAであるという知識からブートストラップすることが可能であり、最も高いものはドナーBBである。全てのドナー遺伝子型についての最初の予想値を記録し、各々のクラスターの平均を計算した。ドナーBBアッセイの平均がドナーABのものの2倍になるように強制することにより、検索が制限される。次いで、アルゴリズムが、クラスターおよびビルトイン仮説に基づいて、予想されるドナー遺伝子型を再割り当てする。プロセスは、それ以上変更が行われなくなるまでは、反復性である。最終結果は、それらの測定されたバックグラウンドからの発散を考慮して、最も確率が高いドナー遺伝子型のセットである。一般に、全ての標的が、モデルに該当する；結果は、最大化の後の群の間にあれば、除外する (toss) ことができる。

#### 【0104】

図3および4は、この様式において扱われる血漿試料からの例示的な結果を示す。x軸は、レシピエントをホモ接合型であると見出した任意のアッセイについてのドナー%である。点の行は、個々のPCRアッセイ結果を表す。最も下の円の行は、ドナー遺伝子型の最初の予想値を表し、いくつかはAAであり、いくつかはA/Bであり、いくつかはBBである。次いで、最初のアッセイにおいて中心となったベータ分布を表す実線の曲線を引き、これはホモ接合型（完全インフォーマティブ）であることが見出され、白色はヘテロ接合型（半インフォーマティブ）、黒い曲線は非インフォーマティブなアッセイの分布またはバックグラウンドノイズを表す。アッセイを再割り当てし、予想値を第2の行においてアップデートした。第2の行の曲線は、破線を用いる。変化が起らなかったもので、一番上の行が最終的な推定値である。白色の破線の曲線のピークを2倍すると、約10%における、または点線の曲線の平均に等しい、最尤ドナー%のコールに対応する。

#### 【0105】

2人の個体からのDNAを用いた再構築実験 (Recon 1) を10%、5%、1%、0.5%および0.1%において作成した。全てのミックスを、標的の多重ライブラリーにより増幅し、浄化し、次いでMOMA法を用いて定量的に遺伝子型判定した。分析は、各個体の真の遺伝子型を知るために、彼らを遺伝子型判定することにより行った。メジャー個体の遺伝子型の前の知識を用いて（ホモ接合型部位を探して）、第2の個体が異なっていた場合、インフォーマティブな標的を決定し、インフォーマティブな標的を用いて画分（パーセンテージ）を計算するために用いた。次いで画分を計算した（黒色で表し、「遺伝子型あり」情報を表示する）。

#### 【0106】

第2の再構築実験 (Recon 2) は、メジャーおよびマイナーの2個体を用いて開始し、これもまた10%、5%、1%、0.5%および0.1%において作成した。全てのミックスを、標的の多重ライブラリーにより増幅し、浄化し、次いでMOMA法を用いて定量的に遺伝子型判定した。分析は、各個体の真の遺伝子型を知るために、彼らを遺伝子型判定することにより行った。上記のように第2の個体の遺伝子型の前の知識を用いてインフォーマティブな標的を決定した。次いで画分を計算した（黒色で表し、「遺伝子型あり」情報を表示する）。

これらの再構築を、翌日再び実行した (Recon 3)。

#### 【0107】

同じ再構築試料 (Recon 1、2、3) を、次いで、第 1 の個体 (メジャー DNA 寄与体) について利用可能な遺伝子型判定情報のみを用いて、再び分析した。第 2 の個体 (マイナー DNA 寄与体) からの遺伝子型判定情報は用いなかった。約 38 ~ 40 の標的を用いて、遺伝子型判定を用いずに (ドナーなしでシミュレーションする) 画分を計算した; をれらを、網掛け点として表す (図 5)。レシピエントホモ接合型であった各々の標的が、一般に有用であることを見出した。円は、第 1 の推定値、二値化を示す; 右側のものは、完全にインフォーマティブであると考えられ、左側のものはそうではない。上部に沿った三角形は、同じ標的であったが、最終的なインフォーマティブ性の決定のために、それらを色替えした。

【0108】

10

### 例 3 - MOMA cf - DNA アッセイ

#### MOMA cf - DNA アッセイの原理および手順

この例示的なアッセイは、移植レシピエントの血液試料中に存在する DS 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、レシピエントの血液試料は、EDTA 管中に収集し、遠心分離して、血漿およびパフィーコートを分離する。血漿およびパフィーコートは、2 つの別々の 15 mL 円錐管中に等分して凍結することができる。血漿試料は、定量的遺伝子型判定 (qGT) のために用いることができ、一方、パフィーコートは、基本的なレシピエントの遺伝子型判定 (bGT) のために用いることができる。移植レシピエントの血液試料に加えて、ドナーからの廃棄された組織または血液試料の薄片を、基本的な遺伝子型判定のために用いることができる。

20

【0109】

プロセス中の第 1 のステップは、血漿試料 (qGT のために用いられる) からセルフリー DNA を、パフィーコート、全血または組織試料 (bGT のために用いられる) からゲノム DNA (gDNA) 抽出することであってよい。cfDNA の合計量を、qPCR により決定して、標的濃度に対して正規化することができる。このプロセスは、cfDNA 定量として公知である。gDNA は、UV 分光光度法を用いて定量し、正規化することができる。15 ng の DNA が、一般に、正確かつ有効な結果を提供する。

【0110】

正規化された患者 DNA は、例えば各々が MOMA 標的部位のうちの 1 つを含む領域を増幅する 96 のプライマーペアを含む、高度に多重化されたライブラリー PCR 増幅反応中へのインプットとして用いることができる。結果として生じるライブラリーは、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ので、bGT または qGT アッセイのいずれかのためのインプットとして用いることができる。このステップは、高度に特異的な qPCR 増幅の前に各々の標的のコピー数を増大させることにより、アッセイ全体の感度を改善することができる。対照および標準物質 (calibrator) / 標準 (standard) を、患者の試料と共に多重ライブラリーにより増幅してもよい。ライブラリー増幅の後で、下流の増幅が妨げられることを防ぐために、酵素によるクリーンアップを行って過剰なプライマーおよび組み込まれなかったデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を取り除いてもよい。

30

【0111】

40

平行したワークフローにおいて、マスターミックスを調製して、384 ウェルの PCR プレートに移してもよい。増幅された試料、対照および標準物質 / 標準を、次いで、ライブラリー希釈バッファーで、予め決定された容積および濃度まで希釈してもよい。希釈された試料および対照を、6 ウェルのリザーバプレートに等分して、アコースティックリキッドハンドラー (acoustic liquid handler) を用いて 384 ウェルの PCR プレートに移してもよい。次いで、プレートを密封して、リアルタイム PCR 増幅および検出系に移動してもよい。

【0112】

MOMA は、移植ドナーとレシピエントとの間で区別し得る可能性が高くそれらを高度にインフォーマティブにしている両アレル型 SNP を標的とすることにより、基本的なお

50

よび定量的な両方の遺伝子型判定分析を行うことができる。基本的な遺伝子型判定分析は、レシピエントおよびドナーを、各々の標的（例えばホモ接合型 R E F、ヘテロ接合型 R E F および V A R、ならびにホモ接合型 V A R）において、3つの可能な遺伝子型で標識することができる。この情報は、マイナー種率（minor-species proportion）として知られる各々の標的についてのアレル比を定量するために、標準曲線と共に、定量的遺伝子型判定分析のために用いることができる。全てのインフォーマティブなおよび品質管理を通過したアレル比の中央値を、D S c f D N A の % を決定するために用いることができる。

#### 【0113】

#### 例4 - コンピューターにより実行される態様の例

10

いくつかの態様において、上記の診断技術は、対象について試料を（例えば経時的に）分析し、試料中の核酸（セルフリーDNAなど）を測定し、試料中の核酸（セルフリーDNAなど）を測定し、および試料のうちの1つ以上に基づいて結果（診断結果など）をもたらすために、1つ以上のソフトウェア設備を実行する1つ以上のコンピューター処理デバイスを介して、実装することができる。図6は、いくつかの態様が作動することができるコンピューターシステムの例を説明するが、態様は、図6において説明される型の系により作動することに限定されないことが、理解されるべきである。

#### 【0114】

図6のコンピューターシステムは、対象802、および対象806から試料806を得ることができる医師804を含む。前述のものから理解されるであろうが、試料806は、対象802における核酸（セルフリーDNAなど）の存在を測定するために用いてもよい、対象802についての生物材料の任意の好適な試料であってよく、これは、血液試料を含む。試料806を、分析デバイス808に提供することができ、当業者は前述のものから理解するであろうが、これが、核酸（セルフリーDNAなど）の量（試料806および/または対象802におけるDS核酸（DSセルフリーDNAなど）および/または全核酸（全cf-DNAなど）の量を含む）を決定する（推定することを含む）ために、試料808を分析する。説明を容易にするために、分析デバイス808を単一のデバイスとして表すが、分析デバイス808は任意の好適な形態をとってよく、いくつかの態様においては複数のデバイスとして実装されてもよいことが、理解されるべきである。試料806および/または対象802中の核酸（セルフリーDNAなど）の量を決定するために、分析デバイス808は、上記の技術のいずれを行ってもよく、任意の特定の分析を行うことに限定されない。分析デバイス808は、ソフトウェアにおいて実装される分析設備を実行するための1つ以上のプロセッサーを含んでもよく、これは、他のハードウェアを作動させるプロセッサーを駆動して、他のハードウェアにより行われたタスクの結果を受け取って分析の全結果（これは試料806および/または対象802中の核酸（セルフリーDNAなど）の量であってもよい）を決定することができる。分析設備は、デバイス808のメモリーなどの1つ以上のコンピューター可読ストレージ媒体中に記憶されていてもよい。他の態様において、本明細書において記載される試料を分析するための技術は、部分的にまたは完全に、Application Specific Integrated Circuits (ASIC) などの1つ以上の特別な目的のコンピューターコンポーネントにおいて、またはソフトウェア実装の代わりとなり得る任意の他の好適なコンピューターコンポーネントの形態を通して、実装してもよい。

20

30

40

#### 【0115】

いくつかの態様において、医師804は、試料806を分析デバイス808に直接提供してもよく、および対象802から試料806を得ることに加えてデバイス808を操作してもよく、一方、他の態様においては、デバイス808は、医師804および対象802から地理的に離れて位置していてもよく、試料806は、分析デバイス808の位置に輸送されるか、別段に移されてもよい。試料806は、いくつかの態様においては、試料806および/または対象802について、試料806が得られた日付および/または時間についての識別子、または試料806を記載または同定する他の情報と一緒に（例えば

50

、任意の好適なインターフェースを介して入力される)、分析デバイス 808 に提供することができる。

【0116】

分析デバイス 808 は、いくつかの態様において、試料 806 に対して行われた分析の結果を、コンピューター処理デバイス 810 に提供するように設計されていてもよい。デバイス 810 は、データストア 810A を含んでもよく、これは、データベースまたは他の好適なデータストアとして実装することができる。コンピューター処理デバイス 810 は、いくつかの態様においては、1つ以上のサーバーとして実装してもよく、これは、1つ以上の物理的計算機および/またはクラウドサービスプロバイダーなどの分散コンピューティングプラットフォームの仮想計算機を含む。他の態様において、デバイス 810 は、デスクトップまたはラップトップのパーソナルコンピューター、スマートモバイルフォン、タブレットコンピューター、特別な目的のハードウェアデバイス、または他のコンピューター処理デバイスとして、実装してもよい。

10

【0117】

いくつかの態様において、分析デバイス 808 は、その分析の結果を、1つ以上の有線および/または無線の、ローカルおよび/または広域のコンピューターコミュニケーションネットワーク(インターネットを含む)を介して、デバイス 810 に伝達することができる。分析の結果は、任意の好適なプロトコルを用いて伝達することができ、試料 806 および/または対象 802 についての、試料 806 が得られた日付および/または時間についてのまたは試料 806 が得られた日付および/または時間についての識別子などの、試料 806 を記載または同定する情報と一緒に伝達することができる。

20

【0118】

コンピューター処理デバイス 810 は、ソフトウェアにおいて実装される診断設備を実行するための1つ以上のプロセッサを含んでもよく、これは、本明細書において記載される診断技術を行うためのプロセッサを駆動することができる。診断設備は、デバイス 810 のメモリーなどの1つ以上のコンピューター可読ストレージ媒体に記録されていてもよい。他の態様において、本明細書において記載される試料を分析するための技術は、部分的にまたは完全に、Application Specific Integrated Circuits (ASIC) などの1つ以上の特別な目的のコンピューターコンポーネントにおいて、またはソフトウェア実装の代わりとなり得る任意の他の好適なコンピューターコンポーネントの形態を通して、実装してもよい。

30

【0119】

診断設備は、分析の結果および試料 806 を記載または同定する情報を受け取ってもよく、その情報をデータストア 810A において記録してもよい。情報は、対象 802 についての前の試料に関する情報が先に受け取られており、診断設備により記録されている場合などにおいては、対象 802 についての他の情報と関連づけてデータストア 810A において記録することができる。複数の試料に関する情報は、対象 802 についての識別子などの共通の識別子を用いて、関連づけることができる。いくつかの場合において、データストア 810A は、複数の異なる対象についての情報を含んでもよい。

【0120】

40

診断設備はまた、対象 802 についての診断を決定するために、ユーザーの入力により同定される特定の対象 802 についての1つ以上の試料 806 の分析の結果を分析するために、作動させることができる。診断は、対象 802 が特定の状態を有するか、これを有し得るか、または将来的にこれを発症し得るリスクの結論であってよい。診断設備は、特定の試料 806 について決定された核酸(セルフリーDNAなど)の量を、1つ以上の閾値と比較することによるもの、または試料 806 について経時的に決定された核酸(セルフリーDNAなど)の量の経時的な変化を、1つ以上の閾値などと比較することによるものを含む、上記の多様な例のいずれかを用いて、診断を決定することができる。例えば、診断設備は、1つ以上の試料 806 についての核酸(セルフリーDNAなど)の量を1つの閾値と比較すること、および同じ試料 806 についての核酸(セルフリーDNAなど)

50

の量を別の閾値と比較することにより、対象 8 0 2 にとっての状態の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、診断設備は、対象 8 0 2 にとっての状態のリスクの指標である出力をもたらすことができる。

#### 【 0 1 2 1 】

前述のものから理解されるであろうが、いくつかの態様において、診断設備は、核酸（セルフリーＤＮＡなど）の量を比較することができる異なる閾値を用いて、設計することができる。異なる閾値は、例えば、異なる人口統計学的な群（年齢、性別、人種、経済的なクラス、既往歴における特定の手順／状態／その他の存在もしくは不在、または他の人口統計学的なカテゴリー）、異なる状態、および／または他のパラメーターもしくはパラメーターの組み合わせに対応し得る。かかる態様において、診断設備は、コンピューター処理デバイス 8 1 0 のメモリーにおいて記録された異なる閾値を用いて、それに対して核酸（セルフリーＤＮＡなど）の量を比較すべき閾値を選択するように設計することができる。選択は、したがって、人工統計学的群に基づいて閾値が異なる態様においては、対象 8 0 2 についての人工統計学的情報に基づいたものであってよく、これらの場合においては、対象 8 0 2 についての人工統計学的情報は、診断設備に提供されても、あるいは、対象 8 0 2 についての識別子を用いて、診断設備により（別のコンピューター処理デバイス、もしくはデータストア 8 1 0 A と同じであっても異なってもよいデータストアから、または任意の他の好適なソースから）検索されてもよい。選択は、さらに、または代替的に、リスクを決定すべき状態に基づいたものであってよく、診断設備は、リスクを決定する前に、入力として条件を受け取り、リスクの決定が基づく閾値を選択するために当該条件を用いてもよい。診断設備は、複数の閾値が支持される態様において、任意の特定の様式において閾値を選択することに限定されないことが、理解されるべきである。

#### 【 0 1 2 2 】

いくつかの態様において、診断設備は、対象 8 0 2 についてのリスクの診断および／または診断のための基礎を含むユーザーインターフェースをユーザーに提示するために出力するように設計することができる。診断についての基礎は、例えば、対象 8 0 2 についての 1 つ以上の試料 8 0 6 において検出された核酸（セルフリーＤＮＡなど）の量を含んでもよい。いくつかの態様において、ユーザーインターフェースは、上で議論された結果、値、量、グラフなどの例のうちのいずれを含んでもよい。それらは、経時的な結果、値、量などを含んでもよい。例えば、いくつかの態様において、ユーザーインターフェースは、本明細書において提供される図面のいずれか 1 つにおいて示されるものと類似のグラフを取り込んでもよい。かかる場合において、いくつかの場合においては、グラフの異なる領域がグラフにおいて提示されるデータの分析からもたらされ得る異なる診断にどのように対応し得るかをユーザーに示すために、グラフに注釈をつけてもよい。例えば、グラフ表示されたデータを、分析を決定するために比較することができる閾値を、グラフ上に組付け（impose）してもよい。

#### 【 0 1 2 3 】

グラフ（特に線および／または網掛けを有するもの）を含むユーザーインターフェースは、ユーザーに、核酸（セルフリーＤＮＡなど）の量に基づいて対象 8 0 2 のリスクを決定するために、他のユーザーインターフェースを通して提供され得るものよりもはるかにより直観的であり、かつレビューがより早いインターフェースを提供する。しかし、態様は、任意の特定のユーザーインターフェースにより実装されることに限定されないことが、理解されるべきである。

#### 【 0 1 2 4 】

いくつかの態様において、診断設備は、診断またはユーザーインターフェースを、対象 8 0 2 および／または医師（医師 8 0 4 または別の医師であってよい）により操作され得る 1 つ以上の他のコンピューター処理デバイス 8 1 4 （デバイス 8 1 4 A、8 1 4 B を含む）に出力することができる。診断設備は、診断および／またはユーザーインターフェースを、ネットワーク 8 1 2 を介してデバイス 8 1 4 に伝達することができる。

#### 【 0 1 2 5 】

10

20

30

40

50

本明細書において記載される原理に従って作動する技術は、任意の好適な様式において実装することができる。上の議論に含まれるのは、核酸（セルフリーDNAなど）の量の分析に基づいて状態のリスクを決定する多様なプロセスのステップおよび行為を示す、一連のフローチャートである。上で議論されるプロセッシングおよび決定のブロックは、これらの多様なプロセスを実行するアルゴリズム中に含まれ得るステップおよび行為を代表する。これらのプロセスに由来するアルゴリズムは、統合されたソフトウェアとして実装することができる、1つ以上の専用プロセッサまたは多目的プロセッサの操作を指揮することは、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装してもよく、または任意の他の好適な様式において実装してもよい。態様が、任意の特定のシンタックス、または任意の特定の回路もしくは任意の特定のプログラミング言語の作動、またはプログラミング言語の型に限定されないことが、理解されるべきである。むしろ、当業者は、本明細書において記載される技術の型を行う特定の装置のプロセッシングを実施するために、回路を製造するため、またはコンピュータソフトウェアアルゴリズムを実装するために、上の記載を使用することができる。本明細書において別段に示されない限り、上記のステップおよび／または行為の特定の配列は、実装することができるアルゴリズムの単なる説明であって、本明細書において記載される原理の実装および態様において異なってもよいことが、理解されるべきである。

10

**【0126】**

したがって、いくつかの態様において、本明細書において記載される技術は、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、または任意の他の好適な型のコンピュータコードを含むソフトウェアとして実装された、コンピュータにより実行可能な指示において、具体化することができる。かかるコンピュータにより実行可能な指示は、多数の好適なプログラミング言語および／またはプログラミングもしくはスクリプトツールのうちのいずれかを用いて記述することができ、また、フレームワークまたは仮想計算機上で実行される、実行可能なマシン原語コードまたは中間コードとしてコンパイルすることができる。

20

**【0127】**

本明細書において記載される技術をコンピュータにより実行可能な指示として具体化する場合、これらのコンピュータにより実行可能な指示は、任意の好適な様式において実装することができる、これは、これらの技術に従って作動するアルゴリズムの実行を完了するために、各々が1つ以上の作動を提供する多数の機能設備を含む。「機能設備」は、インスタンス化されている場合であっても、1つ以上のコンピュータと統合されてこれにより実行される場合、当該1つ以上のコンピュータに特定の演算子（operational role）を実行させる、コンピュータシステムの構造的コンポーネントである。機能設備は、全ソフトウェアエレメントの一部であってもよい。例えば、機能設備は、プロセスの関数として、別個のプロセスとして、または任意の他の好適なプロセッシングの単位として、実装することができる。本明細書において記載される技術が複数の機能設備として実装される場合、各々の機能設備は、それ自体の方法において実装することができる；全てが同じ方法で実装される必要はない。加えて、これらの機能設備は、適宜、並行しておよび／または連続的に実行することができ、それらが実行中のコンピュータ上の共用メモリーを用いて、メッセージパッシングプロトコルを用いて、または任意の他の好適な方法において、互いに情報を受け渡すことができる。

30

40

**【0128】**

一般に、機能設備は、特定のタスクを行う、または特定の抽象データ型を実装する、ルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造などを含む。典型的には、機能設備の機能性は、それらが作動する系において所望されるように、組み合わせるかまたは分散させることができる。いくつかの実装において、本明細書における技術を実施する1つ以上の機能設備は、一緒になって、完全なソフトウェアパッケージを形成することができる。これらの機能設備は、代替的態様において、他の無関係な機能設備および

50

／またはプロセスと相互作用するように、ソフトウェアプログラムアプリケーションを実装するために、適応させることができる。

【 0 1 2 9 】

いくつかの例示的な機能設備は、1つ以上のタスクを実施するために、本明細書において記載してきた。しかし、記載されるタスクの機能設備および部門は、単に、本明細書において記載される例示的な技術を実装することができる機能設備の型を説明するものであって、態様は、任意の特定の機能設備の数、部門、または型において実装されることに限定されないことが、理解されるべきである。いくつかの実装において、全ての機能性は、単一の機能設備において実装することができる。また、いくつかの実装において、本明細書において記載される機能設備のうちのいくつかは、他のものと共に、またはこれらとは別に（すなわち、単一の単位として、または別々の単位として）実装してもよく、あるいはこれらの機能設備のうちのいくつかは、実装されなくともよいことが、理解されるべきである。

10

【 0 1 3 0 】

本明細書において記載される技術を実装する（1つ以上の機能設備として、または任意の他の様式において実装される場合）、コンピューターにより実行可能な指示は、いくつかの態様において、媒体に機能性を提供するために、1つ以上のコンピューター可読媒体上でコード化されていてもよい。コンピューター可読媒体として、ハードディスクドライブなどの磁気媒体、コンパクトディスク（CD）もしくはデジタルバーサタイルディスク（DVD）などの光学媒体、永続的もしくは非永続的のソリッドステートメモリー（例えば、フラッシュメモリー、磁気RAMなど）、または任意の他の好適なストレージ媒体が挙げられる。かかるコンピューター可読媒体は、任意の好適な様式において実装することができ、これは、コンピューター処理デバイスの一部としてのもの、またはスタンドアローンの別のストレージ媒体としてのものを含む。本明細書において用いられる場合、「コンピューター可読媒体」（また「コンピューター可読ストレージ媒体」とも称される）とは、有体ストレージ媒体を指す。有体ストレージ媒体は、非一過性であり、少なくとも1つの物理的な構造的コンポーネントを有する。「コンピューター可読媒体」において、本明細書において用いられる場合、少なくとも1つの物理的な構造的コンポーネントは、情報が埋め込まれた媒体を作成するプロセス、その上に情報を記録するプロセス、または情報を有する媒体をコード化する任意の他のプロセスの間に、何らかの方法において変更することができる、少なくとも1つの物理的特性を有する。例えば、コンピューター可読媒体の物理的構造の一部の磁化状態は、記録プロセスの間に変更することができる。

20

30

【 0 1 3 1 】

全てではないがいくつかの、技術がコンピューターにより実行可能な指示として具体化され得る実装において、これらの指示は、任意の好適なコンピューターシステムにおいて作動する1つ以上の好適なコンピューター処理デバイス上で実行することができ、これは、図6の例示的なコンピューターシステムを含むか、または1つ以上のコンピューター処理デバイス（または1つ以上のコンピューター処理デバイスの1つ以上のプロセッサ）を、コンピューターにより実行可能な指示を実行するようにプログラムすることができる。コンピューター処理デバイスまたはプロセッサは、コンピューター処理デバイスまたはプロセッサにアクセス可能な様式において、例えばデータストア（例えば、オンチップキャッシュまたは命令レジスター、バスを介してアクセス可能なコンピューター可読ストレージ媒体など）において、指示が記録される場合、指示を実行するようにプログラムすることができる。これらのコンピューターにより実行可能な指示を含む機能設備は、単一の多目的のプログラム可能なデジタルコンピューター処理デバイス、処理能力を共有して本明細書において記載される技術を共同で実施する2つ以上の多目的コンピューター処理デバイスの同調系、本明細書において記載される技術を実行することに特化した単一コンピューター処理デバイスまたはコンピューター処理デバイスの同調系（共同設置されているか、または地理的に分散したもの）、本明細書において記載される技術を実施するための1つ以上のField-Programmable Gate Array（FPGA）、または任意の他の好適

40

50

な系と統合されて、その作動を指揮することができる。

【 0 1 3 2 】

回路および／またはコンピューターにより実行可能な指示において技術が実装される態様を記載してきた。いくつかの態様は、少なくとも1つの例が提供されている方法の形態におけるものであってよいことが、理解されるべきである。方法の一部として行われる行為は、任意の好適な方法において順序付けることができる。したがって、説明されたものと異なる順序において行為が行われる態様を構築することができ、これは、説明的態様においては連続的な行為として示されたものであっても、いくつかの行為が同時に行われることを含んでもよい。前述のデバイス、系、態様、方法、技術、アルゴリズム、媒体、ハードウェア、ソフトウェア、インターフェース、プロセッサ、ディスプレイ、ネットワーク、入力、出力、またはこれらの任意の組み合わせを含む前述のもののいずれか1つは、本明細書において他の側面において提供される。

10

【 0 1 3 3 】

例5 - 移植手術の後の対象の経過をモニタリングするためのcf-DNAの使用

図7および8において示されるとおり、cf-DNAのレベルは、移植手術の後で約第8日において基線まで着実に低下する傾向がある。

【 0 1 3 4 】

例6 - ドナー特異的セルフリーDNA(DS cf-DNA)の細胞性拒絶グレードとの相関

MOMAアッセイを用いて、移植レシピエントのドナー特異的cf-DNAを定量し、かかるアッセイについての例示的なステップは、本明細書において提供される。例示的な図13～37および81～90において示されるとおり、細胞性拒絶のグレードおよび／またはそれに付随するリスクを予測することができるように、閾値(「カットポイント」)値を、実験により決定した。また、いくつかの結果を、表にして、以下の表1～24において示す。

20

表1 . 既知のドナー遺伝子型を用いる方法および不明なドナー遺伝子型を用いる方法を用いた統計学的試験

30

40

50



【表 1 - 1】

	拒絶		
	CR0 または CR1 中央値[IQR]	CR2 中央値[IQR]	未試験または未報告 中央値[IQR]
N	161	4	108
方法 1	0.11 [0.07, 0.26]	0.97 [0.88, 1.06]	0.54 [0.23, 1.67]
方法 2			
MLE	0.09 [0.06, 0.22]	0.70 [0.33, 2.88]	0.28 [0.15, 1.40]
95% LB	0.07 [0.04, 0.16]	0.43 [0.23, 2.17]	0.21 [0.11, 0.86]
95% UB	0.13 [0.08, 0.34]	0.92 [0.47, 3.30]	0.47 [0.22, 1.67]
N cfDNA	180	5	113
全 cfDNA	5.70 [3.72, 10.32]	5.83 [5.23, 14.91]	16.63 [8.28, 37.90]
帰無仮説			
統計学的試験			
拒絶グレードカテゴリー間で中央値は同じである (CR0 または CR1 vs CR2)			
N			
方法 1	p=0.388	独立試料中央値試験	
方法 2			
MLE	p=0.120	独立試料中央値試験	
95% LB	p=0.126	独立試料中央値試験	
95% UB	p=0.126	独立試料中央値試験	
N cfDNA			
全 cfDNA	p=0.990	独立試料中央値試験	

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

	拒絶		
	CR0 中央値[IQR]	CR1 中央値[IQR]	CR2 中央値[IQR]
N	139	22	4
方法 1	0.11 [0.06, 0.21]	0.29 [0.11, 0.59]	0.97 [0.88, 1.06]
方法 2			
MLE	0.09 [0.06, 0.17]	0.43 [0.11, 5.90]	0.70 [0.33, 2.88]
95% LB	0.06 [0.04, 0.11]	0.35 [0.08, 4.04]	0.43 [0.23, 2.17]
95% UB	0.11 [0.08, 0.25]	0.82 [0.17, 6.28]	0.92 [0.47, 3.30]
N cfDNA	156	24	5
全 cfDNA	5.59 [3.76, 11.32]	5.82 [3.53, 8.51]	5.83 [5.23, 14.91]

帰無仮説		統計学的試験
拒絶グレードカテゴリー間で中央値は同じである (CR0 vs CR1 vs CR2)		
N		
方法 1	p=0.046	独立試料中央値試験
方法 2		
MLE	p=0.001	独立試料中央値試験
95% LB	p<0.001	独立試料中央値試験
95% UB	p<0.001	独立試料中央値試験
N cfDNA		
全 cfDNA	p=0.896	独立試料中央値試験

10

20

【0135】

表 2 . 実験により決定された C R 0 カットポイントを用いたクロス集計 ( 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A )

【表 2】

細胞_拒絶 0 による gr1 の表 (p=0.02)			
gr1	細胞_拒絶 0		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
方法 1<=0.18	13 12.87 23.64	88 87.13 70.40	101
方法 1>0.18	42 53.16 76.36	37 46.84 29.60	79
合計	55	125	180
頻度不明= 34			

30

40

【0136】

表 3 . 実験により決定された C R 0 カットポイントを用いたクロス集計 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A )

50

【表 3】

細胞_拒絶 0 による gr1 の表 (p=0.11)			
gr1	細胞_拒絶 0		
頻度 行 Pct 列 Pct	なし	あり	合計
方法 2<=0.18	29 21.97 35.80	103 78.03 77.44	132
方法 2>0.18	52 63.41 64.20	30 36.59 22.56	82
合計	81	133	214

細胞_拒絶 0 による gr2 の表 (p=0.04)			
gr2	細胞_拒絶 0		
頻度 行 Pct 列 Pct	なし	あり	合計
方法 2<=0.21	32 23.02 39.51	107 76.98 80.45	139
方法 2>0.21	49 65.33 60.49	26 34.67 19.55	75
合計	81	133	214

10

【0137】

表 4 . 実験により決定された C R 1 カットポイントを用いたクロス集計 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A )

20

【表 4】

細胞_拒絶 1 による gr1 の表 (p=0.001)			
gr1	細胞_拒絶 1		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
方法 2<=0.355	157 95.15 80.93	8 4.85 40.00	165
方法 2>0.355	37 75.51 19.07	12 24.49 60.00	49
合計	194	20	214

細胞_拒絶 1 による gr2 の表 (p=0.003)			
gr2	細胞_拒絶 1		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
方法 2<=0.175	126 96.18 64.95	5 3.82 25.00	131
方法 2>0.175	68 81.93 35.05	15 18.07 75.00	83 10
合計	194	20	214

30

【0138】

表 5 . 実験により決定された C R 2 カットポイントを用いたクロス集計 ( 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A )

40

【表 5】

細胞_拒絶による gr1 の表			
gr1	CR2		
頻度 パーセント 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
0	159 88.33 100.00 89.33	0 0.00 0.00 0.00	159 88.33
方法 1 >0.874	19 10.56 90.48 10.67	2 1.11 9.52 100.00	21 11.67
合計	178 98.89	2 1.11	180 100.00
頻度不明= 34			

10

20

【 0 1 3 9】

表 6 . 実験により決定された C R 2 カットポイントを用いたクロス集計 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A )

【表 6 - 1】

細胞_拒絶による gr2 の表			
gr2	CR2		
頻度 パーセント 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
0	158 87.78 100.00 88.76	0 0.00 0.00 0.00	158 87.78
方法 1 >0.85	20 11.11 90.91 11.24	2 1.11 9.09 100.00	22 12.22
合計	178 98.89	2 1.11	180 100.00
頻度不明 = 34			

30

40

50

【表 6 - 2】

細胞_拒絶による gr3 の表				細胞_拒絶による gr4 の表			
gr3	細胞_拒絶			gr4	細胞_拒絶		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計	頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
0	173 100.0 0 81.99	0 0.00 0.00	173	0	170 100.0 0 80.57	0 0.00 0.00	170
方法 2>0.515	38 92.68 18.01	3 7.32 100.0 0	41	方法 2>0.47	41 93.18 19.43	3 6.82 100.00	44
合計	211	3	214	合計	211	3	214

10

【 0 1 4 0 】

20

表 7 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A )  
( 「 健常ではない」 試料を含む )

【表 7】

分析変数: M1MLE_パーセント M1MLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)								
rej_cr1_2_3	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
CR0=0	476	0.23	0.67	0.09	0.05	0.19	0.00	9.52
CR1/2/3=1	236	0.25	0.55	0.12	0.05	0.23	0.00	6.55

30

【 0 1 4 1 】

表 8 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない : 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

【表 8】

分析変数: M1MLE_パーセント M1MLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)								
rej_cr1_2_3	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
CR0=0	378	0.21	0.61	0.09	0.05	0.19	0.00	9.52
CR1/2/3=1	236	0.25	0.55	0.12	0.05	0.23	0.00	6.55

40

【 0 1 4 2 】

表 9 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A - 1 試料 / 対象 )  
C R 1 / 2 / 3 群において、用いた試料は、第 1 の拒絶からのものであった ; C R 0 群において、それは、採取された第 1 の試料であった。

50

【表 9】

分析変数: M1MLE_パーセント M1MLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)								
rej_cr1_2_3	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
CR0=0	59	0.18	0.22	0.08	0.04	0.24	0.00	1.04
CR1/2/3=1	103	0.26	0.43	0.15	0.05	0.26	0.00	2.69

【 0 1 4 3 】

表 1 0 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 血漿を用いる、既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない : 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

10

【表 1 0】

分析変数: M1MLE_パーセント M1MLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)								
rej_cr1_2_3	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
CR0=0	37	0.14	0.17	0.08	0.05	0.15	0.00	0.93
CR1/2/3=1	13	0.74	0.74	0.45	0.28	0.73	0.03	2.44

20

【 0 1 4 4 】

表 1 1 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 全血を用いる、既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない : 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

【表 1 1】

分析変数: M1MLE_パーセント M1MLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)								
rej_cr1_2_3	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
CR0=0	341	0.21	0.64	0.09	0.05	0.19	0.00	9.52
CR1/2/3=1	223	0.22	0.52	0.11	0.05	0.20	0.00	6.55

30

【 0 1 4 5 】

表 1 2 . 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A についてクロス集計 ( 全血および血漿 )

40

50

【表 1 2 - 1】

rej_cr1_2_3 による gr_09 の表 (p=0.003) OR (M1>0.09 vs M1<=0.09 )(95% CI)= 1.66 (1.19-2.33)			
gr_09	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.09 (0)	248 71.68 52.10	98 28.32 41.53	346
M1>0.09 (1)	228 62.30 47.90	138 37.70 58.47	366
合計	476	236	712

10

rej_cr1_2_3 による gr_11 の表 (p=0.002) OR (M1>0.11 vs M1<=0.11 )(95% CI)= 1.73 (1.23-2.44)			
gr_11	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.11 (0)	286 71.50 60.08	114 28.50 48.31	400
M1>0.11 (1)	190 60.90 39.92	122 39.10 51.69	312
合計	476	236	712

20

rej_cr1_2_3 による gr_12 の表 (p=0.002) OR (M1>0.12 vs M1<=0.12 )(95% CI)= 1.72 (1.23-2.40)			
gr_12	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.12 (0)	294 71.19 61.76	119 28.81 50.42	413
M1>0.12 (1)	182 60.87 38.24	117 39.13 49.58	299
合計	476	236	712

30

40

50

【表 1 2 - 2】

rej_cr1_2_3 による gr_21 の表 (p=0.11) OR (M1>0.21 vs M1<=0.21 )(95% CI)= 1.38 (0.92-2.06)			
gr_21	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.21 (0)	369 68.33 77.52	171 31.67 72.46	540
M1>0.21 (1)	107 62.21 22.48	65 37.79 27.54	172
合計	476	236	712

10

【 0 1 4 6】

表 1 3 . 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A についてのクロス集計 ( 血漿 )

【表 1 3】

rej_cr1_2_3 による gr_21 の表 (p=0.0004) OR (M1>0.21 vs M1<=0.21 )(95% CI)= 36.05 (4.92-264.22)			
gr_21	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.21 (0)	38 95.00 84.44	2 5.00 15.38	40
M1>0.21 (1)	7 38.89 15.56	11 61.11 84.62	18
合計	45	13	58

20

【 0 1 4 7】

表 1 4 . 既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A についてのクロス集計 ( 全血 )

【表 1 4】

rej_cr1_2_3 による gr_11 の表 (p=0.01) OR (M1>0.11 vs M1<=0.11 )(95% CI)= 1.56 (1.10-2.23)			
gr_11	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M1<=0.11 (0)	255 69.29 59.16	113 30.71 50.67	368
M1>0.11 (1)	176 61.54 40.84	110 38.46 49.33	286
合計	431	223	654

40

【 0 1 4 8】

表 1 5 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A )  
( 「 健常ではない」 試料を含む )

50



【表 1 5】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)								
rej_cr1_2_3	N	平均 値	標準偏 差	中央 値	下部四分位 数	上部四分位 数	最小 値	最大 値
CR0=0	521	0.21	0.55	0.09	0.07	0.17	0.00	7.85
CR1/2/3=1	252	0.25	0.55	0.10	0.07	0.21	0.00	5.83

10

【0 1 4 9】

表 1 6 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない : 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

【表 1 6】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)								
rej_cr1_2_3	N	平均 値	標準偏 差	中央 値	下部四分位 数	上部四分位 数	最小 値	最大 値
CR0=0	423	0.19	0.50	0.09	0.06	0.16	0.00	7.85
CR1/2/3=1	252	0.25	0.55	0.10	0.07	0.21	0.00	5.83

20

【0 1 5 0】

表 1 7 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A - 1 試料 / 対象 )

C R 1 / 2 / 3 群において、用いた試料は、第 1 の拒絶からのものであった ; C R 0 群において、それは、採取された第 1 の試料であった。

【表 1 7】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)								
rej_cr1_2_3	N	平均 値	標準偏 差	中央 値	下部四分位 数	上部四分位 数	最小 値	最大 値
CR0=0	68	0.19	0.23	0.09	0.06	0.23	0.00	1.07
CR1/2/3=1	114	0.29	0.55	0.12	0.07	0.24	0.00	4.22

30

【0 1 5 1】

表 1 8 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 血漿を用いる、不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない : 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

40

50

【表 1 8】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)								
rej_cr1_2_3	N	平均 値	標準偏 差	中央 値	下部四分位 数	上部四分位 数	最小 値	最大 値
CR0=0	40	0.12	0.12	0.09	0.06	0.12	0.00	0.70
CR1/2/3=1	15	0.68	0.67	0.42	0.19	1.16	0.04	2.10

10

【 0 1 5 2】

表 1 9 . C R 1 / 2 / 3 対 C R 0 ( 全血を用いる、不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A ) - 健常 ( 以下のいずれでもない: 死亡、心停止、M C S、感染のための処置、A M R 1 & 2、移植片脈管障害、がん )

【表 1 9】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)								
rej_cr1_2_3	N	平均 値	標準偏 差	中央 値	下部四分位 数	上部四分位 数	最小 値	最大 値
CR0=0	383	0.20	0.52	0.09	0.06	0.17	0.00	7.85
CR1/2/3=1	237	0.22	0.53	0.10	0.07	0.20	0.00	5.83

20

【 0 1 5 3】

表 2 0 . 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A についてのクロス集計 ( 全血および血漿 )

【表 2 0 - 1】

rej_cr1_2_3 による gr_10 の表 (p=0.03) OR (M2>0.10 vs M2<=0.10 )(95% CI)= 1.43 (1.03-1.99)			
gr_10	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M2<=0.10 (0)	308 70.64 59.12	128 29.36 50.79	436
M2>0.10 (1)	213 63.20 40.88	124 36.80 49.21	337
合計	521	252	773

30

40

50

【表 2 0 - 2】

rej_cr1_2_3 による gr_14 の表 (p=0.03)			
OR (M2>0.14 vs M2<=0.14 )(95% CI)= 1.46 (1.03-2.06)			
gr_14	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M2<=0.14 (0)	369 69.75 70.83	160 30.25 63.49	529
M2>0.14 (1)	152 62.30 29.17	92 37.70 36.51	244
合計	521	252	773

10

【 0 1 5 4】

表 2 1 . 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A についてのクロス集計 ( 血漿 )

【表 2 1】

rej_cr1_2_3 による gr_14 の表 (p=0.0002)			
OR (M2>0.14 vs M2<=0.14 )(95% CI)= 26.63 (4.83-146.72)			
gr_14	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M2<=0.14 (0)	39 95.12 81.25	2 4.88 13.33	41
M2>0.14 (1)	9 40.91 18.75	13 59.09 86.67	22
合計	48	15	63

20

30

【 0 1 5 5】

表 2 2 . 不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A についてのクロス集計 ( 全血 )

【表 2 2】

rej_cr1_2_3 による gr_10 の表 (p=0.13)			
OR (M2>0.10 vs M2<=0.10 )(95% CI)= 1.30 (0.93-1.82)			
gr_10	rej_cr1_2_3		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
M2<=0.10 (0)	277 68.73 58.56	126 31.27 53.16	403
M2>0.10 (1)	196 63.84 41.44	111 36.16 46.84	307
合計	473	237	710

40

【 0 1 5 6】

50

表 2 3 . 拒絶間での既知のドナー遺伝子型を用いる M O M A (移植後 7 日、拒絶のための処置後 1 4 日は除外した)

【表 2 3】

分析変数: MIMLE_パーセント MIMLE (%%) (計算されたドナー画分方法 1)									
輸送形態	細胞性拒絶 グレード	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
全血	CR0	431	0.239	0.697	0.090	0.050	0.210	0.000	9.520
	CR1	191	0.179	0.267	0.110	0.050	0.200	0.000	1.930
	CR2	32	0.440	1.208	0.140	0.055	0.260	0.030	6.550
血漿	CR0	45	0.136	0.159	0.080	0.050	0.150	0.000	0.930
	CR1	12	0.597	0.565	0.425	0.250	0.710	0.030	2.030
	CR2	1	2.440	.	2.440	2.440	2.440	2.440	2.440
合計	CR0	476	0.229	0.665	0.090	0.050	0.190	0.000	9.520
	CR1	203	0.204	0.307	0.120	0.050	0.220	0.000	2.030
	CR2	33	0.501	1.239	0.140	0.060	0.280	0.030	6.550

10

拒絶間での W B + 血漿 :

20

C R 0 対 C R 2 :  $p = 0.04$  (C R 2 が C R 0 より高い) ; C R 1 対 C R 2 :  $p = 0.01$  (C R 2 が C R 1 より高い) ; C R 0 対 C R 1 :  $p = 0.39$  ;

拒絶間での全血 :

C R 0 対 C R 2 :  $p = 0.16$  ; C R 1 対 C R 2 :  $p = 0.04$  (C R 2 が C R 1 より高い) ; C R 0 対 C R 1  $p = 0.11$

拒絶間での血漿 : C R 0 対 C R 1 :  $p < 0.0001$  (C R 1 が C R 0 より高い)

【 0 1 5 7 】

表 2 4 . 拒絶間での不明なドナー遺伝子型を用いる M O M A (移植後 7 日、拒絶のための処置後 1 4 日は除外した)

【表 2 4】

分析変数: M2Avg_パーセント M2Avg (%%) (計算されたドナー画分方法 2) (方法 2 に関する測定基準)									
輸送形態	細胞性拒絶 グレード	N	平均値	標準偏差	中央値	下部四分位数	上部四分位数	最小値	最大値
全血	CR0	473	0.216	0.570	0.090	0.065	0.170	0.000	7.845
	CR1	204	0.200	0.387	0.100	0.065	0.195	0.000	4.220
	CR2	33	0.363	1.036	0.105	0.070	0.225	0.030	5.825
血漿	CR0	48	0.119	0.113	0.085	0.063	0.120	0.000	0.700
	CR1	14	0.581	0.565	0.393	0.190	0.600	0.040	1.760
	CR2	1	2.100	.	2.100	2.100	2.100	2.100	2.100
合計	CR0	521	0.207	0.545	0.090	0.065	0.165	0.000	7.845
	CR1	218	0.224	0.410	0.100	0.065	0.205	0.000	4.220
	CR2	34	0.414	1.062	0.105	0.070	0.250	0.030	5.825

30

40

拒絶間での W B + 血漿 :

C R 0 対 C R 2 :  $p = 0.05$  ; C R 1 対 C R 2 :  $p = 0.08$  ;

C R 0 対 C R 1 :  $p = 0.83$  ;

拒絶間での全血 :

50

CR0対CR2:  $p = 0.20$ ; CR1対CR2:  $p = 0.14$  (CR2がCR1より高い); CR0対CR1:  $p = 0.62$

拒絶間での血漿: CR0対CR1:  $p < 0.0001$  (CR1がCR0より高い)

#### 【0158】

例7 - ドナー特異的セルフリーDNA (DS cf-DNA) の抗体媒介性拒絶との相関  
MOMAを用いて、移植レシピエント ( $n = 142$ ) のドナー特異的 cf-DNA を定量した。図38~44において示されるとおり、抗体媒介性拒絶グレード0ならびにグレード1および2についての閾値(「カットポイント」)値を、実験により決定した。

閾値(カットポイント)の決定のさらなる例を、図38~44において示す。図39および42は、214の試料を用いた、既知のドナー遺伝子型(図39)および不明なドナー遺伝子型(図42)による、閾値の決定を示す。機械的サポートを用いる集団を除外して、同じ試料を分析し、結果を、図40および43において示す。各々の対象からの最後の試料( $n = 79$ )のみを検査することにより、ドナー遺伝子型が既知の場合0.25(図41)、ドナー遺伝子型が不明の場合、0.16(図44)のカットポイントを得た。

#### 【0159】

別の例において、平均のドナー特異的画分は、ドナー遺伝子型が既知である場合、グレードpAMR0と関連する試料については0.12%(IQR: 0.07~0.29%)であり、グレードpAMR1または2と関連する試料については0.26%(IQR: 0.09~0.33%)であった( $p = 0.905$ )。ドナー遺伝子型が不明である場合、平均ドナー画分は、グレードpAMR0と関連する試料については0.29%(IQR: 0.18~0.61%)であり、グレードpAMR1または2と関連する試料については0.39%(IQR: 0.12~0.44%)であった( $p = 0.969$ )。関連するROC曲線に基づいてpAMR1または2を除外するための経験的最適カットポイントは、0.38%であった[95%CI: 0.19~0.74%( $p = 0.005$ )]。

表25. ドナー画分および抗体媒介性拒絶

【表25】

	抗体媒介性拒絶グレード		帰無仮説	統計学的試験
	0	1または2		
	中央値 [IQR]	中央値 [IQR]	感染のための処置間で中央値は同じ	
N	132	3		
方法1	0.12 [0.07, 0.29]	0.26 [0.09, 0.33]	$p=0.905$	独立試料
アップデートされた方法2				
平均	0.29 [0.18, 0.61]	0.39 [0.12, 0.44]	$p=0.969$	独立試料

#### 【0160】

例8 - ドナー特異的セルフリーDNA (DS cf-DNA) の心臓同種移植片脈管障害との相関

MOMAを用いて移植レシピエント ( $n = 273$ ) のドナー特異的 cf-DNA を定量した。図45~52において示されるとおり、心臓同種移植片脈管障害(移植片脈管障害)についての閾値(「カットポイント」)値を、2つの異なる方法を用いて、既知のドナー遺伝子型により(方法1)、および不明なドナー遺伝子型により(方法2)、実験により決定した。加えて、全セルフリーDNAを試験し、閾値を実験により決定した。さらに、以下の表26は、さらなる統計学を示す。

表26. 移植片脈管障害の統計学

10

20

30

40

50

【表 2 6】

		移植片脈管障害			帰無仮説	統計学的試験
		No CAD 中央値 [IQR]	GV 中央値 [IQR]	生検または血管造影なし 中央値 [IQR]	CADおよびGV間で中央値は同じ	
		184	12	187		
方法 1		0.09 [0.08, 0.20]	0.52 [0.33, 0.88]	0.32 [0.18, 0.57]	p=0.029	独立試料中央値試験
方法 2		0.08 [0.05, 0.10]	0.35 [0.12, 0.46]	0.23 [0.10, 0.36]	p=0.005	独立試料中央値試験
95%LB		0.06 [0.04, 0.13]	0.19 [0.09, 0.33]	0.18 [0.07, 0.30]	p=0.006	独立試料中央値試験
95%UB		0.11 [0.07, 0.28]	0.46 [0.26, 0.67]	0.34 [0.14, 1.16]	p=0.006	独立試料中央値試験
全cfDNA		120	15	165		
全cfDNA		5.17 [3.73, 8.08]	5.33 [3.76, 13.50]	14.91 [6.57, 27.68]	p=0.540	独立試料中央値試験

【 0 1 6 1】

10

例 9 - ドナー特異的セルフリー DNA ( D S c f - DNA ) の心停止との相関

同様に、MOMAを用いて移植レシピエント ( n = 7 1 ~ 7 7 ) のドナー特異的 c f - DNAを定量した。図 1 0、5 3 ~ 6 0、6 2、6 6、6 7、7 2において示されるとおり、心停止についての閾値 (「カットポイント」) 値を、2つの異なる方法を用いて実験により決定した。さらに、以下の表 2 7 ~ 2 9は、さらなる統計学を示す。

【 0 1 6 2】

図 5 3 ~ 5 8は、異なる方法を用いて見出された心停止についての閾値 (カットポイント) の実験による決定を示す。図 5 3 ~ 5 5は、3つの集団：全試料集団 (図 5 3)、機械的サポートを受けている対象を除く全試料集団 (図 5 4)、および各々の対象から得られた最後の試料 (図 5 5) において、MOMAを用いて (既知のドナー遺伝子型により) 得られた閾値を示す。図 5 6 ~ 5 8は、3つの集団：全試料集団 (図 5 6)、機械的サポートを受けている対象を除く全試料集団 (図 5 7)、および各々の対象から得られた最後の試料 (図 5 8) において、MOMAを用いて (不明なドナー遺伝子型により) 得られた閾値を示す。試験のための統計学を、以下に表す。

20

表 2 7 . 心停止の統計学

【表 2 7】

		心停止		p 値
		なし	あり	
方法 1				
N		64	7	
中央値 [IQR]		0.09 [0.08, 0.20]	0.51 [0.16, 1.71]	0.021
倍加ごとのOR (95% CI)			141 (1.03, 1.94)	0.034
方法 2				
N		70	7	
中央値 [IQR]		0.08 [0.05, 0.13]	0.57 [0.11, 0.95]	0.01
倍加ごとのOR (95% CI)			142 (1.04, 1.93)	0.028
全cfDNA				
N		79	8	
中央値 [IQR]		5.11 [3.78, 8.59]	14.19 [9.27, 51.22]	0.002
倍加ごとのOR (95% CI)			1.65 (1.13, 2.40)	0.010

\*マーカーの倍加ごとの心停止 (なし/あり) のオッズ比

30

表 2 8 . 心停止の統計学 - 不明なドナー遺伝子型を用いる MOMA

40

【表 2 8】

停止 1 による gr1 の表 (p=0.08)				停止 1 による gr2 の表 (p=0.03)			
gr1	停止 1			gr2	停止 1		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計	頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
方法 2<=0.185	126 95.45 64.29	6 4.55 33.33	132	方法 2<=0.275	145 94.16 73.98	9 5.84 50.00	154
方法 2>0.185	70 85.37 35.71	12 14.63 66.67	82	方法 2>0.275	51 85.00 26.02	9 15.00 50.00	60
合計	196	18	214	合計	196	18	214

10

【 0 1 6 3】

図 5 9 および 6 0 は、さらなる結果を示す。図 5 9 において、試料の全集団 (N = 2 1 4) を用いた。図 6 0 は、集団が、機械的サポートを受けていなかった対象からの試料に限定された場合の結果を示す。研究の他の結果を、以下の表 2 9 において示す。

20

表 2 9 . 心停止の統計学 - 不明なドナー遺伝子型による、かつ上界なしの M O M A

【表 2 9】

停止 1 による gr1 の表 (p=0.07)			
gr1	停止 1		
頻度 行 Pct 列 Pct	0	1	合計
N0Do_95UB <=0.002	112 95.73 57.14	5 4.27 27.78	117
N0Do_95UB >0.002	84 86.60 42.86	13 13.40 72.22	97
合計	196	18	214

30

【 0 1 6 4】

例 1 0 - 全セルフリー DNA (c f - DNA) の移植合併症との相関

40

移植レシピエントの全 c f - DNA を、上記の方法を用いて定量した。全 c f - DNA と様々な移植合併症との間の相関を試験して、グラフによる結果を、図 9 ~ 1 1 および 6 1 ~ 7 2 において表す。

死亡結果分析の統計学を、以下の表 3 0 において表す。

表 3 0 . 死亡結果の統計学のまとめ

50

【表 3 0】

	AUC	感度	特異度	カットオフ	反復モデル
1. 全cfDNA、全298	0.8664	0.786	0.793	15.96	$-1.9463 + 0.0023 * \text{全cfDNA}$ ( $p=0.03$ )
2. 全cfDNA、全292 (メッシュサポートは除外)	0.8484	0.944	0.609	8.72	$-2.0805 + 0.0019 * \text{全cfDNA}$ ( $p=0.04$ )
3. 全てからの最後の試料 (n=88)	0.9385	~1.0	0.769	8.77	$-3.3358 + 0.0480 * \text{全cfDNA}$ ( $p=0.01$ )

## 【 0 1 6 5 】

10

## 例 1 2 - 全 c f - D N A

例 5 において示すとおり、試料は、ドナー遺伝子型の知識あり（方法 1）およびなし（方法 2）の両方で決定されるとおり、第 8 日までに基線に達することが見出された（ $p < 0.001$ ）。さらに、図 7 4 は、D F c f D N A の %（D F c f D N A の濃度を全 c f D N A の濃度で除算していたものとして計算される）と対数スケールにおける時間との関連を示す。D F c f D N A レベルは、移植後最初の 8 日にわたり、著しく低下した。図 7 3 は、既知のドナー遺伝子型による（方法 1、左グラフ）および不明なドナー遺伝子型による（方法 2、右グラフ）、ドナー - フリーの c f - D N A パーセンテージを示す。全 c f - D N A を、下のグラフにおいてプロットした。図において示されるとおり、17 人の患者のうちの 10 人が、3 つの時点の全て（移植後の第 0 日、第 4 日および第 8 日）において利用可能な試料を有した。10 人のうち、7 人は、回復により予測されるとおり、ドナー画分 c f - D N A が、第 4 日と第 8 日との間に低下した。7 人全てが生存して退院した。対照的に、残りの 3 人は、第 4 日と第 8 日との間にドナー画分 c f - D N A の増大を示したが、これは予想外であった。3 人全員が、退院の前に死亡した（具体的には、術後第 6 4、5 4 および 9 0 日において）。10 人の患者のうちの 1 人は、第 0 日から第 4 日までに D F c f D N A の増大を有し、これは、短い虚血時間（115 分）および第 3 日における急性の血圧低下のエピソードに対応した。患者は、第 8 日までに D F c f D N A の低下、および第 9 日においてネガティブ生検を有した。

20

## 【 0 1 6 6 】

分析を、第 4 日および第 8 日からのデータと共に全試料を含むように広幅化した場合に、類似の結果を観察した。上記のとおり、増加したドナー画分 c f - D N A を有し死亡した 3 人、および低下したドナー画分 c f - D N A を有し生存して退院した 8 人の試料が存在した。

30

図 7 3 における左端の対象は、当該個体が機械的循環サポート（MCS）を受けているので、分析から除外したことに留意する。

一般に、これらの分析について、各々の日は、それぞれドナー画分 c f - D N A（方法 1）、ドナー画分 c f - D N A（方法 2）、および全 c f - D N A において、0.98、0.88、および 7% の低下と関連することを見出した。したがって、術後第 4 日と第 8 日との間でドナー画分 c f - D N A が増大している対象については、退院の前に死亡が起こるが、同じ間隔の間でドナー画分 c f - D N A が低下する場合、対象は生存して退院するはずである（ $p < 0.0083$ 、MEM 分析）。知見は、D F c f D N A の有用性を、移植片傷害の非侵襲性マーカーとして示唆し、連続モニタリングは、移植片の健康または傷害についての重要な臨床情報を提供し得る。

40

## 【 0 1 6 7 】

## 例 1 3 - 拒絶処置の後のセルフフリー D N A のドナー特異的画分の長期測定および臨床成績との相関

移植レシピエントにおけるセルフフリー D N A のドナー特異的画分（D F）を、拒絶および同種移植片傷害と関連づけた。さらに、拒絶の結果は、D F レベルの低下をもたらした。しかし、拒絶処置に関連する最初の低下の後の D F のリバウンドまたは増大の臨床的重要性については、ほとんど知られていない。

50



## 【 0 1 6 8 】

88人の心臓移植レシピエントのコホートを、プロスペクティブに追跡し、既定の臨床イベント時に血液試料を採取した。遺伝子型についてのドナー試料の使用により（方法1）、ドナー試料の使用なしでの（方法2）2つの異なる方法を用いるターゲティングされたアッセイを用いて、DFを定量した。7人の対象は、拒絶のために処置され、処置の前後の連続的なDFレベルによる分析のために利用可能な長期試料を有した。各々の患者は、分析のための3つ以上の試料を有した。臨床的エンドポイントは、死亡、機械的循環サポート（MCS）の必要性、および再発性または進行性の拒絶であった。

## 【 0 1 6 9 】

DF cf-DNAの処置前レベルは、処置後1～3日の処置後レベルよりも高いことを見出した。7人の患者のうち、2人の患者は、処置の後にDFのリバウンドを示さず、短期の有害イベントを経験しなかった。平均処置前DFは2.67%であり、処置後は0.15%であった。0.8より高いレベルまでのDFのリバウンドを示した6人の患者のうち、2人は、DFのリバウンド後19日以内にMCSを必要とし、その後死亡した。DFのリバウンドを有した1人の患者は、リバウンドの42日以内に以前に存在した心臓同種移植片脈管障害（CAV）の進行を発症し、別人は、再発性の拒絶を発症した。DFのリバウンドを示した2人の残りの対象は、臨床的有害イベントを経験しなかった。結果を、図75（リバウンドを有さず、かつ顕著な有害効果を有さない患者）、図76A～76B（リバウンドおよび顕著な有害効果を有する患者）および図77（リバウンドを有し、顕著な有害効果を有さない患者）において示す。

拒絶の最初の処置は、一般にDFを低下させることを見出した。拒絶の処置の後のDFのリバウンドは、短期の有害な臨床イベントと相関すると考えられる。

## 【 0 1 7 0 】

例14 - 心臓移植後の非侵襲性の指標としてのドナー特異的セルフリーDNA

目的

心臓移植レシピエントのサーベイランスのための現在の至適基準は、心内膜心筋生検（EMB）であり、これは、小児を、一定の傷害のリスクに曝し、妥当なスクリーニングの頻度を限定し、雑駁なプロセスとして拒絶が起こることから感度が本質的に限定される。侵襲性サーベイランス生検の必要性に取って代わるために、循環中のドナー特異的セルフリーDNA（DS cfDNA）の正確な定量に基づく、小児および成人の心臓移植レシピエントのための非侵襲性の診断スクリーニングツールを開発した。

## 【 0 1 7 1 】

方法

ウィスコンシン州小児病院（Children's Hospital of Wisconsin: CHW）において追跡された全ての心臓移植レシピエントを、この盲検研究において参加するように招待した。3～10ミリリットル（ml）の抗凝固剤処置された血液を採取して、以下の臨床シナリオにおいてcf-DNAの循環レベルを評価した：移植後の第1、4、7および28日、任意のEMBの前24時間以内、拒絶のための処置の開始後の第1、4、7および28日。試料は、すぐにコード化し、匿名化し、MyTAI（心臓）検査（TAI diagnostics, Milwaukee, WI）を用いる処理のために研究室に送達された。臨床、研究室、心臓生検、脈管障害、カテーテル処置、および心エコーデータを、全て、試料採取の時点で記録した。全生検レポートのうちの病理学レポートを見直し、2004 International Society for Heart and Lung Transplantation（ISHLT）グレードを記録した。感染のための処置、拒絶のための処置、心停止、心臓再移植、機械的循環サポートの開始、および死亡を含む全ての重要なイベントの日付および時間を記録した。ターゲティングされたアプローチを用いてドナー特異的（ds）セルフリーDNA（cf-DNA）を定量し、ドナー遺伝子型を用いる（方法1）、およびドナー遺伝子型を用いない（方法2）2つの別々の方法を用いて、関連する生検および脈管障害の結果と比較した。

## 【 0 1 7 2 】

結果

### 心臓同種移植片脈管障害

QC基準を通った成人および小児の両方の87人のユニークな移植レシピエント対象からの合計で158の試料が、分析のために利用可能であった。1個体は、最初の移植の後および再移植の後の両方の研究に参加し、2つのユニークなドナー/レシピエントが一致しないDNAを考慮して、2人のユニークな対象として分析した。移植時の患者の平均年齢は、7.9 + / - 7.5歳(0.03 ~ 24.2歳の範囲)であった。採血時の平均年齢は、12.7 + / - 8.1歳(0.08 ~ 30.2歳の範囲)であった。59.6%(51/87)の対象は男性であり、65.5%(57/87)は白人であった。移植から採血までの平均時間は、4.8 + / - 4.2年であった。

#### 【0173】

116の血液試料を、選択的冠動脈造影の前24時間以内に収集した。これらのうち12は、2010 ISHLTグレーディングシステムにより定義されるような移植片脈管障害を示し、104は、移植片脈管障害を示さなかった。脈管障害に関連する試料の中でのドナー特異的cf-DNA画分の比較をまとめた。平均のドナー特異的画分は、CAVと関連していない試料については0.09%(IQR 0.06 ~ 0.20%)、CAVに関連する試料については0.52%(IQR 0.33 ~ 0.88%)であった( $p = 0.029$ )。CAVを除外するための経験的最適カットポイントは、0.19%[95%CI 0.09 ~ 0.38% ( $p < 0.001$ )]であった。

#### 【0174】

別の例として、116の血液試料を、選択的冠動脈造影の前24時間以内に収集した。これらのうち11は、2010 ISHLTグレーディングシステムにより定義されるような移植片脈管障害を示し(Mehra et al., J Heart Lung Transplant 29, 717-727 (2010))、99は、移植片脈管障害を示さなかった。脈管障害に関連する試料の中でのドナー特異的cf-DNA画分の比較を、表31においてまとめる。

#### 【0175】

MOMAを用いて、平均ドナー画分は、ドナー遺伝子型を用いて、CAVと関連しない試料については0.09%(IQR 0.06 ~ 0.20%)、CAVに関連する試料については0.47%(IQR 0.27 ~ 0.71%)であった( $p = 0.05$ )(Mehra, M.R., et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. J Heart Lung Transplant 29, 717-727 (2010)。CAVを除外するための経験的最適カットポイントは、0.19%であった[95%CI; 0.09 ~ 0.38% ( $p < 0.001$ )]。

ドナー遺伝子型なしでは、平均ドナー画分は、CAVと関連しない試料については0.27%(IQR 0.16 ~ 0.54%)、CAVに関連する試料については0.55%(IQR 0.38 ~ 1.22%)であった( $p = 0.057$ )。CAVを除外するための経験的最適カットポイントは、0.37%であった[95%CI: 0.24 ~ 0.57% ( $p < 0.001$ )]。

#### 【0176】

さらに別の分析において、選択的冠動脈造影の前24時間以内に、66の対象から116の血液試料を採取した。11の試料は心臓同種移植片脈管障害(CAV)を示し(7つがグレード1、2つがグレード2、および3つがグレード3)、105は、CAVを示さなかった。方法1(既知のドナー遺伝子型によるもの)を用いて、DFは、CAVと関連しない試料については0.09%(IQR: 0.06% ~ 0.20%)、CAVに関連する試料については0.47%(IQR: 0.27% ~ 0.71%)であった( $p = 0.05$ )。方法2(不明なドナー遺伝子型によるもの)により、DFは、CAVと関連しない試料については0.27%(IQR: 0.16% ~ 0.52%)、CAVに関連する試料については0.55%(IQR: 0.38% ~ 1.22%)であった( $p = 0.057$ )。表31. ドナー画分および冠動脈移植片脈管障害

10

20

30

40

50

【表 3 1】

	移植片脈管障害		生検または血管造影なし 中央値 [IQR]	帰無仮説 CADおよびGV間で中央値は同じ	統計学的試験
	No CAD	GV			
	中央値 [IQR]	中央値 [IQR]			
N	99	11	155		
方法 1	0.09 [0.06, 0.20]	0.52 [0.33, 0.88]	0.32 [0.14, 0.87]	p=0.028	独立試料中央値
アップデートされた方法2					
平均	0.27 [0.16, 0.54]	0.55 [0.38, 1.22]	0.057	0.057	独立試料中央値

## 【0177】

## 急性細胞性拒絶

別の分析において、心内膜心筋生検（EMB）の前の88の対象からの血液試料を得た。ドナー画分（DF）を、循環中の全レシピエントcfDNAのうちのパーセンテージとして報告した。採血時の平均年齢は、 $12.7 \pm 8.1$ 歳であった（0.1～30.2歳の範囲）。基本的な心臓診断は、42.0%において心筋症、56.8%において先天性心疾患であった。対象のうちの合計59.0%は、男性であり、69.3%（88中61）はコーカサス人種であった。158の生検関連試料（そのうち148は、無症候性のサーベイランス生検であった）のうち、134は、細胞性拒絶グレード0（CR0）に、21は細胞性拒絶グレード1（CR1）、3は細胞性拒絶グレード2（CR2）に、0は、細胞性拒絶グレード3（CR3）に関連していた。

## 【0178】

方法1（既知のドナー遺伝子型によるもの）を用いた場合、DFは、拒絶グレード間で増大した：CR0に関連する試料においては0.11%（四分位数間範囲 [IQR]：0.06%～0.21%）、CR1に関連する試料においては0.37%（IQR：0.15%～0.72%）、およびCR2に関連する試料においては0.97%（IQR：0.88%～1.06%）。CR0（0.11%；IQR：0.06%～0.21%）を、CR1またはCR2（0.48%；IQR：0.19%～0.89%）と比較して、 $p = 0.02$ 。

## 【0179】

方法2（不明なドナー遺伝子型によるもの）を用いた場合、DFはまた、拒絶グレード間で増大した：CR0に関連する試料においては0.25%（IQR：0.17%～0.39%）、CR1に関連する試料においては0.89%（IQR：0.44%～5.35%）、およびCR2に関連する試料においては1.22%（IQR：1.04%～5.18%）。CR0（0.25%；IQR：0.19%～0.39%）を、CR1またはCR2（1.05%；IQR：0.47%～5.26%）と比較して、 $p < 0.001$ 。最適カットポイントによる受信者動作特性曲線を決定し、これを図78において提示する。

## 【0180】

特定されたカットポイントにおける急性細胞性拒絶および心臓同種移植片脈管障害の関連

特定されたDFカットポイントにおける急性細胞性拒絶および心臓同種移植片脈管障害の関連を分析した（表32）。全140の試料を、方法1（既知のドナー遺伝子型によるもの）により、0.2%のDFカットポイントにおいて分析し、CR0をCR1およびCR2と比較した（ $p = 0.0022$ ）。全158の試料を、方法2（不明なドナー遺伝子型によるもの）により、0.2%のDFカットポイントにおいて分析し、CR0を、CR1およびCR2と比較した（ $p = 0.0141$ ）。0.2%のDFカットポイントにおいて脈管障害に関連する102の試料を、方法1（既知のドナー遺伝子型によるもの）を用いて分析した；7つの試料は、CAVについて真に陽性であり、1つの試料は、偽陰性であり、70は真に陰性であり、24は偽陽性であった（ $p < 0.001$ ）。方法2（不明なドナー遺伝子型によるもの）を用いて、116の試料を、0.2%のDFカットポイントにおいて分析した、11の試料は、CAVについて真に陽性であり、0は偽陰性であり、38は真に陰性であり、67は偽陽性であった（ $p = 0.015$ ）。

## 【0181】

表 3 2 . 2 つの特定のカットポイント ( 0 . 2 % および 0 . 8 % ) における D F c f D N A と細胞性拒絶 ( C R ) および心臓同種移植片脈管障害 ( C A V ) との関連

【表 3 2】

方法 1				方法 1			
結果	<0.2%	≥0.2%	p 値*	結果	<0.8%	≥0.8%	p 値*
拒絶				拒絶			
CR0	90	36	0.0022	CR0	117	9	0.0057
CR1+CR2	4	10		CR1+CR2	9	5	
心臓同種移植片脈管障害				心臓同種移植片脈管障害			
No CAV	70	24	<0.001	No CAV	85	9	
CAV	1	7		CAV	6	2	

\*両側 Fisher 直接検定

方法 2				方法 2			
結果	<0.2%	≥0.2%	p 値*	結果	<0.8%	≥0.8%	p 値*
拒絶				拒絶			
CR0	46	88	0.0141	CR0	123	11	<0.001
CR1+CR2	2	22		CR1+CR2	10	14	
心臓同種移植片脈管障害				心臓同種移植片脈管障害			
No CAV	38	67	0.0153	No CAV	90	15	0.373
CAV	0	11		CAV	8	3	

\*両側 Fisher 直接検定

#### 【 0 1 8 2 】

##### 結論

ドナー特異的 c f - D N A の定量のためのターゲティングされたハイスループットアッセイの使用は、心臓移植レシピエントにおけるサーベイランスのために、および心臓移植レシピエントにおける急性細胞性拒絶の存在を除外するために、精巧な感度を有することを見出した。D F は、C R 0 に関連する生検から C R 1 ~ C R 2 に関連する生検へと増大し、このことは、ドナーの臓器に対する進行性の傷害を検出するその能力を示唆している。加えて、ドナー特異的画分の著しい増加は、冠動脈移植片脈管障害の形態における急性特異性拒絶および慢性拒絶を含む顕著な同種移植片傷害に相関する。これらの知見は、診療において D F の正確な定量が可能であること、および両方のアッセイ方法の間での結果において観察される類似 ( 既知のドナー遺伝子型によるもの、または不明なドナー遺伝子型によるもの ) は、遺伝子型判定のために利用可能でない場合においてすら、定量における正確性が保存されることを示すことを示唆する。

#### 【 0 1 8 3 】

例 1 5 - 心内膜心筋生検は定量可能な細胞傷害を誘導する

2 1 人の無症候性の患者から、対にした血液試料を採血したプレおよびポストサーベイランス生検 ( b x ) 。 myTAI-HEART ( 商標 ) 検査 ( TAI Diagnostics ( Wauwatosa, WI ) 製の定量的遺伝子型判定アッセイの商標 ) を用いて定量的 D F c f D N A を決定した。既知の移植片脈管障害、がん、機械的循環サポート、またはグレード > 1 を有する任意の細胞性拒絶を有する患者を除外して、1 7 の試料のペアが利用可能であった。生検鉗子サイズおよび採取された b x 試料の数を記録し、分析した。

#### 【 0 1 8 4 】

ドナー画分 ( D F ) は、0 . 0 2 % のプレ b x ~ 1 1 . 1 % のポスト b x の範囲であり、0 . 4 3 % の中央値を有した。D F は、一貫してポスト b x を増大させ、8 . 2 x ( 範囲 1 . 5 x ~ 2 1 3 x ) の中央値の増大を有した。患者の年齢は、4 ~ 3 2 歳 ( 中央値、1 2 歳 ) の範囲であった。患者の体重は、1 7 ~ 9 0 k g ( 中央値、4 9 k g ) の範囲であった。年齢および体重の両方は、独立して、D F の変化と関連している ( p < 0 . 0 1 ) 。 1 6 歳以下の年齢での P t s は、2 . 7 x の平均 D F 増大を有する 2 4 歳以上の p t

s に対して、24 x の平均の DF 増大を有した。年齢および体重は相関するので、採血時の体重によって類似の効果が観察された。DF の変化は、生検鉗子サイズと相関しなかった ( $p = 0.4$ )。bx と第 2 の採血との間の時間は、1 ~ 36 分間の範囲であり、DF の増大とは相関しなかった。bx の直後に採血された試料は、より遅延した試料よりも劇的な DF の増大を有した。このことは、cfDNA の短い半減期と一致する；5 つの最速のもの (平均 2 分) は、19.8 x の平均 DF 増大を有するのに対して、5 つの最遅のもの (平均 7.6 分) は、僅か 4.1 x を示した。最初の DF は、bx 前の臓器の健康の指標である。高い DF ( $> 0.9\%$ ) プレ生検を有する患者は、ポスト bx でより少ない DF 増大を示した ( $p < 0.01$ )。データを図 79 において示す。

【0185】

別の分析において、ds - cfDNA の量は、ドナーのゲノム当量 (GE) として報告され、これは、プレ生検の 1.9 (中央値、12) ~ ポスト生検の 1200 (中央値、136) の範囲であった。対になった試料を、図 80 において示す。ds - cfDNA の GE は、全患者においてポスト生検を増大させ ( $p < 0.02$ )、8.2 x (範囲、0.34 x ~ 345 x) の中央値の増大を有した。患者の年齢は、4 ~ 32 歳 (中央値、12 歳) の範囲であった。患者の体重は、17 ~ 90 kg (中央値、49 kg) の範囲であった。年齢および体重の両方が、GE の変化と関連した ( $p < 0.01$ )。17 歳未満の患者は、1.1 x の平均 GE 増大を示した 23 歳より上の患者と比較して 29 x の平均 GE の増大を有した。年齢と体重とは相関することが見出されたので、採血時の体重によっても類似の効果が観察された。GE の変化は、生検鉗子サイズとは相関しなかった ( $p = 4$ )。生検と第 2 の採血との間の時間は、1 ~ 36 分の範囲であり、時間の延長は、全セルフリー DNA の増加と関連した ( $p = 0.037$ )。GE における最初の ds - cfDNA は、生検前の臓器の健康の指標である。高い GE ( $> 20$ 、 $n = 4$ ) プレ生検を有する患者は、ポスト生検でより低い GE 増大を示した ( $p < 0.01$ )。

【0186】

標準的な心内膜心筋生検は、移植された心臓に対して顕著かつ測定可能な傷害を誘導し、これは患者の身体サイズおよびプレ生検での ds - cfDNA のレベルにより強力に影響を受けることを見出した。生検と採血との間の時間の延長は、全セルフリー DNA の増加と関連した。このことは、心臓傷害のマーカーとしての ds - cfDNA の感度のエビデンスとして役立つ。

【0187】

例 16 - 全セルフリー DNA (cf - DNA) の移植合併症との相関

心臓移植レシピエントから、移植、任意の拒絶のための処置、再入院の時点周辺において、および生検および / または脈管障害の前に、プロスペクティブに血液試料を採取した。cf - DNA を定量した。全 cf - DNA と様々な移植合併症との間の相関を試験し、表およびグラフによる結果を、図 91 ~ 96 において提示する。生検および脈管障害、ならびに心停止、死亡、および感染のための処置の結果は、15 ナノグラム / ミリリットル (ng / mL) のカットポイントにおいて cf - DNA レベルと関連した。88 人のレシピエントからの 298 の試料を分析した。 $> 15 \text{ ng / mL}$  の cf - DNA は、死亡 [ $p < 0.001$ 、OR : 20.10 (95% CI : 3.55 ~ 113.69)]、感染のための処置 [ $p 0.006$ 、OR : 3.50 (95% CI : 1.36 ~ 9.03)] と強力に関連した。全循環 cf - DNA は、死亡および採血時の感染のための処置と強力に感染した。

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

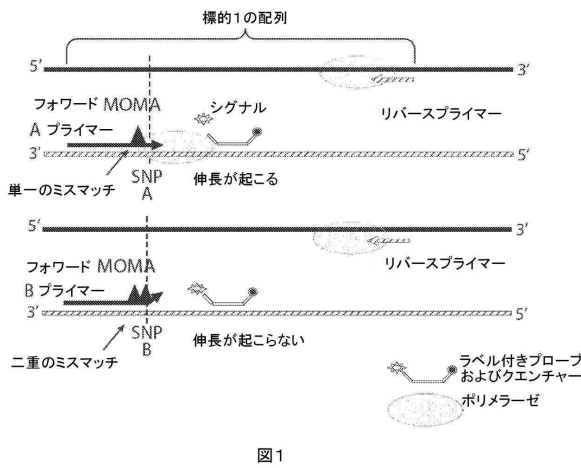


図 1

【図 2】

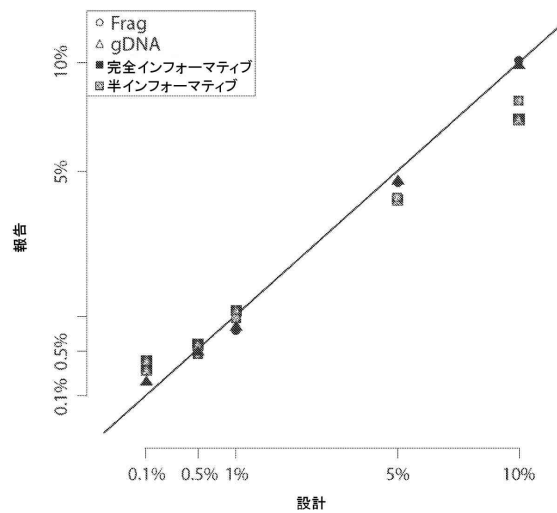


図 2

【図 3】

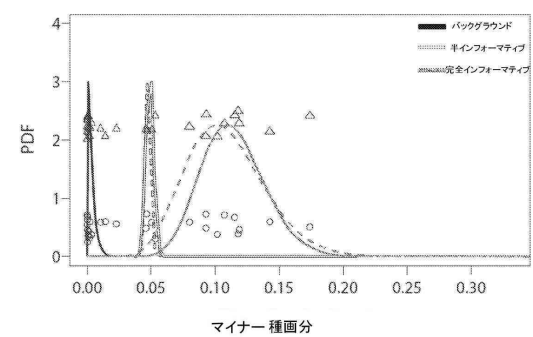


図 3

【図 4】

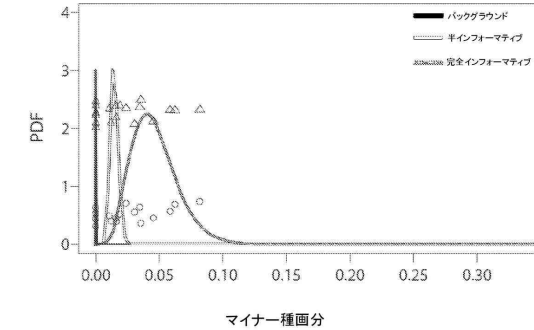


図 4

10

20

30

40

50

【図 5】

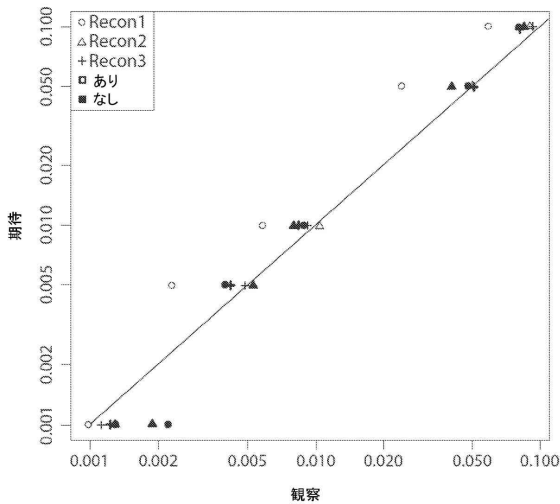


図5

【図 6】

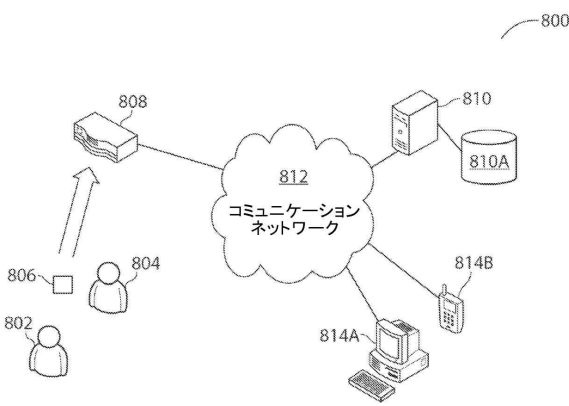


図6

【図 7】

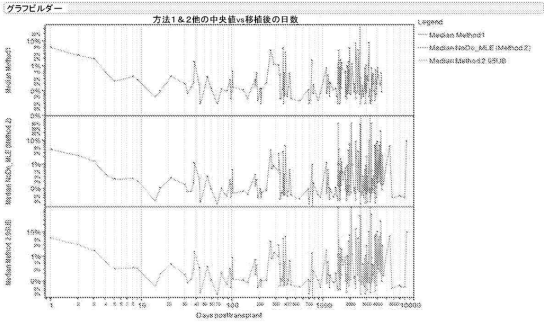


図7

【図 8】

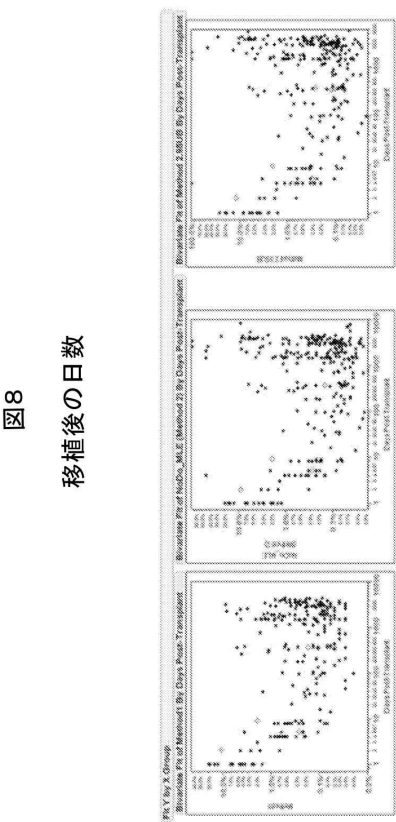


図8  
移植後の日数

10

20

30

40

50

【図 9】

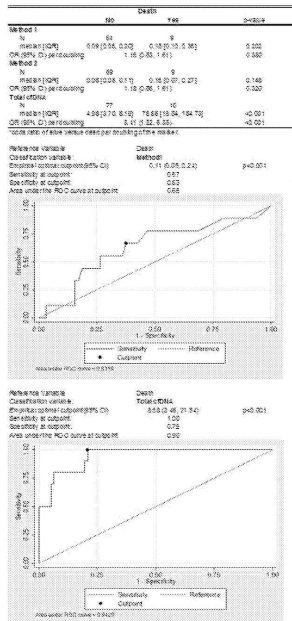


図9

【図 10】

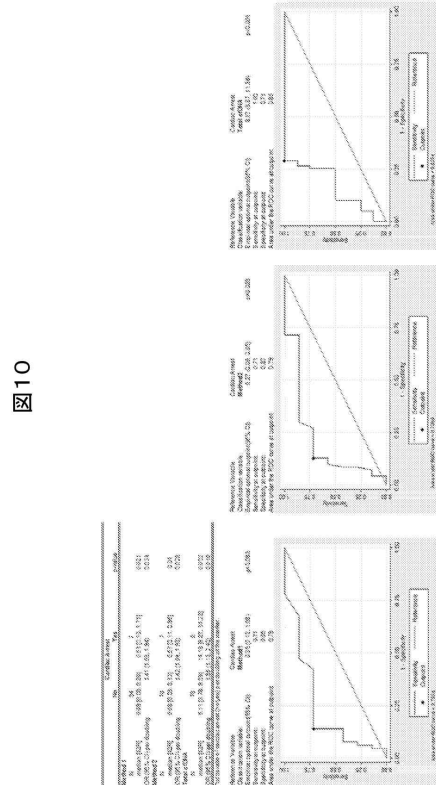


図10

【図 11】

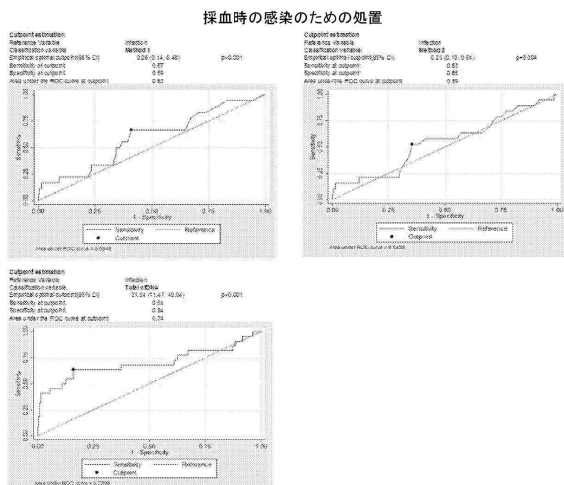


図11

【図 12】

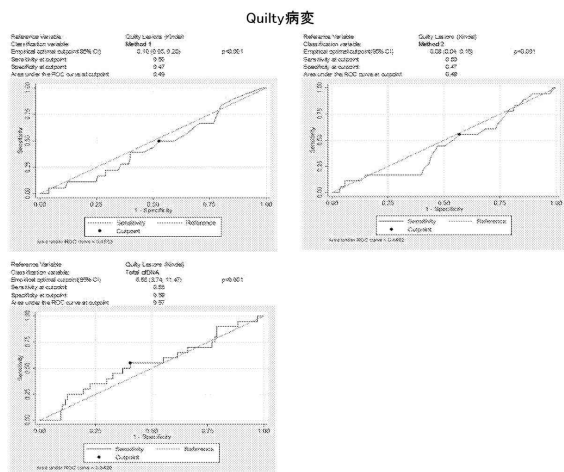


図12

10

20

30

40

50



【図 13】

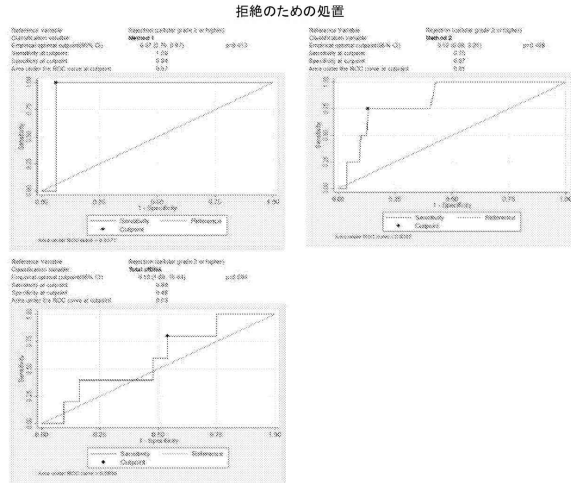


図13

【図 14】

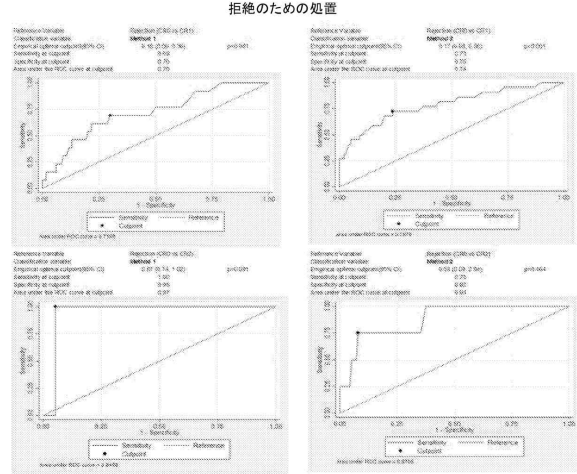


図14

【図 15】

72が用いられた(方法1について7つは不明)  
-2.4057 +0.00749 \* 方法 1 (p=0.92)

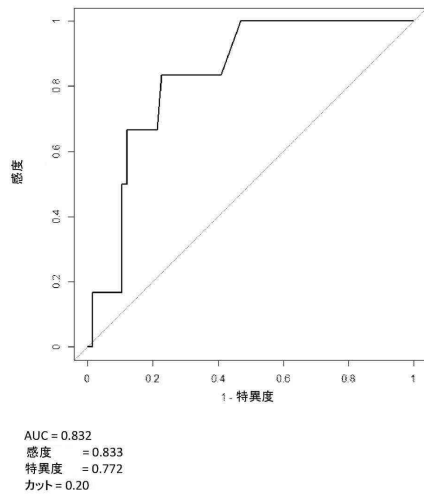


図15

【図 16】

カラムE(方法2、ドナーUBなし)  
N=211  
-3.0141 +0.1165 \* NoDo\_95UB (p=0.98)

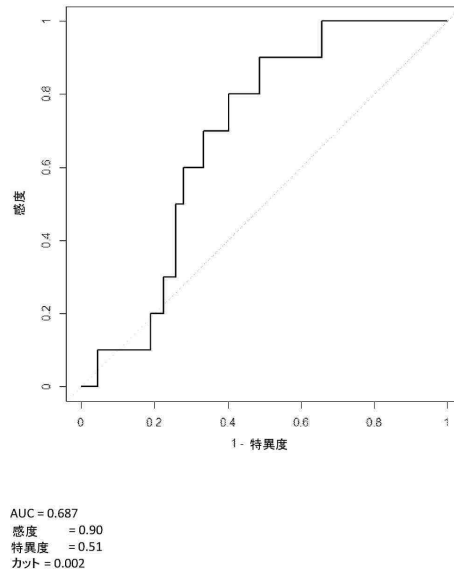


図16

10

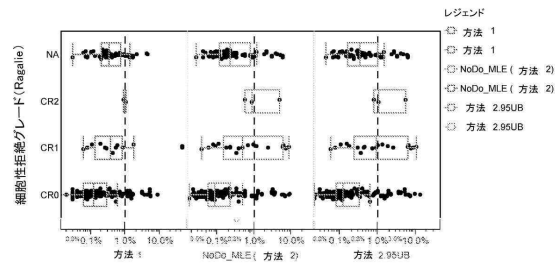
20

30

40

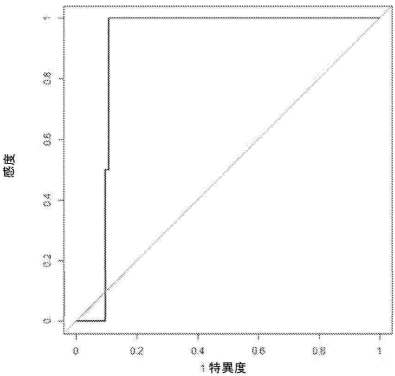
50

【図 17】



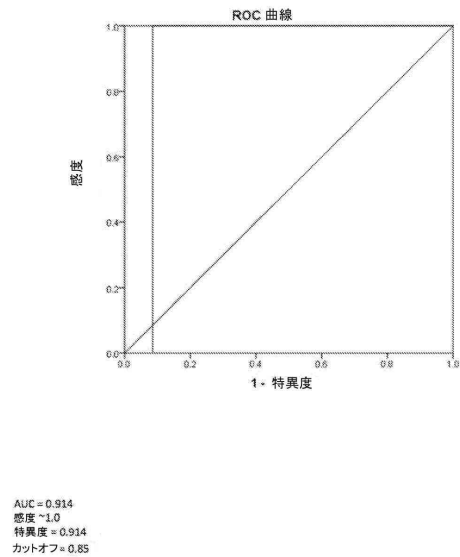
【図 18】

4.拒絶CR2ー方法1 (ドナー画分) (除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有するー180の試料を用いた  
 $-4.5053 + 0.0195 * \text{方法 1} (p=0.40)$



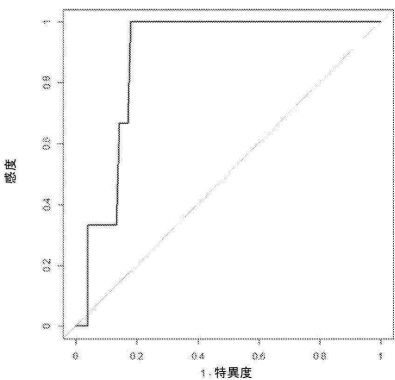
【図 19】

6.拒絶CR2ー方法1 (ドナー画分) (1試料/対象)  
用いられた全てからの最後の試料  
 $-3.5553 + 0 * \text{方法 1} (p>0.9)$



【図 20】

7.拒絶CR2ー方法2 (ドナー画分) (除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
214中3がCR2を有した  
 $-4.3130 + 0.0463 * \text{方法 2} (p=0.11)$



10

20

30

40

50

## 【図 2 1】

9.拒絶CR2ー方法2(ドナー画分)(I試料/対象)

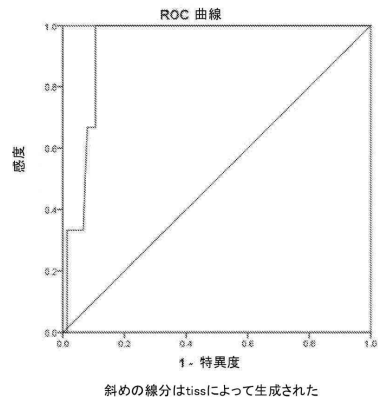
N=79, 79中3がCR2拒絶を有した  
-3.2699+0.0282 \* 方法2 (p=0.69)AUC = 0.936  
感度 ~ 1.0  
特異度 = 0.895

図21

## 【図 2 2】

拒絶CR2ー方法1(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)

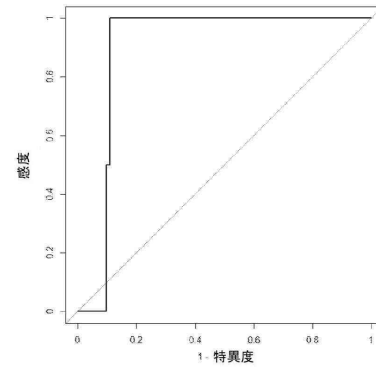
除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有する~180の試料を用いた  
-4.4879+0.0189 \* 方法1 (p=0.42)AUC = 0.8971  
感度 ~ 1  
特異度 = 0.891  
カットオフ = 0.873

図22

## 【図 2 3】

拒絶CR2ー方法2(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)

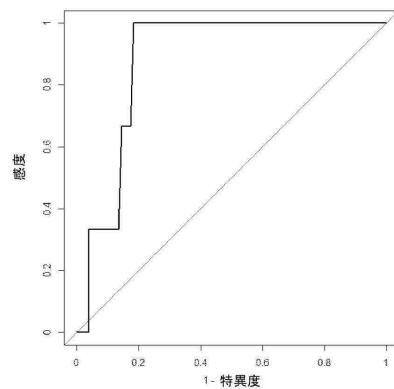
除外後、79対象からN=211  
211中3がCR2を有した  
-4.2985+0.0458 \* 方法2 (p=0.11)AUC = 0.8814  
感度 ~ 1.0  
特異度 = 0.82  
カットオフ = 0.516

図23

## 【図 2 4】

拒絶CR2ーNoDo\_95UB(ドナー画分)

カラムE(方法2、ドナーUBなし)

214全てを使用

-4.3242+4.7203\* NoDo\_95UB (p=0.09)

おそらくはCR2拒絶についてn=3であるため、OR推定値は高く、信頼限界は広い

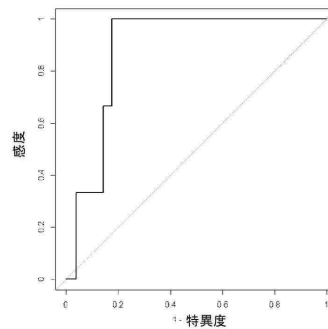
AUC = 0.8815  
感度 ~ 1.0  
特異度 = 0.825  
カットオフ = 0.008

図24

10

20

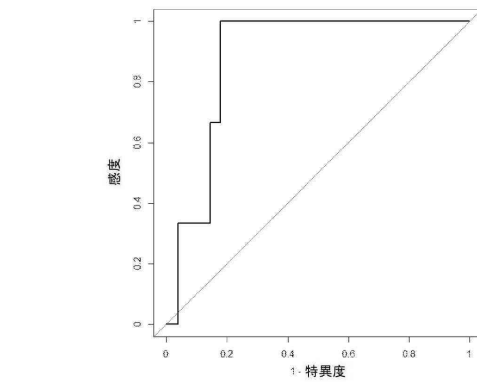
30

40

50

【図 2 5】

拒絶CR2ーNoDo\_95UB(ドナー画分)ーメッシュサポートは除外  
カラムE(方法2、ドナーUBなし)  
214全てを使用  
 $-4.3096 + 4.6781 \cdot \text{NoDo\_95UB}$  ( $p=0.09$ )  
おそらくはCR2拒絶について $n=3$ であるため、OR推定値は高く、信頼限界は広い

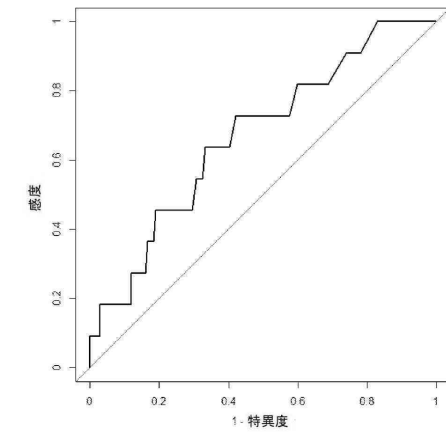


AUC = 0.8798  
感度 = 1.0  
特異度 = 0.822  
カットオフ = 0.008

図25

【図 2 6】

細胞拒絶CR1ー方法1(ドナー画分)(除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有するー180の試料を用いた  
214中11がCR1を有した  
 $-2.9156 + 0.1929 \cdot \text{方法 1}$  ( $p=0.13$ )

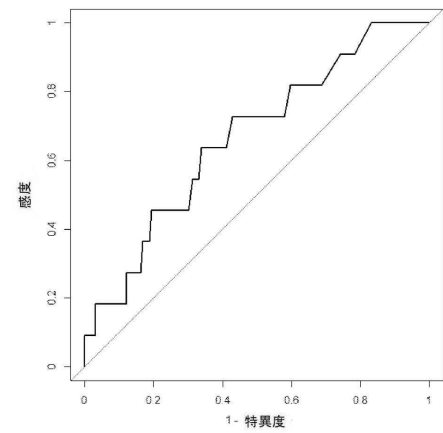


AUC = 0.6689  
感度 = 0.727  
特異度 = 0.580  
カット = 0.18

図26

【図 2 7】

細胞拒絶CR1ー方法1(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)  
除外後、79対象からN=211  
方法1は不明値/NAを有するー177の試料を用いた  
 $-2.8960 + 0.1888 \cdot \text{方法 1}$  ( $p=0.12$ )

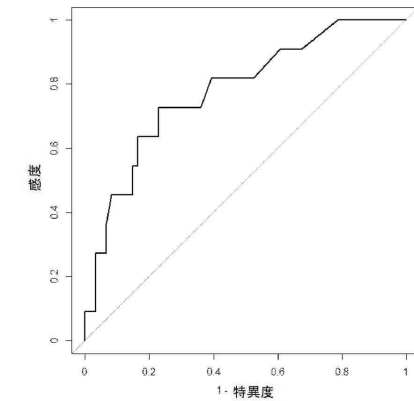


AUC = 0.6659  
感度 = 0.727  
特異度 = 0.572  
カット = 0.18

図27

【図 2 8】

細胞拒絶CR1ー方法1(ドナー画分)(1試料/対象)  
79(実際には72、71は不明)中11が、このサブグループ中でCR1を有した  
 $-1.8838 + 0.2041 \cdot \text{方法 1}$  ( $p=0.51$ )



AUC = 0.7802  
感度 = 0.727  
特異度 = 0.770  
カット = 0.18

図28

10

20

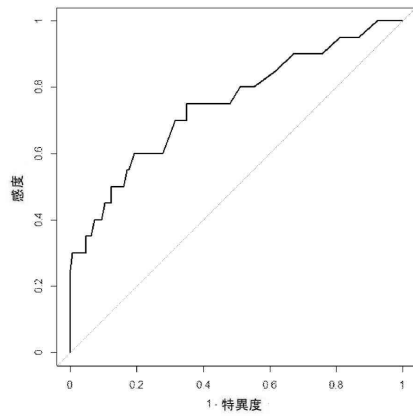
30

40

50

## 【図 29】

細胞拒絶CR1ー方法1(ドナー画分)(除外後全214)  
除外後、79対象からN=214-20がCR1を有した  
 $-2.8526 + 0.5150 \cdot \text{方法 2}$  ( $p < 0.0001$ )

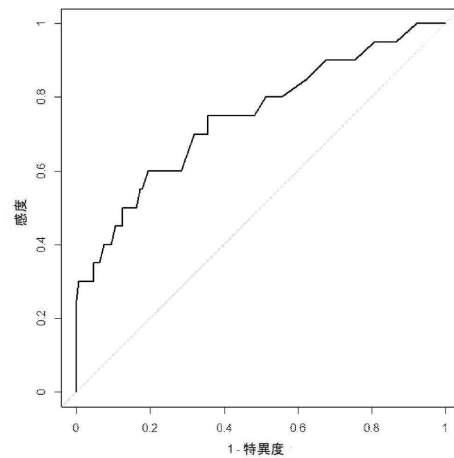


AUC = 0.748  
感度 = 0.60  
特異度 = 0.809  
カット = 0.355

図29

## 【図 30】

細胞拒絶CR1ー方法2(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)  
除外後、79対象からN=211  
 $-2.8365 + 0.5120 \cdot \text{方法 2}$  ( $p < 0.0001$ )

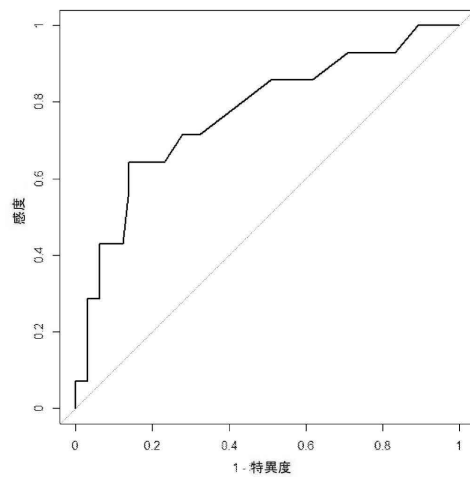


AUC = 0.747  
感度 = 0.60  
特異度 = 0.806  
カット = 0.355

図30

## 【図 31】

細胞拒絶CR1ー方法2(ドナー画分)(1試料/対象)  
最後のCR1試料および残りからの最後の試料を用いた(N=79)  
79中14がCR1を有した  
 $-1.7341 + 0.3997 \cdot \text{方法 2}$  ( $p = 0.27$ )

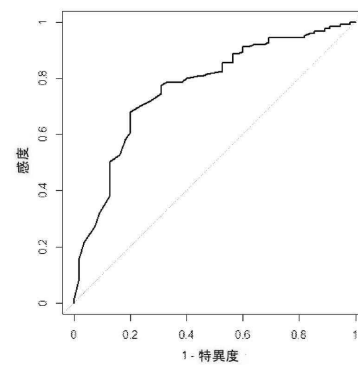


AUC = 0.770  
感度 = 0.643  
特異度 = 0.861  
カット = 0.175

図31

## 【図 32】

細胞拒絶CR0ー方法1(ドナー画分)(除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有する-180の試料を用いた  
180中125はCR0を有した  
 $1.5493 - 0.3139 \cdot \text{方法 1}$  ( $p = 0.04$ )



AUC = 0.7685  
感度 = 0.68  
特異度 = 0.80  
カット = 0.18

図32

10

20

30

40

50

【図 3 3】

細胞拒絶CR0ー方法1 (ドナー画分) (メッシュサポートは除外)  
除外後、N=211  
方法1は不明値/NAを有するー177の試料を用いた  
1.6184 - 0.3621 \* 方法1 (p=0.02)

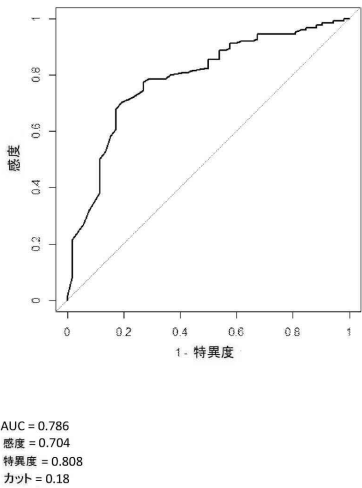


図33

【図 3 4】

細胞拒絶CR0ー方法1 (ドナー画分) (1試料/対象)  
79 (実際には72、71は不明) 中69が、このサブグループ中でCR0を有した  
2.54 - 0.6197 \* 方法1 (p=0.05)

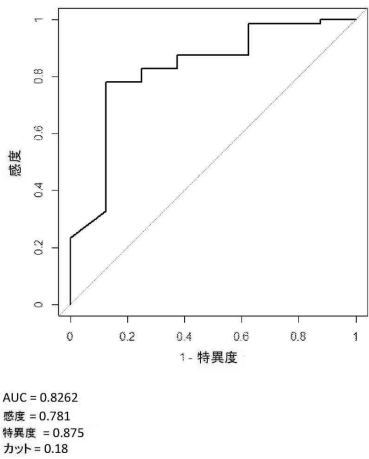


図34

【図 3 5】

細胞拒絶CR0ー方法2 (ドナー画分) (除外後全214)  
除外後、79対象からN=214-133がCR0を有した  
1.3156 - 0.1865 \* 方法2 (p=0.03)

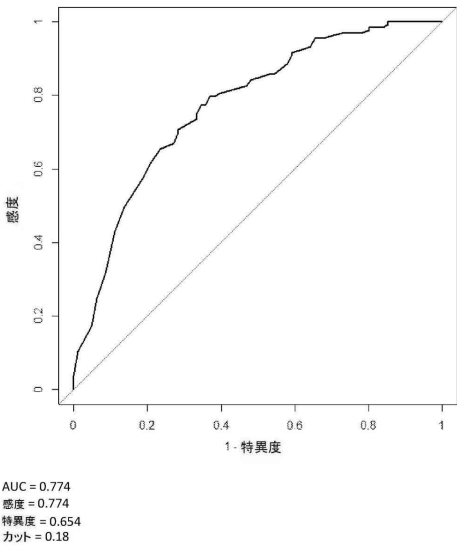


図35

【図 3 6】

細胞拒絶CR0ー方法2 (ドナー画分) (メッシュサポートは除外)  
除外後、79対象からN=211  
1.3756 - 0.1855 \* 方法2 (p=0.07)

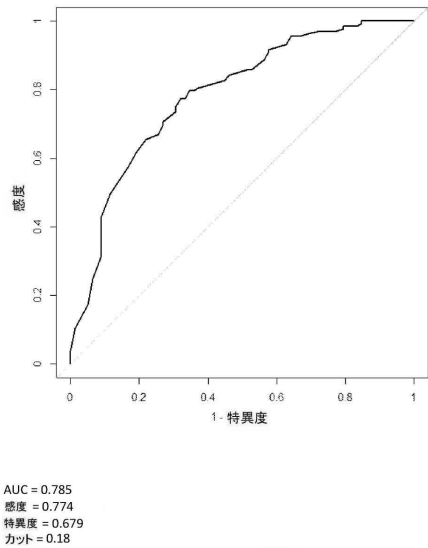


図36

10

20

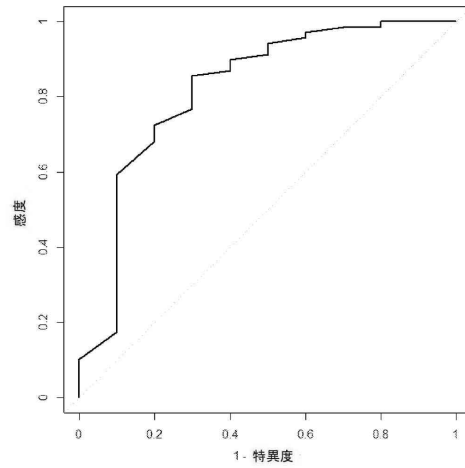
30

40

50

## 【図 37】

細胞拒絶CR0—方法2(ドナー面分)(1試料/対象)  
最後のCR0試料および残りからの最後の試料を用いた(N=79)  
2.4937 - 1.1193 \* 方法2 (p=0.02)



AUC = 0.8203  
感度 = 0.855  
特異度 = 0.905  
カット = 0.21

図37

## 【図 38】

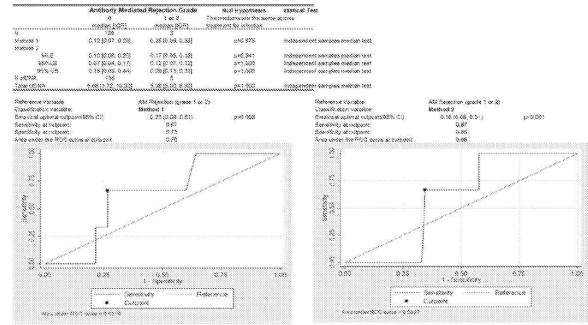
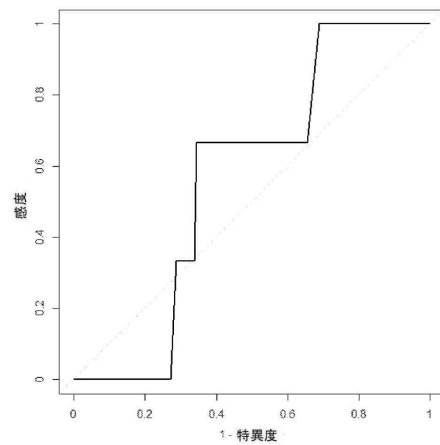


図38

## 【図 39】

除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有する—180の試料を用い、180中3はAMR(1、2)を有した  
-3.8637 - 0.6692 \* 方法1 (p=0.22)

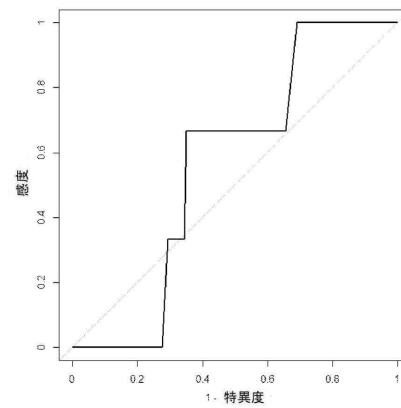


AUC = 0.569  
感度 = 0.67  
特異度 = 0.66  
カット = 0.26

図39

## 【図 40】

除外後N=211  
方法1は不明値/NAを有する—177の試料を用いた  
-3.8389 - 0.6887 \* 方法1 (p=0.21)



AUC = 0.565  
感度 = 0.67  
特異度 = 0.65  
カット = 0.26

図40

10

20

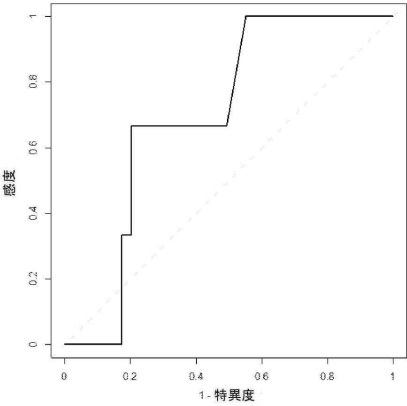
30

40

50

【 図 4 1 】

72を用い(方法1について、7は不明)、3はAMRを有した(1、2)  
-3.0674 - 0.2005 \* 方法1 (p=0.85)

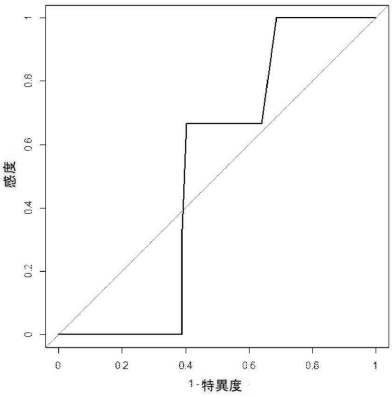


AUC = 0.7005  
感度 = 0.67  
特異度 = 0.80  
カット = 0.25

図41

【 図 4 2 】

除外後、79対象からN=214  
214中3はAMR(1、2)を有した  
-3.8838 - 1.5498 \* 方法2 (p=0.03)



AUC = 0.517  
感度 ~ 1  
特異度 = 0.313  
カット = 0.075

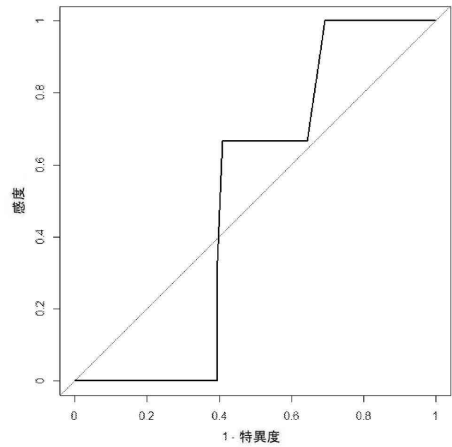
図42

10

20

【 図 4 3 】

除外後、79対象からN=211、3はAMRを有した(1、2)  
-3.8618 - 1.5746 \* 方法2 (p=0.03)

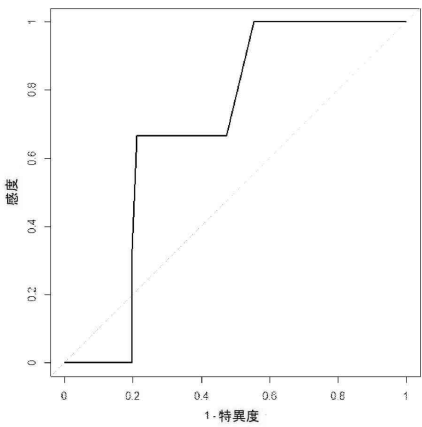


AUC = 0.512  
感度 ~ 1  
特異度 = 0.308  
カット = 0.075

図43

【 図 4 4 】

最後のGV試料および残りからの最後の試料を用い(N=79)、3はAMRを有した(1、2)  
-3.1190 - 0.5357 \* 方法2 (p=0.78)



AUC = 0.695  
感度 = 0.67  
特異度 = 0.79  
カット = 0.16

図44

30

40

50



【図 4 5】

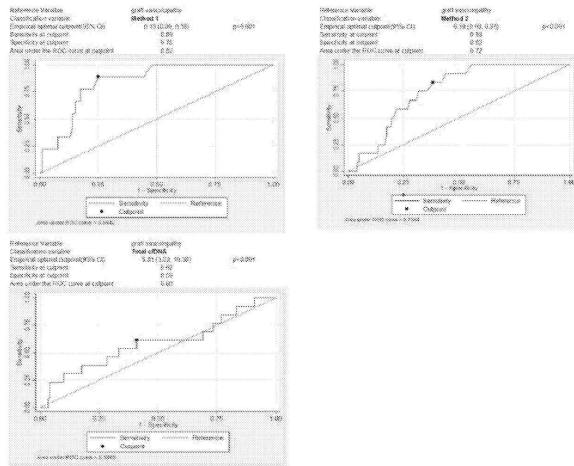


図45

【図 4 6】

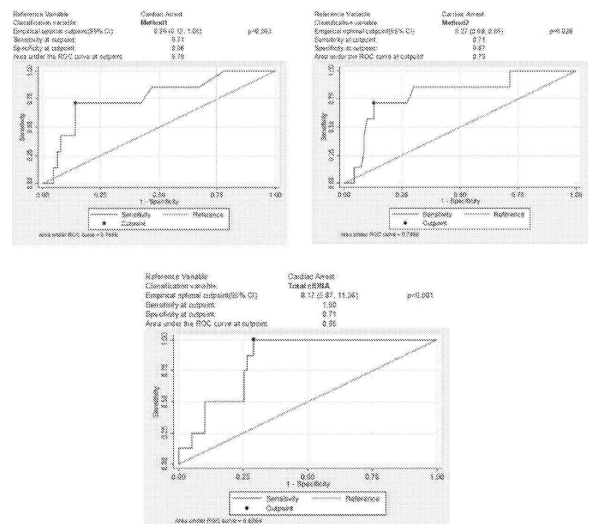
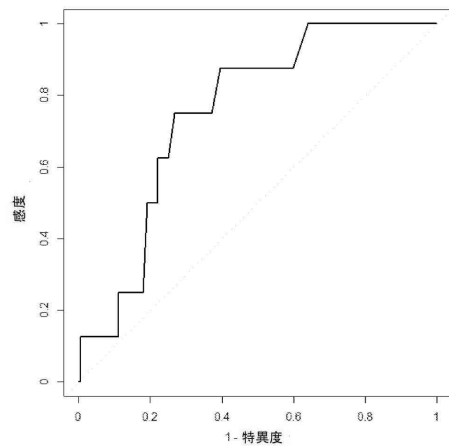


図46

【図 4 7】

除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有する180の試料を用いた  
-3.0928 + 0.0232 \* 方法1 (p=0.48)

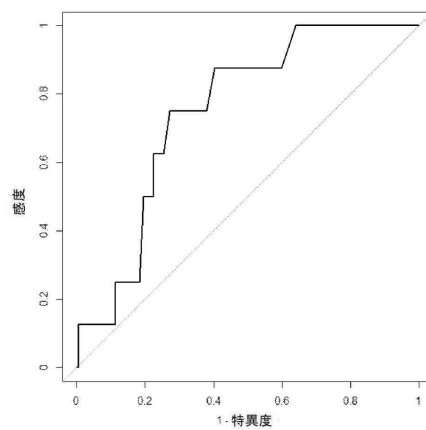


AUC = 0.754  
感度 = 0.75  
特異度 = 0.73  
カット = 0.32

図47

【図 4 8】

除外後、N=211  
方法1は不明値/NAを有する177の試料を用いた  
-3.0748 + 0.0226 \* 方法1 (p=0.50)



AUC = 0.751  
感度 = 0.75  
特異度 = 0.73  
カット = 0.33

図48

10

20

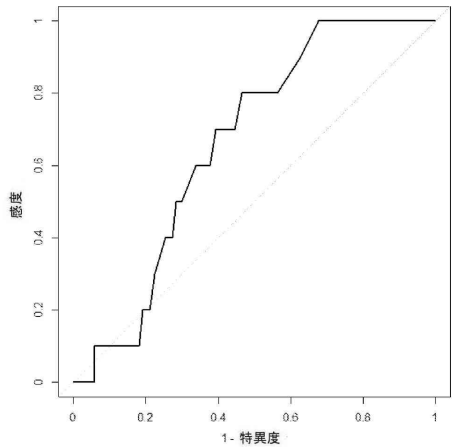
30

40

50

【図 4 9】

除外後、79対象からN=214  
-2.9953 - 0.044 \* 方法2 (p=0.72)

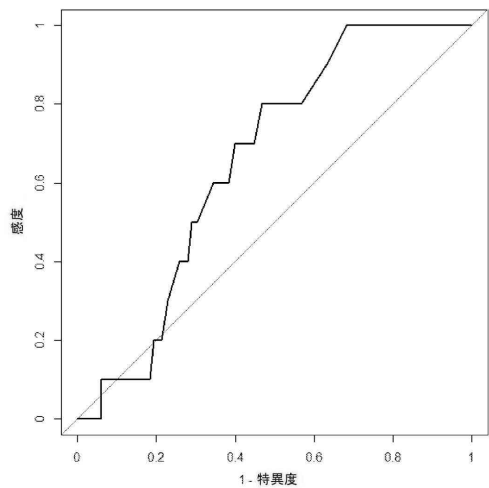


AUC = 0.661  
感度 = 0.80  
特異度 = 0.53  
カット = 0.125

図49

【図 5 0】

除外後、79対象からN=211  
-2.9787 - 0.0466 \* 方法2 (p=0.72)

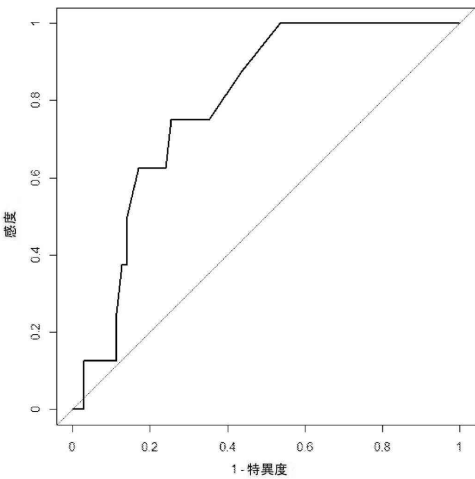


AUC = 0.658  
感度 = 0.80  
特異度 = 0.53  
カット = 0.124

図50

【図 5 1】

最後のGV試料および残りからの最後の試料を用いた (N=79)  
-2.1740 - 0.0129 \* 方法2 (p=0.89)

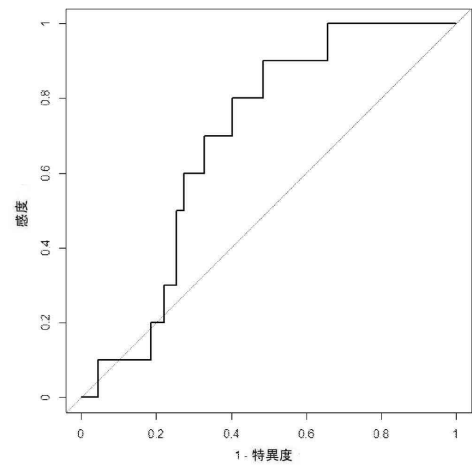


AUC = 0.790  
感度 = 0.75  
特異度 = 0.75  
カット = 0.120

図51

【図 5 2】

カラムE(方法2、ドナーUBなし)  
N=214、10はGVを有する  
信頼限界は大きく、収束の問題を示している  
-3.0284 + 0.2182 \* NoDo\_95UB (p=0.96)



AUC = 0.689  
感度 = 0.90  
特異度 = 0.51  
カット = 0.002

図52

10

20

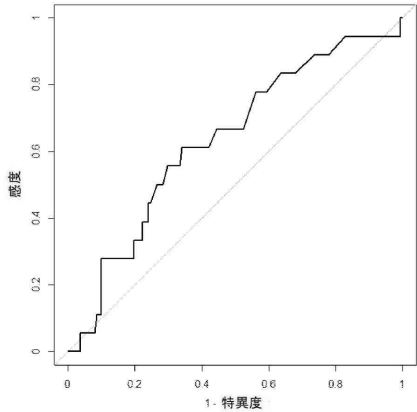
30

40

50

【図 5 3】

停止一方法1 (ドナー画分) (除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
方法1は不明値/NAを有する一180の試料を用いた  
-2.0751 - 0.0170 \* 方法1 (p=0.29)

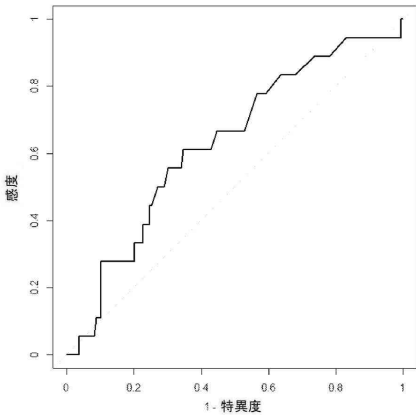


AUC = 0.6336  
感度 = 0.611  
特異度 = 0.660  
カット = 0.223

図53

【図 5 4】

停止一方法1 (ドナー画分) (メッシュサポートは除外)  
除外後、N=211  
方法1は不明値/NAを有する一177の試料を用いた  
-2.0729 - 0.0165 \* 方法1 (p=0.28)

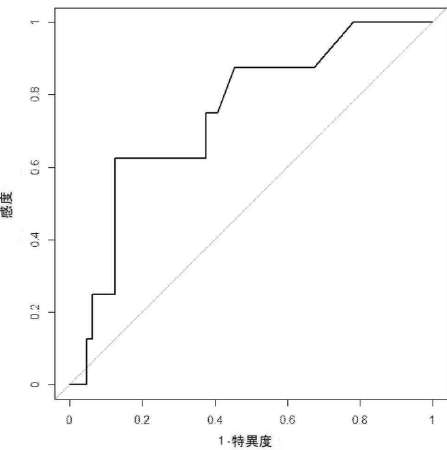


AUC = 0.6307  
感度 = 0.611  
特異度 = 0.654  
カット = 0.226

図54

【図 5 5】

停止一方法1 (ドナー画分) (1試料/対象)  
79 (実際には72、71は不明) 中8がこのサブグループ中で停止を有した  
-2.0623 - 0.0231 \* 方法1 (p=0.83)

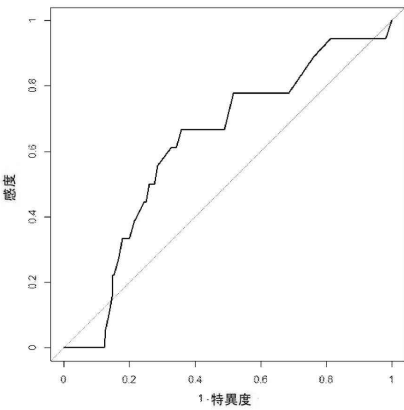


AUC = 0.7480  
感度 = 0.625  
特異度 = 0.875  
カット = 0.370

図55

【図 5 6】

停止一方法2 (ドナー画分) (除外後全214)  
除外後、79対象からN=214  
-2.1929 - 0.0252 \* 方法2 (p=0.066)



AUC = 0.626  
感度 = 0.667  
特異度 = 0.643  
カット = 0.185

図56

10

20

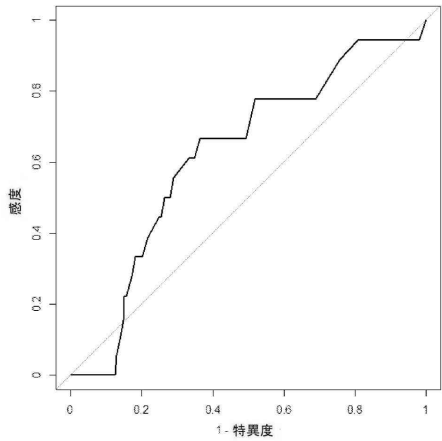
30

40

50

【図 5 7】

停止一方法2(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)  
除外後、79対象からN=211  
-2.1896 - 0.0247 \* 方法2 (p=0.064)

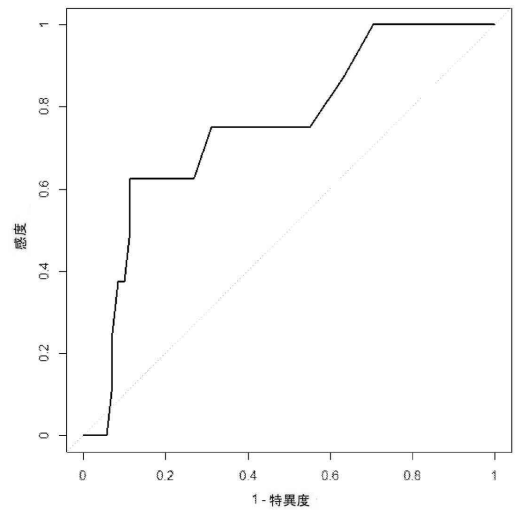


AUC = 0.624  
感度 = 0.667  
特異度 = 0.637  
カット = 0.186

図57

【図 5 8】

停止一方法2(ドナー画分)(1試料/対象)  
最後の停止試料および残りからの最後の試料を用いた(N=79)  
79中の8が停止を有した  
-2.1646 - 0.0317 \* 方法2 (p=0.81)

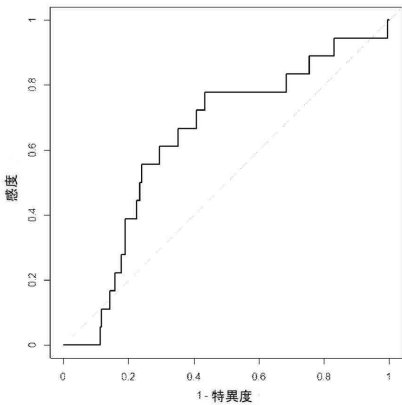


AUC = 0.753  
感度 = 0.625  
特異度 = 0.887  
カット = 0.275

図58

【図 5 9】

停止一方法2、NoDo\_95UB(ドナー画分)  
カラムE(方法2、ドナーUBなし)  
全214を用いた  
-2.1943 - 1.8173\* NoDo\_95UB (p=0.17)

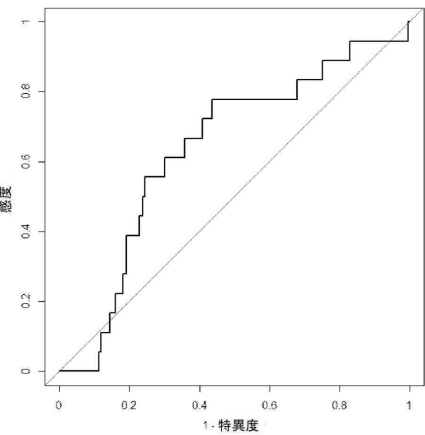


AUC = 0.637  
感度 = 0.778  
特異度 = 0.566  
カット = 0.002

図59

【図 6 0】

停止一方法2、NoDo\_95UB(ドナー画分)(メッシュサポートは除外)  
カラムE(方法2、ドナーUBなし)  
N=211  
-2.1910 - 1.7906\* NoDo\_95UB (p=0.16)



AUC = 0.635  
感度 = 0.778  
特異度 = 0.565  
カット = 0.002

図60

10

20

30

40

50

【図 6 1】

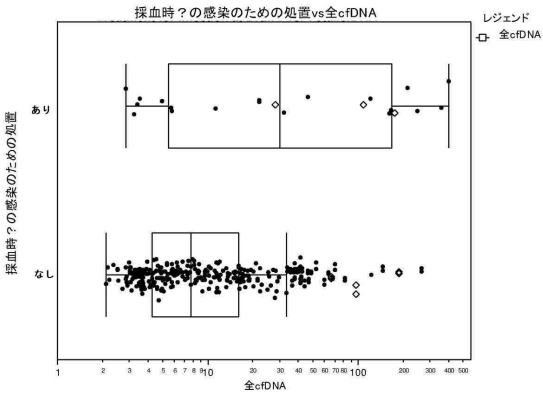


図61

【図 6 2】

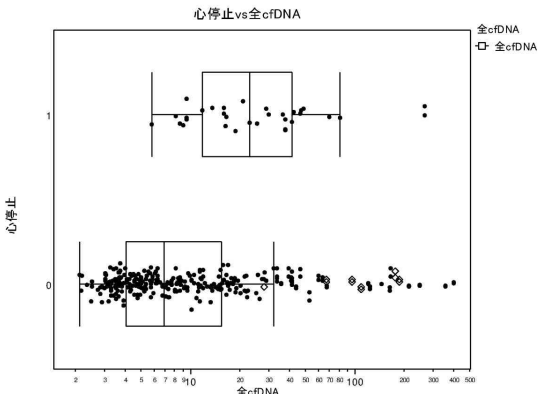


図62

【図 6 3】

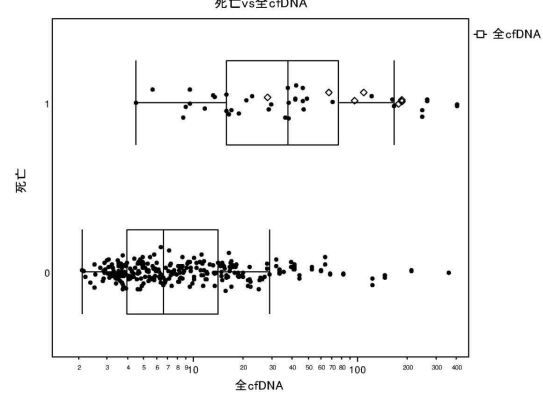


図63

【図 6 4】

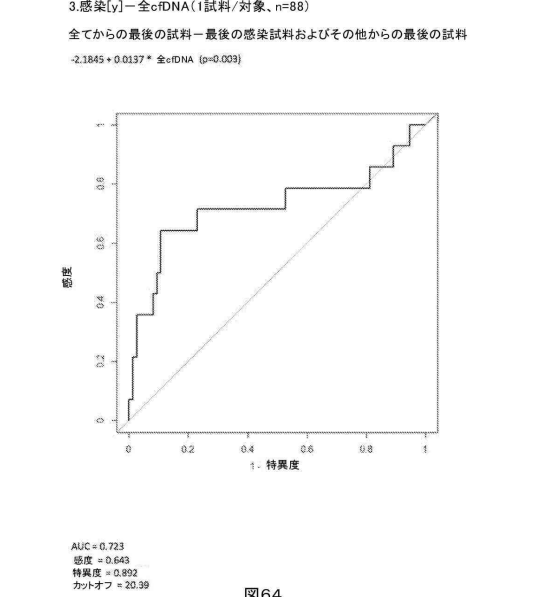


図64

10

20

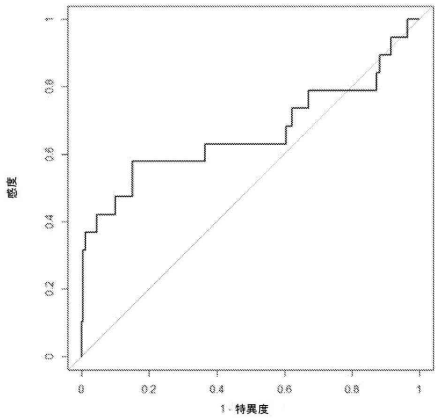
30

40

50

【図 6 5】

2.感染[y]-全cDNA(メッシュサポートは除外)  
6の機械的サポート試料を除外した  
 $-3.0884 + 0.0159 * \text{全cDNA}$  ( $p<0.0001$ )

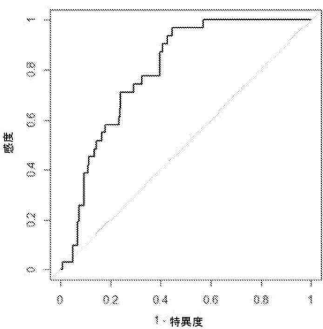


AUC = 0.6649  
感度 = 0.579  
特異度 = 0.850  
カットオフ = 21.67

図65

【図 6 6】

1.停止-全cDNA(全298試料)  
全298を用いた  
 $-2.3156 + 0.0005 * \text{全cDNA}$  ( $p=0.04$ )

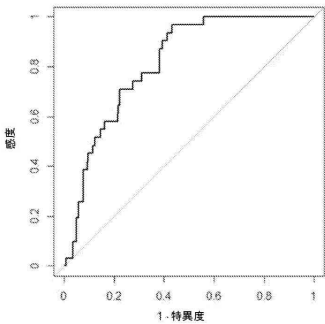


AUC = 0.7974  
感度 = 0.968  
特異度 = 0.554  
カットオフ = 8.18

図66

【図 6 7】

2.停止-全cDNA(メッシュサポート除外後の292試料)  
全292を用いた  
 $-2.3036 + 0.0005 * \text{全cDNA}$  ( $p=0.04$ )

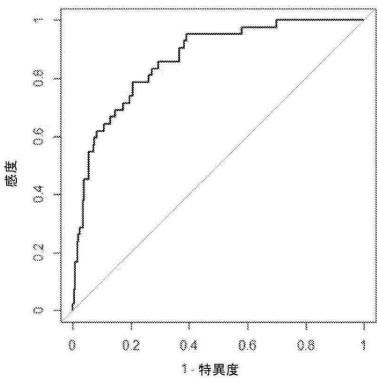


AUC = 0.8131  
感度 = 0.968  
特異度 = 0.567  
カットオフ = 9.06

図67

【図 6 8】

1.死亡-全cDNA(全298試料)  
全298を用いた  
 $-1.9463 + 0.0023 * \text{全cDNA}$  ( $p=0.03$ )



AUC = 0.8664  
感度 = 0.786  
特異度 = 0.793  
カットオフ = 15.96

図68

10

20

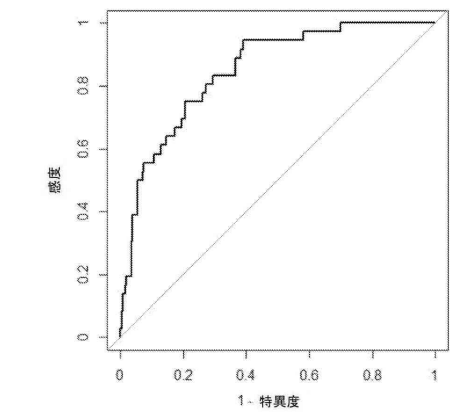
30

40

50

【図 6 9】

2.死亡ー全cfDNA(メッシュサポートは除外)  
6の機械的サポート試料を除外した  
 $-2.0805 + 0.0019 * \text{全cfDNA}$  ( $p=0.04$ )

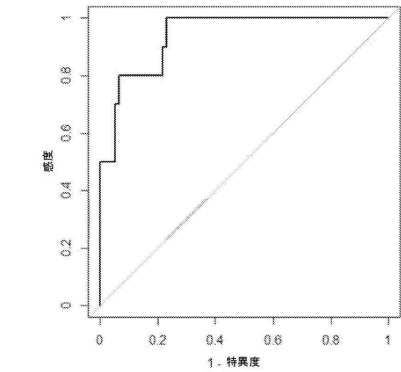


AUC = 0.8484  
感度 = 0.944  
特異度 = 0.609  
カットオフ = 8.72

図69

【図 7 0】

3.死亡ー全cfDNA(1試料/対象、n=88)  
全てからの最後の試料(N=88)  
 $-3.3358 + 0.0480 * \text{全cfDNA}$  ( $p=0.01$ )

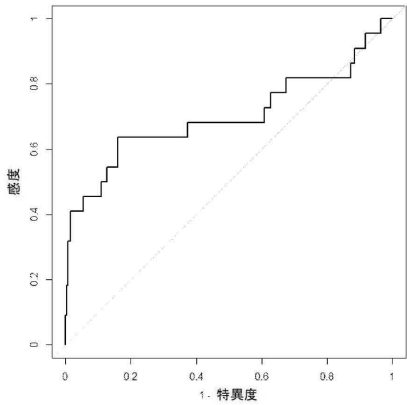


AUC = 0.9385  
感度 ~ 1.0  
特異度 = 0.769  
カットオフ = 8.77

図70

【図 7 1】

1.感染[y]ー全cfDNA(全298試料)  
全298を用いた  
 $-2.9484 + 0.0146 * \text{全cfDNA}$  ( $p<0.0001$ )

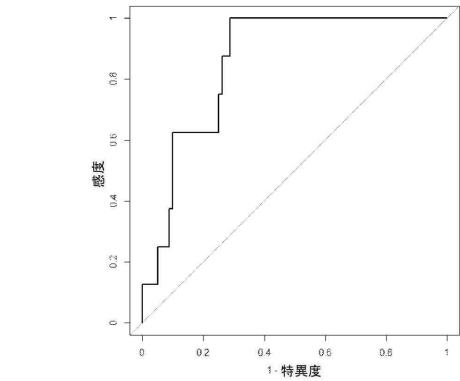


AUC = 0.7006  
感度 = 0.636  
特異度 = 0.833  
カットオフ = 21.18

図 71

【図 7 2】

停止ー全cfDNA(1試料/対象、n=88)  
全てからの最後の試料(N=88)  
 $-2.6123 + 0.0101 * \text{全cfDNA}$  ( $p=0.05$ )



AUC = 0.8578  
感度 ~ 1  
特異度 = 0.712  
カットオフ = 8.18

図72

10

20

30

40

50

【 図 7 3 】

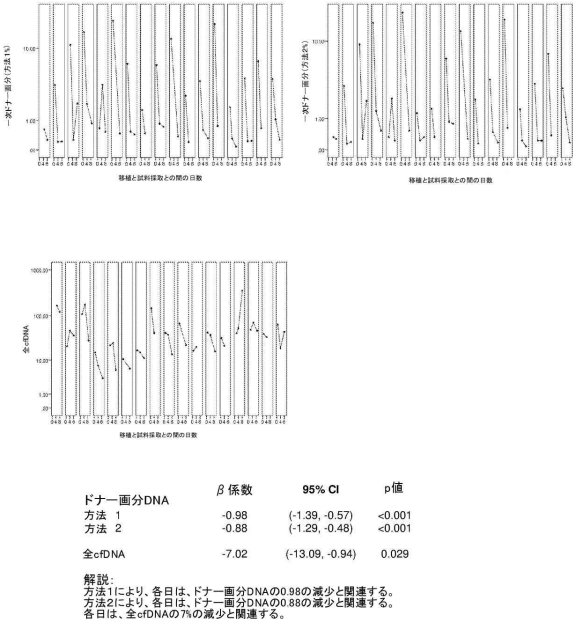


図 7 3

【 図 7 4 】

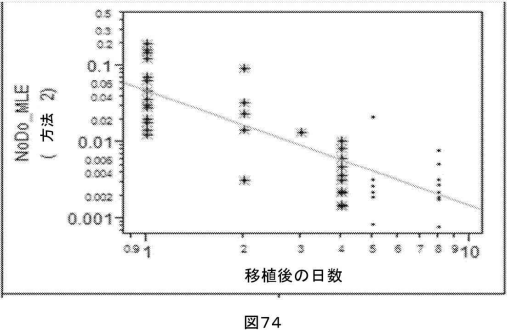


図 74

【 図 7 5 】

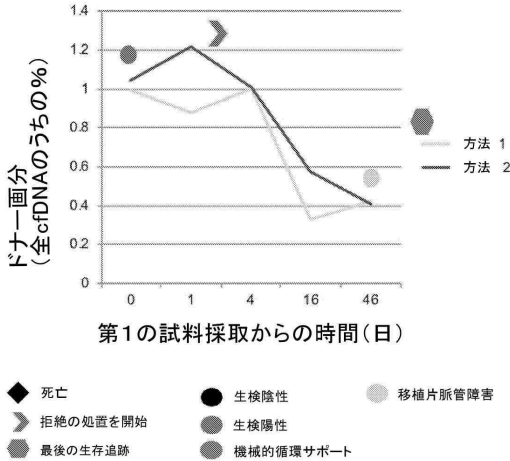


図 75

【 図 7 6 A 】

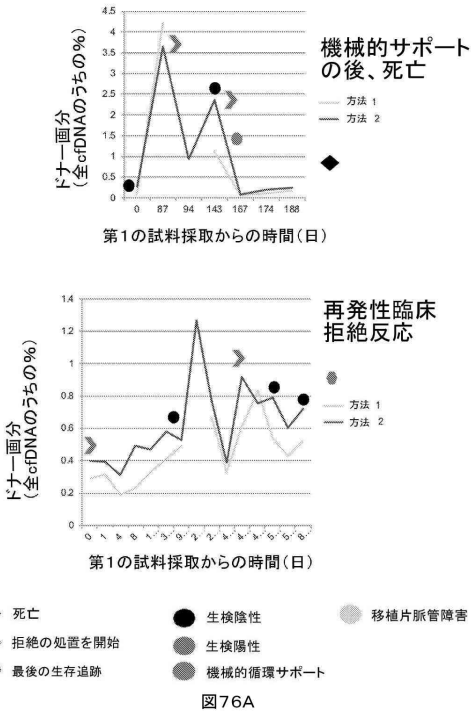


図 76A

10

20

30

40

50



【図 7 6 B】

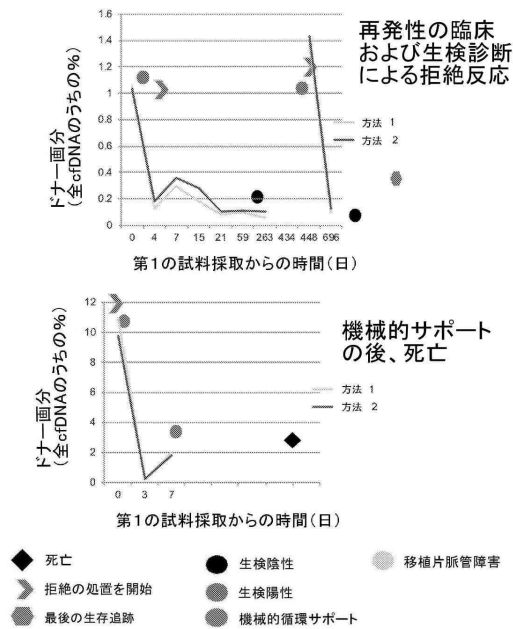


図76B

【図 7 7】

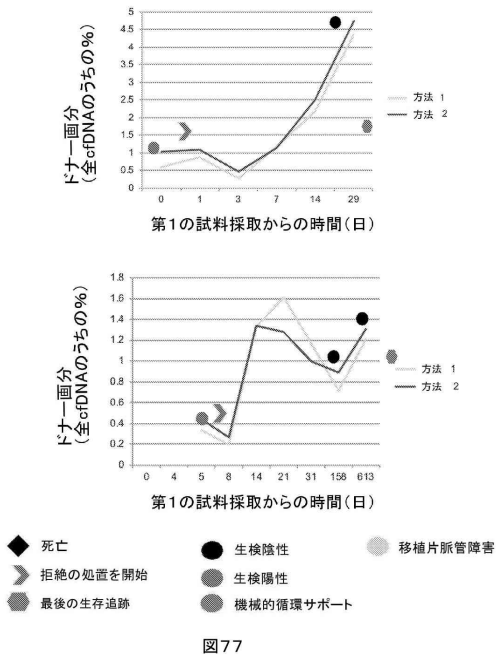


図 77

【図 7 8】

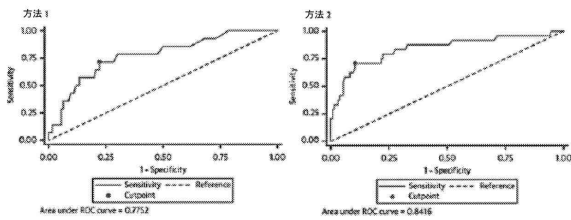


図78

【図 7 9】

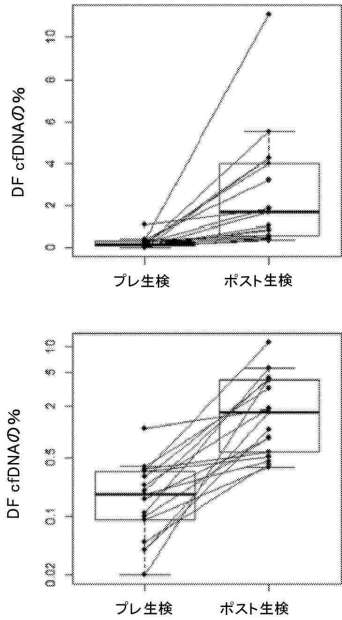


図 79

10

20

30

40

50

【図 8 0】

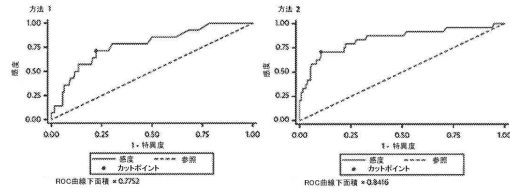


図 8 0

【図 8 1】

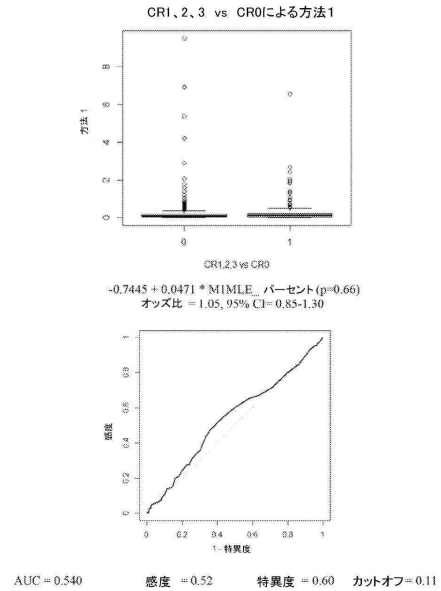


図 81

【図 8 2】

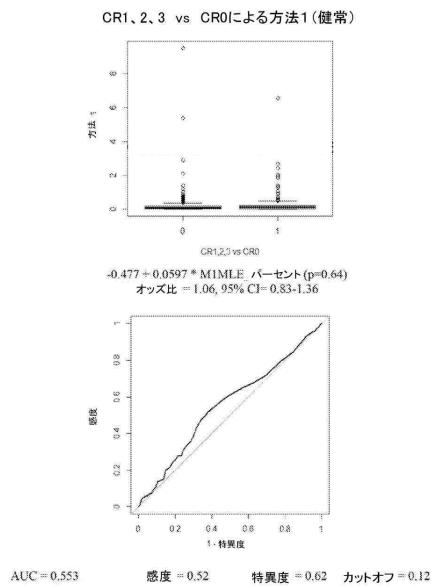


図 82

【図 8 3】

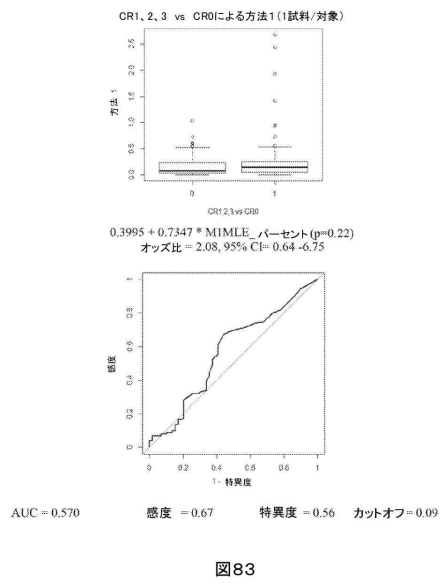


図 83

10

20

30

40

50

【 図 8 4 】

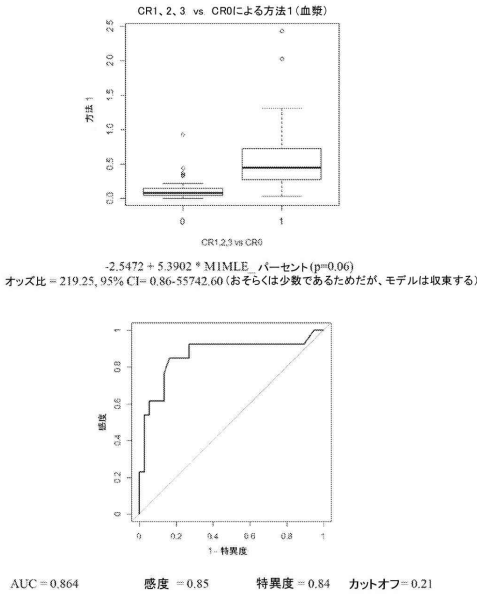


図84

【 図 8 5 】

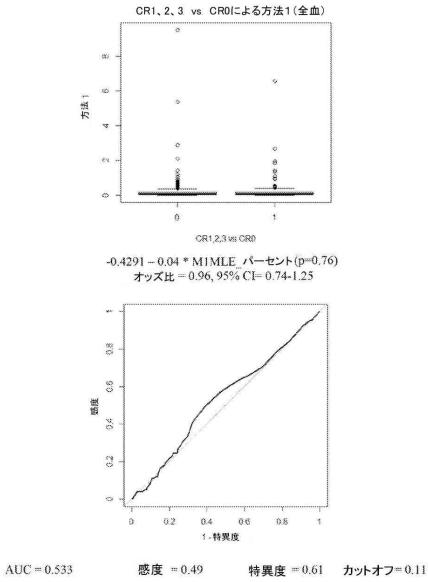


図85

【 図 8 6 】

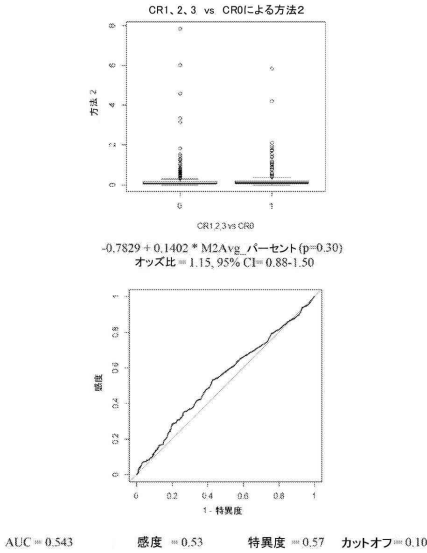


図86

【 図 8 7 】

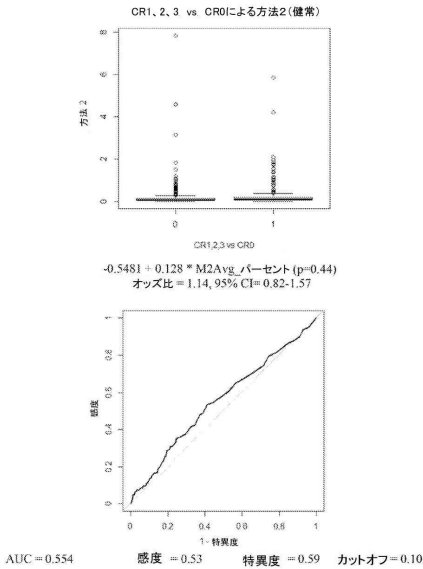


図87

10

20

30

40

50

【図 8 8】

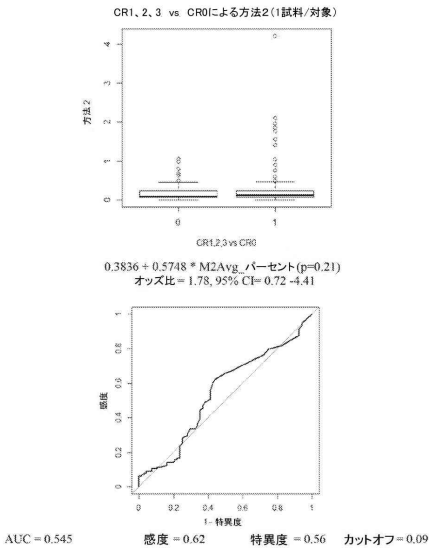


図88

【図 8 9】

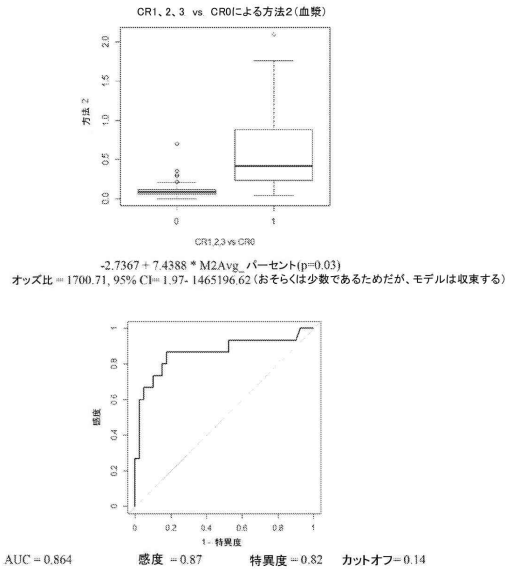


図89

【図 9 0】

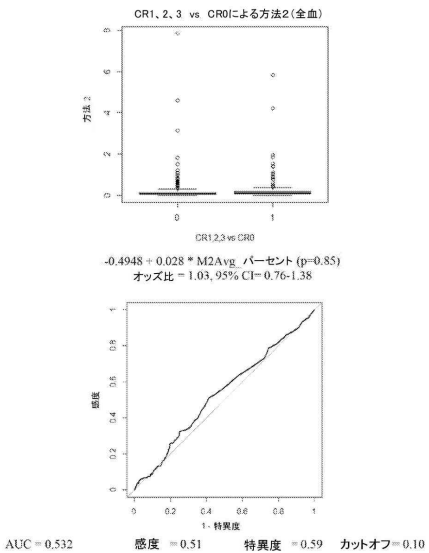


図90

【図 9 1】

		死亡		p値
		なし	あり	
全cIDNA				
N		77	8	
中央値 [IQR]		4.98 [3.70, 8.19]	75.56 [14.84, 204.98]	<0.001
OR (95% CI)/倍加*		3.17 [1.71, 5.91]		<0.001
*cIDNAの増加ごとの生存vs死亡のオッズ比				
参照変数		死亡		
分類変数		全cIDNA		
経験的最適カットポイント (95% CI)		8.62 (3.48, 21.38)		p<0.001
カットポイントにおける感度		1.00		
カットポイントにおける特異度		0.79		
カットポイントにおけるROC曲線下面積		0.90		
PPV		33.3% (24.4, 43.6)		
NPV		100%		

図91

10

20

30

40

50

【図 9 2】

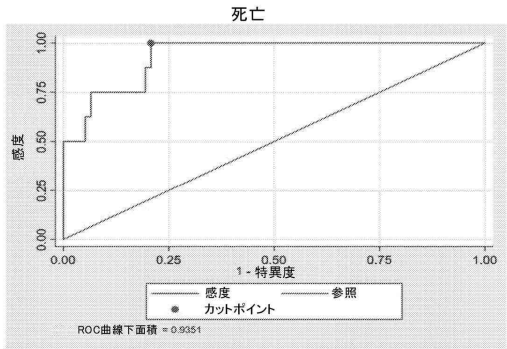


図92

【図 9 3】

	心停止		p値
	なし	あり	
全ctDNA			
N	77	5	
中央値 [IQR]	5.00 [3.78, 8.51]	9.51 [9.03, 20.96]	0.012
OR (95% CI)/倍加*	1.61 [0.99, 2.63]		0.056
*ctDNAの倍加ごとの生存vs死亡のオッズ比			
参照変数	心停止		
分類変数	全ctDNA		
経時的最適カットポイント(95% CI)	8.17 (5.21, 12.81)		p<0.001
カットポイントにおける感度	1.00		
カットポイントにおける特異度	0.73		
カットポイントにおけるROC曲線下面積	0.86		
PPV	19.2% (14.2, 25.5)		
NPV	100%		

図93

10

【図 9 4】

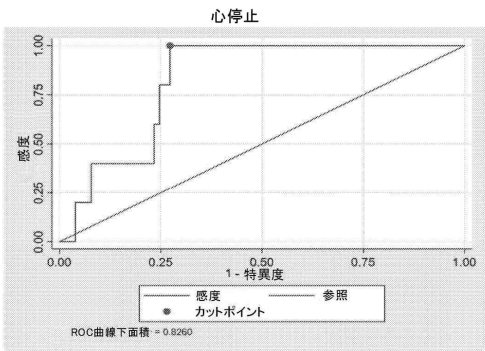


図94

【図 9 5】

	採血時の感染のための処置		統計学的試験
	なし	あり	
N	273	19	
全ctDNA	7.67 [4.29, 15.94]	21.97 [4.98, 166.07]	p=0.343
独立試料中央値試験			
カットポイント推定	感染		
参照変数	全ctDNA		
分類変数	21.44 (10.17, 45.18)		p<0.001
経時的最適カットポイント(95% CI)	0.58		
カットポイントにおける感度	0.85		
カットポイントにおける特異度	0.71		
カットポイントにおけるROC曲線下面積	21.2% (14.3, 30.2)		
PPV	96.7% (94.5, 98.0)		
NPV			

図95

20

【図 9 6】

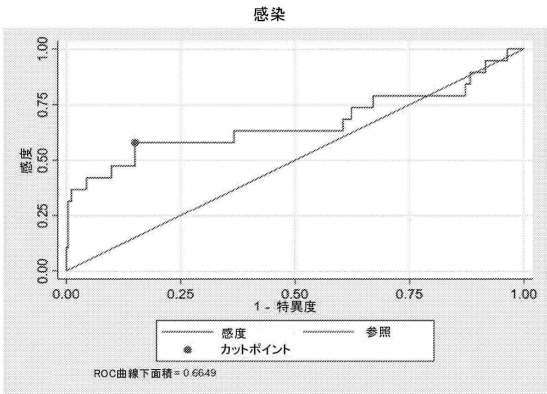


図96

30

40

50

## フロントページの続き

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/653,517

(32)優先日 平成30年4月5日(2018.4.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/655,030

(32)優先日 平成30年4月9日(2018.4.9)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/653,213

(32)優先日 平成30年4月5日(2018.4.5)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## 前置審査

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 5 3 1 2 2、エルム グローブ、ストーンフィールド コート  
1 3 8 3 5

審査官 千葉 直紀

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 5 / 0 0 8 6 4 7 7 ( U S , A 1 )

国際公開第 2 0 1 1 / 1 1 8 6 0 3 ( W O , A 1 )

PLOS Medicine , 2017年 , vol.14, no.4,e1002286 , p.1-19

Clinical Chemistry , 2009年 , vol.55, no.11 , p.1958-1966

Mutat. Res., 1999, Vol.430, pp.1-12

BMC genomics, 2007, Vol.8, 275 (pp.1-9)

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

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

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