

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7630902号
(P7630902)

(45)発行日 令和7年2月18日(2025.2.18)

(24)登録日 令和7年2月7日(2025.2.7)

(51)国際特許分類

C 1 2 Q	1/6858(2018.01)	C 1 2 Q	1/6858	Z
C 1 2 Q	1/6827(2018.01)	C 1 2 Q	1/6827	Z
C 1 2 Q	1/6851(2018.01)	C 1 2 Q	1/6851	Z
C 1 2 Q	1/686(2018.01)	C 1 2 Q	1/686	Z
C 1 2 Q	1/6883(2018.01)	C 1 2 Q	1/6883	Z

請求項の数 12 (全45頁)

(21)出願番号	特願2018-556983(P2018-556983)
(86)(22)出願日	平成29年4月29日(2017.4.29)
(65)公表番号	特表2019-518438(P2019-518438)
A)	
(43)公表日	令和1年7月4日(2019.7.4)
(86)国際出願番号	PCT/US2017/030293
(87)国際公開番号	WO2017/190106
(87)国際公開日	平成29年11月2日(2017.11.2)
審査請求日	令和2年4月30日(2020.4.30)
審判番号	不服2022-13529(P2022-13529/J 1)
審判請求日	令和4年8月29日(2022.8.29)
(31)優先権主張番号	62/330,053
(32)優先日	平成28年4月29日(2016.4.29)
(33)優先権主張国・地域又は機関	最終頁に続く

(73)特許権者	511148204 ザ メディカル カレッジ オブ ウィスコ ンシン インク THE MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, INC. アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53 226 ミルウォーキー ウォーターハウ ン ブランク ロード 8701
(74)代理人	100102842 弁理士 葛和 清司
(72)発明者	ミッセル, アオイ, トミタ アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53 122、エルム グローブ、ストーンフ ィールド コート 13835
(72)発明者	スタム, カール

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多重 / 最適化ミスマッチ増幅 (MOMA) - 標的数

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

対象からの試料中のドナー特異的無細胞DNAの量を評価する方法であって、試料がドナーテ異的無細胞DNAおよび対象の無細胞DNAを含み、方法が：
 少なくとも39の一塩基バリアント(SNV)標的のそれぞれについて、試料またはその一部に対して、少なくとも2つのプライマー対を用いた増幅に基づく定量アッセイを実施すること、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、少なくとも2つのプライマー対の1つは、プライマーにおいてSNV標的の1つのアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを、しかしSNV標的の別のアレルに対しては3'二重ミスマッチを含み、かつSNV標的の1つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも2つのプライマー対のもう1つは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および、

増幅に基づく定量アッセイからの結果を得るかまたは提供して、試料中のドナー特異的無細胞DNAの量を決定すること、

を含み、

ここでドナーの遺伝子型が知られておらず、および方法が、ドナーの遺伝子型を予測すること、またはドナーの遺伝子型の予測に基づいて結果を評価することをさらに含み、結果が、試料中のドナー特異的無細胞DNAの量を含む、または、方法がさらに、試料中のドナー特異的無細胞DNAの量を、結果に基づいて決定することを含み、
 ここで対象が、移植レシピエントである、前記方法。

【請求項 2】

方法がさらに、少なくとも 39 の S N V 標的を決定することを含む、および / または、方法がさらに、S N V 標的のそれぞれについて少なくとも 2 つのプライマー対を得ることを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 39 の S N V 標的が、少なくとも 42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、71、75、78、81、84、87、90、93、または 96 の S N V 標的である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

少なくとも 39 の S N V 標的が、40 ~ 45、40 ~ 60、40 ~ 75、40 ~ 80、40 ~ 85、40 ~ 90、40 ~ 95、または 40 ~ 100 の S N V 標的である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項 5】

少なくとも 2 つのプライマー対のもう 1 つのプライマー対もまた、プライマーにおいて S N V 標的の別のアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを、しかし S N V 標的の 1 つのアレルに対しては 3' 二重ミスマッチを含み、かつ S N V 標的の別のアレルを特異的に増幅する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

(i) 量が、試料中のドナー特異的無細胞 D N A の絶対値である、または、

(i i) 量が、試料中のドナー特異的無細胞 D N A の相対値である、または、

(i i i) 量が、対象の無細胞 D N A または全無細胞 D N A に対するドナー特異的無細胞 D N A の比率またはパーセンテージである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 7】

方法がさらに、ドナー特異的無細胞 D N A および / または対象の無細胞 D N A の遺伝子型を得ることを含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

試料中のドナー特異的無細胞 D N A の量が、少なくとも 1 % または少なくとも 1 . 3 % または少なくとも 1 . 5 % または少なくとも 2 % である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

ドナー特異的無細胞 D N A の遺伝子型が知られていないかまたは得られていない場合、方法がさらに

ドナー特異的な遺伝子型を予測すること、または、ドナー特異的な遺伝子型の予測に基づいて、結果を評価すること、

を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

増幅に基づく定量アッセイが、リアルタイム P C R アッセイまたはデジタル P C R アッセイなどの定量的 P C R アッセイである、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

方法がさらに、

(i) ドナー特異的無細胞 D N A の量に基づき、対象への処置に関する情報を提供すること、

(i i) 対象におけるドナー特異的無細胞 D N A の量を、経時的にモニタリングすること、

(i i i) 核酸を試料から抽出すること、および / または、

(i v) S N V 標的に対するプライマーを使用する増幅ステップを含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 12】

試料が、血液、血漿または血清を含む、請求項 1 ~ 11 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**

本出願は、35 U.S.C. § 119(e)の元で、2016年4月29日に出願された米国仮出願第62/330,053号の出願日の利益を主張し、この仮出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】**【 0 0 0 2 】****発明の分野**

本発明は、対象からの試料中の非天然核酸の量を評価するための、方法および組成物に関する。本明細書で提供される方法および組成物は、移植拒絶反応または胎児の悪い状態などの状態のリスクを決定するために使用することができる。本発明はさらに、非天然無細胞デオキシリボ核酸（ドナー特異的無細胞DNAなどの非天然無細胞DNA）の量を評価するための、多重／最適化ミスマッチ増幅（MOMA）を使用した、方法および組成物に関する。

10

【発明の概要】**【 0 0 0 3 】**

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

20

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

【 0 0 0 4 】

驚くべきことに、対象からの試料中の非天然核酸が、ドナーまたは胎児などの別の対象などの外来起源のものである場合、わずか6つの情報提供的標的（informative target）を使用して、試料中の非核酸の量を決定し得る。したがって、本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つは、いくつかの態様において少なくとも6つの情報提供的なSNV標的に関連する。標的の「普遍的な」パネル（すなわち、集団内のSNV情報に基づいて設計され、天然または非天然核酸の遺伝子型または疾患または状態に関する特異的突然変異に関わらずに設計された標的のパネル）が見出されているため、少なくとも約18のSNV標的が、6つの情報提供的標的をもたらすために必要とされる。したがって、本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つは、いくつかの態様において少なくとも18のSNV標的に関する。

30

【 0 0 0 5 】

一側面において、対象からの試料中の非天然核酸の量を評価する方法、ここで試料は非天然核酸および天然核酸を含む、が提供される。一態様において、方法は、少なくとも6つの一塩基バリエント（SNV）の情報提供的標的のそれぞれについて、試料またはその一部について、少なくとも2つのプライマー対を用いて増幅に基づく定量アッセイを実施することを含み、ここで各プライマー対は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、ここで少なくとも2つのプライマー対のうちの1つは、SNV標的の1つのアレルに対して、プライマーにおいて3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも2つのプライマー対のもう1つはSNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および、増幅に基づく定量アッセイから結果を得るかまたは提供して、試料中の非天然核酸の量を決定することを含む。

40

50

一態様において、結果はレポートで提供される。

【 0 0 0 6 】

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

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、試料またはその一部に対して実施される増幅に基づく定量アッセイから結果を得ることを含み、ここでアッセイは少なくとも6つの一塩基バリエント(SNV)の情報提供的標的の増幅を含み、増幅には情報提供的標的のそれぞれについて少なくとも2つのプライマー対を用い、ここで各プライマー対はフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、ここで少なくとも2つのプライマー対の1つは、SNV標的の1つのアレルに対してプライマーにおいて3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異的に増幅し、少なくとも2つのプライマー対のもう1つがSNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、および、結果に基づいて非天然核酸の量を評価することを含む。

10

【 0 0 0 7 】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料中の非天然核酸の量は、増幅に基づく定量アッセイの結果に基づく。

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

20

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

【 0 0 0 8 】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、量は、試料中の非天然核酸の絶対値である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、量は、試料中の非天然核酸の相対値である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、量は、天然核酸または全核酸に対する非天然核酸の比率またはパーセンテージである。

30

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、非天然核酸および/または天然核酸の遺伝子型を得ることをさらに含む。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的を決定することをさらに含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法は、SNVの情報提供的標的のそれぞれについて少なくとも2つのプライマー対を得ることをさらに含む。

【 0 0 0 9 】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または32のSNVの情報提供的標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、35、34、33、32、31または30未満のSNVの情報提供的標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、25未満のSNVの情報提供的標的である。

40

【 0 0 1 0 】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料の非天然核酸の量は少なくとも1%である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料の非天然核酸の量は少なくとも1.3%である。本明細書で提供される方法のいずれか

50

1つの一態様において、試料の非天然核酸の量は少なくとも1.5%である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料の非天然核酸の量は少なくとも2%である。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、非天然核酸の遺伝子型が知られていないかまたは得られていないとき、方法は、非天然の遺伝子型を予測すること、または非天然の遺伝子型の予測に基づいて結果を評価することをさらに含む。提供される方法のいずれか1つの一態様において、非天然核酸の量を算出する予測方法の一部として最大尤度が使用される。

【0011】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料は無細胞DNA試料を含み、量は非天然無細胞DNAの量である。

10

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は移植レシピエントである。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、非天然核酸の量はドナー特異的無細胞DNAの量である。提供される方法のいずれか1つの一態様において、移植レシピエントは、心臓移植レシピエントである。提供される方法のいずれか1つの一態様において、移植レシピエントは、小児の移植レシピエントである。提供される方法のいずれか1つの一態様において、移植レシピエントは成人の移植レシピエントである。

【0012】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は妊娠した対象である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、非天然核酸の量は、胎児特異的無細胞DNAの量である。

20

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、増幅に基づく定量アッセイは、リアルタイムPCRアッセイまたはデジタルPCRアッセイなどの定量的PCRアッセイである。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象におけるリスクを、試料中の非天然核酸の量に基づいて決定することを含む。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象への処置を、非天然核酸の量に基づいて選択することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象を、非天然核酸の量に基づいて処置することを含む。

30

【0013】

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、非天然核酸の量に基づき、処置についての情報を対象に提供することまたは無処置を示唆することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、情報は口頭で提供され得る。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象における非天然核酸の量を経時にモニタリングすること、またはモニタリングを示唆すること、を含む。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象における非天然核酸の量を、その後の時点で評価することを含む。

本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、対象に投与される処置の効果を、非天然核酸の量に基づいて評価することを含む。

40

【0014】

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

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

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

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

50

は血清を含む。

【 0 0 1 5 】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、方法は、それぞれのSNV標的について、少なくとも1つの別のプライマー対を用いた定量アッセイからの結果を得ることをさらに含み、ここで少なくとも1つの別のプライマー対は、フォワードプライマーおよびリバースプライマーを含み、ここで少なくとも1つの別のプライマー対は、SNV標的の別の配列（例えば、アレル）を特異的に増幅する。

一側面において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的のそれぞれについてプライマー対を含む組成物またはキットであって、ここで、各プライマー対は、プライマーにおいてSNV標的の1つのアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異的に増幅するものが提供される。 10

【 0 0 1 6 】

本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的のそれぞれについての別のプライマー対をさらに含む。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31または32のSNVの情報提供的標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、35、34、33、32、31または30未満のSNVの情報提供的標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的是、25未満のSNVの情報提供的標的である。 20

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも6つのSNVの情報提供的標的のそれぞれについての別のプライマー対もまた、プライマーにおいてSNV標的の別のアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチも含むが、SNV標的の1つのアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する。 30

【 0 0 1 7 】

一側面において、少なくとも18のSNV標的のそれぞれについてのプライマー対を含む組成物またはキットであって、ここで各プライマー対は、プライマーにおいてSNV標的の1つのアレルに対して3'末端から2番目のミスマッチを含むが、SNV標的の別のアレルに対して3'二重ミスマッチを含み、SNV標的の1つのアレルを特異的に増幅するものが提供される。

本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、組成物またはキットは、SNV標的の別のアレルを特異的に増幅する少なくとも18のSNV標的のそれぞれについての別のプライマー対をさらに含む。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、少なくとも21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、71、75、80、85、90、または95のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、100、99、98、97、96、95、94、93、92、91または90未満のSNV標的である。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的は、85、80または75未満のSNV標的である。 40

【 0 0 1 8 】

本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか1つの一態様において、少なくとも18のSNV標的のそれぞれについての別のプライマー対もまた、プライマーに

おいて S N V 標的の別のアレルに対して 3' 末端から 2 番目のミスマッチを含むが、 S N V 標的の 1 つのアレルに対して 3' 二重ミスマッチを含み、 S N V 標的の別のアレルを特異的に増幅する。

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

【 0 0 1 9 】

10

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

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、試料は移植レシピエントからのものである。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、試料は妊娠した対象からのものである。

本明細書で提供される組成物またはキットのいずれか 1 つの一態様において、組成物またはキットは、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つにおいて使用される。

【 0 0 2 0 】

20

一側面において、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つに基づいて非天然核酸の量を得ること、およびレベルまたは量に基づいて対象におけるリスクを評価することを含む方法が提供される。

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、評価されたリスクに基づいて、処置または処置または無処置についての情報が対象に選択または提供される。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法は、経時的に対象における非天然核酸の量をモニタリングすることまたはモニタリングすることを示唆することをさらに含む。提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、処置は抗拒反応療法である。

【 0 0 2 1 】

30

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、方法は、結果に基づいて非天然核酸の量を評価することをさらに含む。提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、結果は情報提供的な結果である。提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、選択された情報提供的な結果が平均化される。

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、 P C R 定量アッセイなどの増幅に基づく定量アッセイの情報提供的な結果は、非天然核酸および / または天然核酸の遺伝子型に基づいて選択される。

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、リスクは移植に関連するリスクである。提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、移植に関連するリスクは、移植拒絶反応のリスク、移植の解剖学的問題、または移植に対する損傷である。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、移植に対する損傷は、初期または進行中の損傷である。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、移植に関連するリスクは、損傷の重篤度を示すことができるものである。

【 0 0 2 2 】

40

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、リスクは胎児状態に関連するリスクである。

提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、胎児状態のリスクに関連するものを除いて、非天然核酸の量が閾値よりも大きい場合、リスクが増大する。提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、胎児状態のリスクに関するものを除いて、非天然核酸の量が閾値未満である場合、リスクが低下する。胎児状態のリスクに関する態様のいずれか

50

1つにおいて、非天然核酸の量が閾値未満である場合、リスクが増大する。胎児状態のリスクに関する態様のいずれか1つにおいて、非天然核酸の量が閾値よりも大きい場合、リスクは低下する。

【0023】

提供される方法のいずれか1つの一態様において、リスクが心臓移植拒絶反応に関連するリスクである場合、閾値は1%、1.3%、1.5%または2%である。提供される方法のいずれか1つの一態様において、リスクが心臓移植拒絶反応に関連するリスクである場合、閾値は1.3%である。提供される方法のいずれか1つの一態様において、試料は、対象から心臓移植の10日以内に得るか、または得たものである。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、リスクが胎児状態に関連する場合、閾値は0～10%である。提供される方法のいずれか1つの一態様において、閾値は、少なくとも10週の妊娠期間の胎児の状態に関連する。

【0024】

提供される方法のいずれか1つの一態様において、情報提供的な非天然核酸レベルは、天然核酸であると決定されたレベルおよび／またはコールなしもしくは誤ったコールを表すレベルを除去することにより、得られる。

提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、コールなしまたは誤ったコールを表すレベルを除去することを含む。

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

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

【0025】

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

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

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

【図面の簡単な説明】

【0026】

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

【図2】図2は、例示的な增幅トレースを提供する。

【図3】図3は、再構成実験からの結果を示す。

【図4】図4は、移植レシピエント患者からの血漿試料で測定した無細胞DNAのパーセントを提供する。すべてのデータは、生検を受けた患者からのものである。濃い点は拒絶反応を意味する。

【図5】図5は、血漿試料についての本明細書に提供される方法からのさらなるデータを提供する。移植手術後、ドナーのパーセントレベルは低下する。

【0027】

10

20

30

40

50

【図 6】図 6 は、期待値最大化を用いた、未知の場合の非天然ドナー遺伝子型の予測を示す。破線 = 最初の反復、実線 = 2 回目の反復、最終コール = 10 %。

【図 7】図 7 は、期待値最大化を用いた、未知の場合の非天然ドナー遺伝子型の予測を示す。最終コール = 5 %。

【図 8】図 8 は、未知の場合の非天然ドナー遺伝子型を予測する能力を実証する、再構成実験データを提供する。データは、95 個の S N V 標的のセットを用いて生成されている。

【図 9】図 9 は、104 個の M O M A 標的の平均バックグラウンドノイズを提供する。

【図 10】図 10 は、M O M A を使用する方法のバックグラウンドノイズのさらなる例を提供する。

【0028】

【図 11】図 11 は、E M 法のさらなる例を提供する。

【図 12】図 12 は、E M 法のさらなる例を提供する。

【図 13】図 13 は、陽性対照 (P T C) のサンプルランの例を提供する。

【図 14】図 14 は、陽性対照 (P T C) の 17 回のサンプルランの例を示す。

【図 15】図 15 は、標的の数が変化したときに異なる試料にわたってコールされたドナーのパーセントを示す。

【図 16】図 16 は、移植脈管障害を有する (n = 12) および有しない (n = 104) 移植対象に関する例示的な M O M A アッセイからの結果を提供する。

【図 17】図 17 は、いくつかの態様が動作することができるコンピュータシステムの例を示す。

【0029】

発明の詳細な説明

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

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

【0030】

本明細書において提供されるのは、配列同一性の違いを有する核酸を測定するために使用することができる、方法および組成物である。いくつかの態様において、配列同一性の違いは、一塩基バリアント（S N V）である；しかしながら、S N V が本明細書で指すされる場合はいつも、天然核酸と非天然核酸の間の配列同一性のいかなる違いも、適用可能であることが意図される。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか 1 つは、配列同一性に違いがある場合に、天然核酸 v s 非天然核酸に適用することができる。本明細書で使用する場合、「一塩基バリアント」は、単一ヌクレオチド（single nucleotide）において配列可変性がその中に存在する、核酸配列を指す。いくつかの態様において、S N V は両アレル（両アレル）S N V であり、S N V について 1 つのメジャーなアレルおよび 1 つのマイナーなアレルが存在することを意味する。いくつかの態様において、S N V は、集団内などに 2 つより多くのアレルを有し得る。いくつかの態様におい

10

20

30

40

50

て、SNVは配列の突然変異バージョンであり、非天然核酸は突然変異バージョンを指し、一方天然核酸は非突然変異バージョン（野生型など）を指す。かかるSNVはこのように対象内で起こりうる突然変異であることができ、これは疾患または状態に関連し得る。一般に「マイナーなアレル」は、遺伝子座について、集団などにおいて頻度が少ないアレルを指し、一方「メジャーなアレル」は、集団などにおいてより頻度が高いアレルを指す。本明細書で提供される方法および組成物は、核酸の混合物内のメジャーおよびマイナーなアレルの核酸を、いくつかの態様において低レベルで存在する場合であっても、定量することができる。

【0031】

SNVなどの、配列同一性に可変性が存在する核酸配列は、一般に「標的」と呼ばれる。本明細書で使用する場合、「SNV標的」は、個体の集団などにおける、または対象において起こり得て疾患または状態に関連し得る突然変異の結果として生じる、单一スクレオチドなどにおいて配列可変性が存在するところの核酸配列を指す。SNV標的は1つより多くのアレルを有し、好ましい態様において、SNV標的は両アレルである。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、SNV標的は、一塩基多型(SNP)標的である。これらの態様のいくつかにおいて、SNP標的は両アレルである。非天然核酸は、極めて低いレベルであっても、PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイをSNV標的に特異的なプライマーを用いて実施することにより、定量可能であることが発見されている。いくつかの態様において、非天然核酸の量は、定量的PCRアッセイなどの増幅に基づく定量アッセイを、複数のSNV標的についてのプライマーを用いて実施することにより、決定される。

10

【0032】

「複数のSNV標的」は、各標的に対して少なくとも2つのアレルが存在する、1より多くのSNV標的を指す。好ましくは、いくつかの態様において、各SNV標的は両アレルであると予想され、SNV標的の各アレルに特異的なプライマー対を使用して、各アレルの核酸を特異的に増幅し、ここで増幅は、特異的アレルの核酸が試料中に存在する場合に起こる。いくつかの態様において、複数のSNV標的は、対象内の複数の配列であって、突然変異することができ、そのように突然変異した場合に、対象の疾患または状態を示すことができるものである。本明細書で使用する場合、1つのアレルは標的配列の突然変異型であってよく、別のアレルは配列の非突然変異型である。

20

【0033】

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

30

40

50

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、15～20、15～25または15～30の情報提供的標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、17～20、17～25または17～30の情報提供的標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、20～25または20～30の情報提供的標的についてのプライマー対を用いて実施される。

【0034】

本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つの態様において、SNV標的についてのプライマー対は、SNV標的が情報提供的であるという知識に基づいて、遺伝子型の知識を用いるなどして予め選択され得る。しかしながら、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つの別の態様において、パーセンテージが情報提供的である可能性について、SNV標的についてのプライマー対が選択される。かかる態様において、より多くの数のSNV標的についてのプライマー対が、パーセンテージが情報提供的である確率に基づいて使用される。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、情報提供的な結果は、少なくとも18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93または96の標的についてのプライマー対を用いて得られる。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、100、99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、87、84、81、78、75、72、69未満の標的またはこれより少ない標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、18～30、18～45、18～60、18～75、18～80、18～85、18～90、18～95または18～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、21～30、21～45、21～60、21～75、21～80、21～85、21～90、21～95または21～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、24～30、24～45、24～60、24～75、24～80、24～85、24～90、24～95または24～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、30～45、30～60、30～75、30～80、30～85、30～90、30～95または30～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、40～45、40～60、40～75、40～80、40～85、40～90、40～95または40～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、45～60、45～75、45～80、45～85、45～90、45～95または45～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、定量的アッセイは、50～60、50～75、50～80、50～85、50～90、50～95または50～100の標的についてのプライマー対を用いて実施される。提供される方法または組成物のいずれか1つについて、方法または組成物は、前述の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つに向けられ得る。

【0035】

本明細書で使用する場合、「情報提供的なSNV標的」とは、本明細書で提供されるプライマーによる增幅が生じ、その結果が情報提供的であるものである。本明細書で提供される「情報提供的な結果」とは、試料中の非天然核酸および/または天然核酸のレベルを定量するために使用することができる結果である。いくつかの態様において、情報提供的

10

20

30

40

50

な結果は、天然核酸が特定の S N V 標的についてヘテロ接合性である場合の結果および、「コールなし」または誤ったコール結果を除外する。情報提供的な結果からアレルのパーセントを、標準曲線を使用し、提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において算出することができる。提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、非天然核酸および / または天然核酸の量は、それぞれ、非天然核酸および / または天然核酸の情報提供的な結果にわたる平均値を表す。

【 0 0 3 6 】

非天然核酸の量またはレベル（例えば、比率またはパーセンテージ）は、天然および / または非天然核酸のメジャーおよびマイナーなアレルの量ならびに遺伝子型を用いて、決定することができる。例えば、天然核酸が特定の S N V 標的についてヘテロ接合性である場合の結果は、天然の遺伝子型の知識を用いて除外することができる。さらに、結果を、非天然の遺伝子型の知識を用いて評価することもできる。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、天然核酸の遺伝子型は既知であるが非天然核酸の遺伝子型は知られていない場合、方法は、可能性のある非天然の遺伝子型を予測すること、または非天然の遺伝子型をシーケンシングによって決定すること、のステップを含む。かかる方法のさらなる詳細は、例えば、P C T 公報番号 WO2016/176662 に見出され得、かかる方法は参照によって本明細書中に取り込まれる。本明細書に提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、アレルは、対象の天然核酸および / または対象に天然にはない核酸（例えば、それぞれレシピエントおよびドナーのもの）の以前の遺伝子型決定に基づき、決定することができる。遺伝子型決定のための方法は、当技術分野において知られている。かかる方法には、次世代、ハイブリダイゼーション、マイクロアレイなどのシーケンシング、他の分離技術または P C R アッセイを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、かかる遺伝子型を得るステップを含むことができる。

10

【 0 0 3 7 】

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

20

【 0 0 3 8 】

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

30

【 0 0 3 9 】

いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、対象由来の 1 つ以上の試料中の全無細胞 D N A などの核酸の全量を決定または取得するステップを含み得る。したがって、本明細書で提供されるレポートのいずれか 1 つ以上もまた、全無細胞 D N A などの全核酸の 1 つ以上の量を含み得、それは、非天然核酸および全核酸の量の組

40

50

合せであり、それはレポートにあり、それにより、臨床医が対象の処置の必要性または対象のモニタリングの必要性を評価し得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの好ましい態様において、核酸の全量は、本明細書で提供されるMOMAアッセイによって決定され、MOMAアッセイによって決定されるような天然のおよび非天然の核酸カウントの尺度であり、好ましくは、情報提供的標的からのものである。いくつかの態様において、核酸の全量は、本明細書で提供されるMOMAアッセイまたは当業者に公知の他のアッセイであるが、本明細書で提供されるMOMAアッセイではない任意の方法によって決定される。

【0040】

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

【0041】

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

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

【0042】

本明細書に記載のプライマー対は、多重PCRアッセイに使用され得ることが理解されるべきである。したがって、本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つのいくつかの態様において、プライマー対は、PCR反応において他のプライマー対と適合す

10

20

30

40

50

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

【0043】

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

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

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

【0044】

複数プローブの使用は、單一プローブリアルタイムP C Rの能力を拡大することができる。多重リアルタイムP C Rは、各アッセイが固有の蛍光色素で標識された特異的プローブを有し得、各アッセイについて異なる観察色をもたらす、複数のプローブに基づくアッセイを使用する。リアルタイムP C R装置は、異なる色素から生成される蛍光を区別することができる。異なるプローブは、それぞれ固有の発光スペクトルを有する異なる色素で標識することができる。スペクトル信号は、離散光学系で収集され、一連のフィルタセットを通して、検出器のアレイによって収集される。色素間のスペクトルの重なりの補正是、純粋な色素スペクトルを用いて行列代数により実験データをデコンボリューションすることにより、実施することができる。

プローブは、本開示の方法、特に定量化ステップを含む方法のために有用であり得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、P C Rアッセイの実施におけるプローブの

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

【0045】

一例として、TAQMAN(商標)プローブは、5'末端にFAM(商標)またはVIC(登録商標)色素標識を有し、3'末端にマイナーグループバインダー(MGB)非蛍光クエンチャー(NFQ)を有する、加水分解プローブである。TAQMAN(商標)プローブの原理は、一般に、相補的なプローブ結合領域へのハイブリダイゼーション中に二重標識TAQMAN(商標)プローブを切断するための、TAQMAN(商標)ポリメラーゼの5'-3'エキソヌクレアーゼ活性、およびフルオロフォアに基づく検出に依存する。TAQMAN(商標)プローブは、定量的PCR反応の指数関数的段階の間に、定量的測定における検出の特異性を高めることができる。10

PCRシステムは一般に、蛍光色素またはレポーターの検出および定量に依存し、そのシグナルは反応におけるPCR産物の量に正比例して増加する。例えば、最も簡単で最も経済的な形式においては、そのレポーターは、二本鎖DNA特異的色素SYBR(登録商標)Green(Molecular Probes)であることができる。SYBR Greenは、二本鎖DNAのマイナーグループに結合する色素である。SYBR Green色素が二本鎖DNAに結合すると、蛍光強度が増加する。より多くの二本鎖アンプリコンが産生されると、SYBR Green色素シグナルが増加する。20

【0046】

本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、PCRはデジタルPCRであってもよい。デジタルPCRは、希釈された增幅産物を複数の個別試験部位に分割して、ほとんどの個別試験部位が、ゼロまたは1つの增幅産物を含むようにすることを含む。次いで增幅産物を分析して、試料中の選択された関心対象のゲノム領域の頻度の表示を提供する。個別試験部位ごとに1つの增幅産物を分析すると、各個別試験部位について2値の「イエスまたはノー」の結果が得られ、選択された関心のあるゲノム領域が定量化され、選択された関心のあるゲノム領域の相互の頻度が決定される。ある側面において、これに加えて、または代替として、複数の分析を、所定の領域からのゲノム領域に対応する増幅産物を使用して行うことができる。2つ以上の所定の領域の分析結果を用いて、増幅産物の数の相対的な頻度を定量し、決定することができる。2つ以上の所定の領域を使用して試料中の頻度を決定することにより、単一の検出アッセイによっては容易には明らかにされない、増幅効率の変動などを介したバイアスの可能性が低減される。デジタルPCRを使用してDNAを定量する方法は、当技術分野で知られており、例えば米国特許公開番号US20140242582に記載されている。30

【0047】

本明細書で提供されるPCR条件は、本明細書に記載の方法のいずれか1つに従って機能するように、改変または最適化できることが、理解されるべきである。典型的には、PCR条件は、使用する酵素、標的錆型、および/またはプライマーに基づく。いくつかの態様において、PCR反応の1つ以上の成分が改変または最適化される。最適化され得るPCR反応の成分の非限定的な例としては、錆型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)、デオキシリボヌクレオチド(dNTP)、ポリメラーゼ、マグネシウム濃度、緩衝液、プローブ(例えば、リアルタイムPCRを実施する場合)、緩衝液、および反応容積を含む。40

【0048】

前述の態様のいずれにおいても、任意のDNAポリメラーゼ(DNAヌクレオチドのDNA鎖への重合を触媒する酵素)を利用ることができ、これには熱安定性ポリメラーゼを含む。適切なポリメラーゼ酵素は当業者に知られており、以下を含む:大腸菌DNAポ50

リメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T7 DNAポリメラーゼ、T4 DNAポリメラーゼ、T5 DNAポリメラーゼ、クレノウクラスのポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Pfu DNAポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、バクテリオファージ29、REDTaq(商標)ゲノムDNAポリメラーゼ、またはシークエナーゼ。例示的なポリメラーゼとしては、限定はされないが、以下を含む：Bacillus stearothermophilus pol I、Thermus aquaticus(Taq)pol I、Pyrococcus furiosus(Pfu)、Pyrococcus woesei(Pwo)、Thermus flavus(Tfl)、Thermus thermophilus(Tth)、Thermus litoris(Tli)およびThermotoga maritime(Tma)。これらの酵素、これらの酵素の改変型、および酵素の組み合わせは、Roche、Invitrogen、Qiagen、StratageneおよびApplied Biosystemsを含む販売元から市販されている。代表的な酵素としては、以下を含む：PHUSION(登録商標)(New England Biolabs, Ipswich, MA)、Hot MasterTaq(登録商標)(Eppendorf)、PHUSION(登録商標)Mpx(Finnzymes)、PyroStart(登録商標)(Fermentas)、KOD(EMD Biosciences)、Z-Taq(TAKARA)、およびCS3AC/LA(KlenTaq, University City, MO)。

【0049】

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

【0050】

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

【0051】

いくつかの態様において、本開示に従って使用されるプライマーは、改変される。プライマーは、それらの意図された標的(例えば、特定のSNV)のみに、高い特異性で結合し、さらなるヌクレオチド配列の差異に対して高い識別を示すように設計されてよい。プライマーは、特定の算出融解温度(Tm)、例えば、46～64の範囲の融解温度を有するように、改変することができる。所望の融解温度を有するプライマーを設計するために、プライマーの長さを変えることができ、および/またはプライマーのGC含量を変えることができる。典型的には、GC含量および/またはプライマーの長さを増加させることにより、プライマーのTmが増加する。逆に、GC含量および/またはプライマーの長さを減少させると、プライマーのTmが典型的に低下する。特定のSNV(または配列非同一性の他の形態)を別のものよりも高感度で検出するために、標的に対して意図的にミスマッチ(单数または複数)を組み込むことにより、プライマーを改変できることが理解されるべきである。したがってプライマーは、それらが結合するように設計された特定の配列(例えば、特定のSNV)に関して、1つ以上のミスマッチを組み込むことにより

10

20

30

40

50

、改変され得る。

【0052】

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

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

【0053】

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

【0054】

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

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

本明細書で提供される方法および組成物は、試料中の、非天然核酸などの低レベルの核酸を検出するために使用できることが見出されている。したがって、本明細書で提供される方法は、比較的まれな核酸の検出が必要とされる試料で使用することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、全cf-DNAなどの全核酸に対して試料中で少なくとも約0.5%である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料に用いて、試料中の少なくとも1%である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約1.3%である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約1.5%である非天然核酸を検出することができる。いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか1つを試料に用いて、試料中の少なくとも約2%、3%、4%、5%または10%である非天然核酸を検出することができる。

【0055】

非天然核酸の量を、低レベルにおいても決定する能力により、本明細書で提供される方法および組成物は、対象、例えば移植レシピエントにおける、リスクを評価するために使

用することができる。本明細書で提供される「リスク」とは、対象（移植レシピエントなど）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、例えば移植拒絶反応等のかかる状態の存在または不在または進行の可能性の増加を指す。状態は、本明細書で提供される状態のいずれか1つであり得る。本明細書で提供される「増加したリスク」とは、対象における任意の望ましくない状態の存在または進行、または、かかる状態の存在または進行の可能性の増加を指す。本明細書で提供される「リスクの減少」とは、対象における任意の望ましくない状態または進行の不在、または、かかる状態の存在または進行の可能性の低下（または不在または非進行の可能性の増加）を指す。

【0056】

一例として、移植片（例えば、心臓移植片）の移植後の拒絶反応の早期検出は、処置を容易にし、臨床転帰を改善することができる。移植拒絶反応は、移植の失敗および死亡率の主な原因であり続け、一般的には、生涯にわたる監視モニタリングを必要とする。免疫抑制療法による移植拒絶反応の処置は、特に拒絶反応が早期に検出された場合に、処置の成果を改善することが示されている。移植拒絶反応は典型的には、カテーテルベースの心内膜生検（EMB）を用いてモニタリングされる。しかしこの侵襲的処置は、患者のリスクおよび不快感を伴い、小児患者にとって特に不利になり得る。したがって、本明細書において、移植レシピエントなどの対象の監視のための、感度が高く、特異的で、費用効果が高く、非侵襲的な技術が提供される。かかる技術は、初期段階での移植拒絶反応の検出を可能にすることが見出されている。かかる技術はまた、臓器回復のモニタリングおよび、抗拒反応処置または抗感染処置などの処置または療法の選択をモニタリングして、患者の回復を改善し、生存率を高めるために使用することもできる。

10

【0057】

したがって、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、対象は移植のレシピエントであり、リスクは移植に関連するリスクである。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、移植に関連するリスクは、移植拒絶反応のリスク、移植片の解剖学的問題または移植片の損傷である。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、移植片に対する損傷は、初期または進行中の損傷である。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、移植に関連するリスクは、急性状態または慢性状態である。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、急性状態は、細胞拒絶反応または抗体媒介性拒絶反応を含む、移植拒絶反応である。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、慢性状態は、移植脈管症である。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、移植に関連するリスクは、損傷の重篤度を示す。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、移植に関連するリスクは、感染のリスクまたは状態である。

20

【0058】

本明細書で使用する場合、「移植（transplant）」とは、レシピエントの損傷または欠損した臓器または組織を交換する目的での、ドナーからレシピエントへの臓器または組織の移動を指す。移植は、1つの臓器または複数の臓器であってもよい。いくつかの態様において、用語「移植片（transplant）」は、移植された1以上の臓器を指し、かかる意味は、この用語が使用される文脈から明らかであろう。移植可能な臓器の例としては、限定はされないが、心臓、腎臓（単数または複数）、腎臓、肝臓、肺（単数または複数）、脾臓、腸などが含まれる。本明細書で提供される方法または組成物のいずれか1つは、本明細書で提供されるいずれか1つ以上の臓器の移植を受けた対象からの試料に、使用されてよい。いくつかの態様において、移植は心臓移植である。

30

【0059】

移植のレシピエントにおけるリスクは例えば、非天然cf-DNAの量、例えば移植拒絶反応に関連する細胞損傷のバイオマーカーであるドナー特異的無細胞DNA（DS cf-DNA）の量を評価することによって、決定することができる。DS cf-DNAは、移植された臓器からおそらくは剥がれ落ちたDNAを指し、その配列は、移植された臓器を寄付したドナーの遺伝子型に（全体または一部が）適合するものである。本明細書で使

40

50

用する場合、D S c f - D N A は D S c f - D N A 集団における特定の配列を指してもよく、ここでこの配列はレシピエントの c f - D N A (例えれば、異なる配列を特定のヌクレオチド位置に有している) から区別され、または、D S c f - D N A は D S c f - D N A 集団全体を指してもよい。

【 0 0 6 0 】

移植のレシピエントにおけるリスクは、例えれば、本明細書に記載されているように、ドナー特異的無細胞 D N A などの非天然 c f - D N A の量を、提供される方法のいずれか 1 つを全無細胞 D N A 量の評価と組み合わせて用いて、例えれば血漿中の n g / m l で評価することにより、決定することができる。したがって、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、全無細胞 D N A のレベルを、対象において n g / m l などで得るステップを含むことができる。かかる方法はさらに、いくつかの態様において、対象における移植に関連するリスクを、対象におけるドナー特異的無細胞 D N A および全無細胞 D N A の量の組合せに基づいて、評価することを含む。対象における全無細胞 D N A を決定するための方法は、当技術分野で知られている。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、全無細胞 D N A は、R N a s e P を標的として使用する、T A Q M A N (商標) リアルタイム P C R を用いて決定される。

【 0 0 6 1 】

いくつかの態様において、本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、非天然核酸の增加および / または天然核酸と比較した非天然核酸の比率またはパーセンテージの増加を、移植拒絶反応などの状態のリスクの増加と相關させることを含むことができる。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、相關させることは、非天然核酸のレベル (例えれば、濃度、比率またはパーセンテージ) を閾値と比較して、状態のリスクが増加または低下している対象を同定することを含む。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、閾値と比較して増加した量の非天然核酸を有する対象は、状態のリスクが高いと同定される。本明細書に提供される方法のいずれか 1 つのいくつかの態様において、閾値と比較して非天然核酸の量が減少または同程度の対象は、状態のリスクが低下していると同定される。

本明細書で使用する場合、「量」とは、核酸の測定のための任意の定量値を指し、絶対量または相対量で与えることができる。さらに、量は、総量、頻度、比率、パーセンテージなどであることができる。本明細書で使用する「レベル」という用語は、「量」の代わりに使用することができるが、同じ種類の値を指すことを意図する。

【 0 0 6 2 】

本明細書で使用する場合、「閾値 (threshold) 」または「閾値 (threshold value) 」は、状態の有無またはリスクの有無を示す、任意の所定のレベルまたはレベルの範囲を指す。閾値は、様々な形態をとることができる。これは、中央値または平均値などの单一カットオフ値であることができる。これは、1 つの定義群のリスクが別の定義群のリスクの 2 倍の場合などの、比較群に基づいて設定することができる。これは範囲であることができ、例えば、試験される集団を複数の群に等しく (または不等に) 分割するか (低リスク群、中リスク群および高リスク群など) 、またはクオードラント (quadrant) に分割して、最も低い象限はリスクが最も低い対象で、最も高い象限はリスクが最も高い対象である、などである。閾値は、選択された特定の集団に依存し得る。例えれば、明らかに健康な集団は、異なる「正常」範囲を有するであろう。別の例として、閾値は、状態またはリスクの存在前または処置経過後のベースライン値から、決定することができる。かかるベースラインは、試験されているリスクまたは状態と相關していない、対象における正常状態または他の状態を示すことができる。いくつかの態様において、閾値は、試験される対象のベースライン値であることができる。したがって、選択された所定の値は、対象が属するカテゴリーを考慮に入れてよい。適切な範囲およびカテゴリーは、当業者の通常の実験を用いて選択することができる。

【 0 0 6 3 】

非天然核酸レベルの変化も、経時的にモニターすることができる。例えれば、非天然核酸

10

20

30

40

50

の量、例えば比率またはパーセンテージなどの、閾値（ベースラインなど）からの変化は、リスク、例えば移植に関連するリスクの非侵襲的臨床指標として使用することができる。これは、臨床状態における変動の測定を可能にし、および／または正常値またはベースラインレベルの算出を可能にする。臓器移植において、これは、拒絶反応またはそれに関連する状態のリスクについての、個別の非侵襲的スクリーニング検査の基礎を形成することができる。一般に、本明細書で提供されるように、非天然核酸の量、例えば比率またはパーセンテージは、状態に関連するリスク、例えばレシピエントにおける拒絶反応等の移植に関連するリスクなどの、有無を示すことができ、またはさらなる検査または監視の必要性を示すことができる。いくつかの態様において、移植レシピエントの場合、この量は、無細胞DNAの総量と組み合わせて、リスクを示す。本明細書で提供される方法のいずれか1つの一態様において、方法はさらに、移植拒絶反応、移植片損傷などの状態を評価するための、さらなる試験を含み得る。追加の1以上の試験は、本明細書に提供される方法のいずれか1つであってよい。いくつかの態様において、移植レシピエントの場合、追加の試験は、対象からの試料中の全無細胞DNA量の決定である。

【0064】

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、心臓移植レシピエントに関して、かかる閾値は1%であり、ここで1%を超えるレベルはリスクの増加を示し、1%以下のレベルはリスクの減少を示す。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、心臓移植レシピエントに関して、かかる閾値は1.3%であり、ここで1.3%を超えるレベルはリスクの増加を示し、1.3%以下のレベルはリスクの減少を示す。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、心臓移植レシピエントに関して、かかる閾値は1.5%であり、ここで1.5%を超えるレベルはリスクの増加を示し、ここで1.5%以下のレベルはリスクの減少を示す。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、心臓移植レシピエントに関して、かかる閾値は2%であり、ここで2%を超えるレベルはリスクの増加を示し、ここで2%以下のレベルはリスクの減少を示す。

【0065】

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、非天然核酸の量、例えば比率またはパーセンテージなどが閾値を上回ると決定された場合、本明細書で提供される方法のいずれか1つはさらに、対象または対象からの試料に、別の試験を実施することを含む。かかる別の試験は、例えば移植レシピエントにおいてリスクの有無を決定するのに有用であることが当業者に知られている、任意の別の試験であることができる。いくつかの態様において、別の試験は、本明細書で提供される方法のいずれか1つである。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、対象は移植レシピエントであり、別の試験は、移植レシピエントにおけるBNPおよび／またはトロポニンのレベルの決定である。本明細書で提供される方法のいずれか1つの別の態様において、BNPおよび／またはトロポニンのレベルに追加された、またはその代わりの別の試験は、心エコー検査である。

【0066】

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、対象は胎児試験の対象である。他の検査は、超音波バイオメトリックパラメータ、胎児心拍数、動脈圧、羊水レベル、腸管拡張、水症の発生、介入後の水症の解消および胎児喪失を含む胎児の健康の他の臨床的尺度を決定するものを含む。いくつかの態様において、pH、PaO₂、PaCO₂、および／または血液の乳酸塩レベルは、胎児および／または妊娠した対象において評価される。提供される方法および／または追加の試験（単数または複数）は、妊娠中の多数の時点のいずれかにおいて実施することができ、例えば、時点は、妊娠中、胎児介入時の疾患などの状態の進行中、および介入後の水症の解消時を含み得る。決定は、胎児の状態を評価するために現在使用されている他の検査の代わりに、またはそれに加えて実施され得る。非侵襲的方法など、胎児の早期リスクを検出する能力は、早期介入およびより良好な患者結果をもたらすことができる。

【0067】

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、非天然核酸の量、例えば比率またはパーセンテージなどが、移植対象などについて、1%または1.3%または1.5%または2%などの閾値未満であると決定された場合、さらなる試験は、対象に必要でないかまたは推奨されず、および/または、処置は、対象に必要でないかまたは推奨されない。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、レシピエントから得られた試料中の非天然核酸の量（例えば、比率またはパーセンテージ）が1%または1.3%または1.5%または2%より大きい場合、移植レシピエントにはリスクの増加があると決定され得るが、しかし本発明の態様はこの点に限定されないので、他の閾値を利用できることが理解されるべきである。いくつかの態様において、方法はさらに、対象に対してさらなる試験、またはさらなる試験を推奨すること、および/または対象を処置すること、または処置を示唆すること、を含み得る。これらの態様のいくつかにおいて、さらなる試験は、本明細書で提供される方法のいずれか1つである。

これらの態様のいくつかにおいて、処置は抗拒反応処置または抗感染処置である。いくつかの態様において、情報は書面または電子形式で提供される。いくつかの態様において、情報は、コンピュータで読むことができる使用説明書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る。

【0068】

抗拒反応療法には、例えば、免疫抑制剤の移植レシピエントへの投与が含まれる。免疫抑制剤としては、限定はされないが、以下を含む：コルチコステロイド（例えばプレドニゾロンまたはヒドロコルチゾン）、グルココルチコイド、細胞分裂停止剤（cytostatics）、アルキル化剤（ナイトロジエンマスター（シクロホスファミド）、ニトロソ尿素、白金化合物、シクロホスファミド（Cytoxan））、代謝拮抗物質（例えば、メトトレキセートなどの葉酸類似体、アザチオプリンおよびメルカブトプリンなどのプリン類似体、ピリミジン類似体、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Thymoglobuline）、イムノフィリンに作用する薬物、シクロスボリン、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、ミコフェノラート、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、抗拒反応療法は、血液輸送（blood transfer）または骨髄移植を含む。療法はまた、敗血症などの全身状態を処置するための療法を含むこともできる。敗血症の治療には、静脈内液剤、抗生物質、外科的排液、早期目標指向療法（EGDT）、昇圧剤、ステロイド、活性化プロテインC、ドロトレコシン（活性化）、酸素および臓器機能不全に対する適切な支援が含まれる。これには、腎不全の血液透析、肺機能障害の機械的換気、血液製剤の輸血、および循環不全のための薬物および体液治療が含まれ得る。適切な栄養の確保、好ましくは経腸栄養によるが、必要に応じて非経口栄養による確保は、特に長期の病気の際に含めることができる。他の関連する療法には、深部静脈血栓症および胃潰瘍を予防するためのインスリンおよび薬物療法を含むことができる。

【0069】

いくつかの態様において、ここで感染が示され、移植のレシピエントを処置するための療法は、細菌、真菌および/またはウイルス感染を処置するための療法も含み得る。かかる療法は抗生物質を含む。他の例は、除草剤、アミノグリコシド、駆虫剤、抗真菌剤、アゾール抗真菌剤、エキノカンジン、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、ストレプトミセス誘導体、抗ウイルス剤、ケモカイン受容体アンタゴニスト、インテグラーゼ鎖転移阻害剤、ノイラミニダーゼ阻害剤、NNRTI、NS5A阻害剤、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（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、セファロスボリン、グリシルサイクリン、抗らい菌薬、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

10

20

30

40

50

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を含むが、これらに限定されない。他のかかる療法は、当業者に公知である。本明細書で提供される方法のいずれか 1 つは、対象への抗感染処置を投与または示唆すること（いくつかの態様において、対象に処置に関する情報を提供することを含む）を含み得る。いくつかの態様において、抗感染処置は、免疫抑制療法における量または頻度の減少、または対象に投与される免疫抑制療法の変化であり得る。他の療法は当業者に公知である。

【 0 0 7 0 】

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

本明細書で提供されるアプローチは、母体試料中の胎児起源の無細胞 D N A の検出および定量を含む。母体血液中の c f - D N A の割合（またはパーセントまたは比率）は、胎児の健康の関数として変化し、胎児の健康を評価するためのベースライン値などの閾値と比較され得ることが見出されている。胎児は、例えば、解剖学的、代謝、または胎児水腫、損傷した新生児、未熟児または自発的に終結した妊娠をもたらし得る母体環境の問題から苦痛を受ける間、細胞傷害を受け得る。胎児の状態は、胃腸炎、胎児性心臓不整脈、先天性肺腺腫様奇形、半葉全前脳胞症、胎児左心症候群、先天性欠損（神経、心臓およびその他）、低代謝率、胎児死亡および双子 - 双子輸血症候群を含む。提供される技術は、绒毛膜炎、早産、胎児心臓不整脈（胎児水腫および子宮衰弱のリスク増加に関連する）、（通常、全身紅斑性（ S L E ）などの母体のコラーゲン血管疾患にほとんど由来する様々な原因から生じ得る）胎児徐脈、大型先天性肺腺腫様奇形（ C P A M ）などのさらに他の状態において胎児妥協を検出するために、より広い適用性を有することができる。

【 0 0 7 1 】

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

【 0 0 7 2 】

提供される方法は、胎児が本明細書で提供される状態のいずれか 1 つを有するか有すると疑われる任意の妊娠をモニタリングするために使用することができる。例えば、全 c f - D N A または非胎児特異的 c f - D N A などに対して、 c f - D N A などの胎児特異的核酸のパーセンテージ、フラクション、または比率などのレベルまたは量は、本明細書中で提供される方法のいずれか 1 つを使用することによって決定され得る。提供される方法のいずれか 1 つは、母体重量および／または在胎齢に基づいて結果を修正するステップを含み得ることも理解されるべきである。したがって、本明細書で提供される方法は、妊娠および／または疾患の進行中のいくつかの時点にわたる胎児の健康を同定および／またはモニタリングするために使用することができる。かかるモニタリングは、胎児の介入後に

10

20

30

40

50

も生じ得る。

【 0 0 7 3 】

したがって、提供される方法は、子宮内成長制限および母性血管疾患を含む低リスク妊娠ならびに高リスク妊娠をモニタリングするために使用することができる。「低リスク妊娠」は、臨床医がかかる合併症（単数または複数）に関連する1つ以上の合併症または状態のリスクが低いと考える任意の妊娠を指す。「高リスク妊娠」は、臨床医がかかる合併症（単数または複数）に関連する1つ以上の合併症または状態のリスクがあると考える任意の妊娠を指すことを意味する。例えば、母親、赤ん坊、またはその両方に影響を及ぼす可能性のある合併症がある場合、妊娠は高リスクと考えられ得る。妊娠が高リスクであると示され得るさらなる例は、健康上の問題が存在する妊娠（例えば、糖尿病、がん、高血圧、腎臓疾患（例えば、慢性腎孟腎炎、慢性腎孟腎炎および腎不全）、てんかん）を含む。母親がアルコールまたは違法薬物を使用、または喫煙する場合、母親が17歳未満または35歳超である場合、母親が複数の妊娠歴がある場合、母親が以前の流産の病歴がある場合、または、胎児がダウン症候群、心臓、肺または腎臓の問題などの遺伝的状態を有することが見出されている場合、妊娠もまた高リスクと考えられ得る。高リスク妊娠は、以前に妊娠に問題（例えば、早産、子癇前症または発作（子癇））があった人または現に妊娠に問題（例えば、早産、子癇前症または発作（子癇））を有する人、感染（例えば、HIV、C型肝炎、サイトメガロウイルス（CMV）、水痘、風疹、トキソプラズマ症、または梅毒）を有する人、所定の薬物（例えば、リチウム、フェニトイン（Dilantinなど）、バルプロ酸（Depakene）、またはカルバマゼピン（Tegretolなど））を服用している人も含む。妊娠中の女性が所定の健康上の問題（例えば、心臓弁の問題、高血圧、鎌状赤血球症、喘息、狼瘡、または関節リウマチ）を有する妊娠も、高リスクと考えられ得る。高リスク妊娠の他の臨床指標は、当業者に知られている。

10

【 0 0 7 4 】

本明細書で使用する場合、かかる対象の「ベースラインレベル」は、対象（例えば、妊娠中の女性または胎児）が、健康であったか健康であると考えられていた、本明細書で提供される状態を有していないかったか同状態を有すると考えられていなかった、または、本明細書で提供される状態を有していたか同状態を有すると考えられていたが、状態が処置または介入を必要としない段階にあったかあると考えられていた時間以前に、またはその時間にその後の試料に採取された対象由来の試料から胎児特異的 cf - DNAなどの胎児特異的核酸の量（全 cf - DNAまたは非特異的 cf - DNAに対する胎児特異的 cf - DNAのパーセントまたは比率など）を含み得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、ベースラインに対する変化の減少は、胎児の健康の指標となり得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、2つ以上の時点でのベースラインとの差の変化は、胎児の健康の指標となり得る。したがって、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、胎児特異的 cf - DNAの量は、1つ以上の時点で決定され、1つ以上のベースライン値に対する増加または減少が決定される。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、胎児特異的核酸の量は2つ以上の時点で決定され、1つ以上のベースライン値に対する差の変化が決定される。本明細書で提供される方法のいずれかにおいて、方法は、特定の核酸の定量を補助するために、内部標準で既知の量でスパイクするステップをさらに含み得る。胎児の健康を評価するための本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、妊娠の少なくとも10週間で10%未満である、cf - DNAなどの胎児特異的核酸のフラクションなどの量は、リスクの増加を示すことができるものである。

20

【 0 0 7 5 】

提供される方法のいずれか1つは、ベースラインなどの閾値に対する量の決定またはベースラインなどの閾値に対する量の変化の決定などの決定された量に基づいて、療法または処置を対象に提供するステップまたは療法または処置に関する情報を対象に提供するステップを含み得る。いくつかの態様において、情報は、情報を含む書面を含む。書面は、書面による情報を電子形式で含み得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つにおい

30

40

50

て、方法は、対象への治療の投与、対象への治療の情報の提供または対象への治療の示唆を記録することをさらに含み得る。治療は、本明細書で提供される療法または処置のいずれか1つであり得るか、または当業者に知られている。代替的に、量に基づいて変化なしまたは治療なしまたは処置なしを決定および示唆してもよく、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、かかる情報を対象に提供するステップを含み得る。

【0076】

したがって、妊娠している対象にとって、本明細書で提供される方法のいずれか1つは、妊娠中の女性の子宮内死が生じる前に、胎児の介入（例えば、外科的処置、薬物の投与）または出産を実施または推奨するステップをさらに含み得る。いくつかの態様において、推奨は、妊娠中の女性への胎児介入および／または出産オプションなどの示唆された処置に関する情報を提供することを含む。情報は口頭で提供され得る。

さらに他の態様において、方法のいずれか1つを使用して治療（または処置）の有効性を評価することができ、ここで、改善された値は治療の必要性をより少なく示し得るが、値の悪化は療法、異なる療法または増加した量の療法の必要性を示し得る。本明細書で提供される方法のいずれか1つは、1つ以上の時点での1つ以上の比較の結果に基づいて治療の必要性または用量を評価するステップを含み得る。

【0077】

臨床医が本明細書で提供される値（単数または複数）を含むレポートを有することは特に有用であり得る。したがって、一側面において、かかるレポートが提供される。レポートは、視覚化または表示することができる形式など、口頭、書面（またはハードコピー）または電子形式でなされ得る。いくつかの態様において、本明細書で提供されるそれぞれのアッセイの「生の」結果はレポートで提供され、このレポートから、全核酸（全無細胞DNAなど）および非天然核酸（ドナー特異的無細胞DNAなど）の量（単数または複数）を分析するためにさらなるステップがなされ得る。他の態様において、レポートは、全核酸（全無細胞DNAなど）および非天然核酸（ドナー特異的無細胞DNAなど）の量について複数の値を提供する。いくつかの態様において、臨床医は、対象の処置の必要性、または対象を経時的にモニタリングする必要性を量から評価することができる。

【0078】

したがって、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて、方法は、対象における全核酸（全無細胞DNAなど）および非天然核酸（ドナー特異的無細胞DNAなど）の量を別の時点（単数または複数）で評価することを含み得る。かかる評価は、本明細書で提供される方法のいずれか1つを用いて実施され得る。

無細胞核酸を決定するための方法は、本明細書で提供されるか、または当該技術分野において知られている。さらなる例として、リアルタイムPCRを使用して全核酸（全無細胞DNAなど）の量を決定することができる。例えば、本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、全核酸（全無細胞DNAなど）は、標的としてRNAse Pを使用するTAQMAN（商標）リアルタイムPCRで決定される。他の方法は、当業者には明らかであろう。

【0079】

本明細書で提供される方法のいずれか1つは、例えば移植のレシピエントなどの対象から得られた試料から、例えば無細胞DNAなどの核酸を抽出することを含み得る。かかる抽出は、当技術分野で知られている任意の方法または本明細書に提供される他の方法を用いて行うことができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology、最新版またはQIAamp循環核酸キットまたは他の適切な市販キットを参照）。無細胞DNAを血液から単離するための例示的な方法は、記載されている。EDTAまたはDTAなどの抗凝固剤を含有する血液を、対象から採取する。cf-DNAを含む血漿を、血液中に存在する細胞から分離する（例えば、遠心分離または濾過によって）。所望の二次分離を行って、任意の残存する細胞を血漿から除去することができる（例えば、第2の遠心分離または濾過ステップ）。その後cf-DNAを、当分野で知られている任意の方法、例えばQiag enにより製造されたものなどの市販のキットを用いて、抽出することができる。cf-D

10

20

30

40

50

NAを抽出するための他の例示的な方法も、当技術分野で知られている（例えば、Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock. Clin. Chem. 2008, v. 54, p. 1000-1007 ; Prediction of MYCN Amplification in Neuroblastoma Using Serum DNA and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. JCO 2005, v. 23, p.5205-5210 ; Circulating Nucleic Acids in Blood of Healthy Male and Female Donors. Clin. Chem. 2005, v. 51, p.1317-1319 ; Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction: Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics. Clin. Chem. 2003, v. 49, p. 1953-1955 ; Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YM D. 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）。
10

【0080】

本明細書で使用する場合、対象からの試料は、生物学的試料であり得る。かかる生物学的試料の例には、全血、血漿、血清、尿などが含まれる。本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、さらなる核酸、例えば標準の、試料への添加が行われ得る。

本明細書で提供される方法のいずれか1つのいくつかの態様において、増幅前ステップが実施される。例示的なかかる増幅方法は以下の通りであり、かかる方法は、本明細書で提供される方法のいずれか1つに含めることができる。約15ngの無細胞血漿DNAを、約100個の標的とQ5 DNAポリメラーゼを用いてPCRで増幅する；ここでプールされたプライマーは合計で6μMであった。試料を、約35サイクルに供する。反応は合計で25μlである。増幅後、試料は、AMPUREビーズクリーンアップ、ビーズ精製、または簡単にExoSAP-IT（商標）もしくはZymoを含む、いくつかのアプローチを用いて洗浄することができる。
20

【0081】

本開示はまた、本明細書で提供される方法のいずれか1つにおいて使用するための複数のSNV標的を決定する方法、またはプライマーの組成物のいずれか1つを誘導できる方法を提供する。複数のSNV標的を決定する方法は、いくつかの態様において、a) 複数の高度にヘテロ接合性のSNVを個体の集団において同定すること、b) 各SNVにわたる1以上のプライマーを設計すること、c) 十分に特異的なプライマーを選択すること、d) プライマーの多重化能力を、共通の融解温度および/または共通の溶液中において評価すること、およびe) プライマーまたはそのサブセットで均一に増幅された配列を同定すること、を含む。
30

本明細書で使用する場合、「高度にヘテロ接合性のSNV」とは、集団において十分に高いパーセンテージのマイナーなアレルを有するものである。いくつかの態様において、マイナーなアレルは、集団において少なくとも25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%または35%またはそれ以上である。これらの態様のいずれか1つにおいて、マイナーなアレルは、集団において50%、49%、45%、44%、43%、42%、41%、または40%未満である。かかるSNVは、天然核酸と非天然核酸との間で異なる標的を提供する可能性を増加させる。
40

【0082】

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

本明細書で使用する場合、「十分に特異的なプライマー」とは、意図されたアレルの增
50

幅の、意図されていないアレルの増幅に対する識別を実証したものであった。したがって P C R では、2つの増幅の間にサイクルギャップが必要であり得る。一態様において、サイクルギャップは、少なくとも 5、6、7 または 8 サイクルのギャップであり得る。

【 0 0 8 3 】

さらに、配列は融解温度に基づいて選択され、一般に 45 ~ 55 の間の融解温度を有する配列が「中程度範囲の配列」として選択され得る。他の温度範囲が所望されてもよく、当業者によって決定することができる。「中程度範囲の配列」とは一般に、温度内の多重増幅形式で増幅され得るものである。いくつかの態様において、g c % 含量は 30 ~ 70 % または 35 % ~ 65 %、例えば 33 ~ 66 % であり得る。

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

【 0 0 8 4 】

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

【 0 0 8 5 】

方法、組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、情報提供的標的などの S N V 標的のそれについて少なくとも 2 つのプライマー対がある。本明細書で提供される方法、組成物またはキットのいずれか 1 つは、S N V 標的の数のいずれか 1 つにしたがって、本明細書で提供される情報提供的標的を含む S N V 標的のそれについて少なくとも 2 つのプライマー対を含み得る。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つにおいて、複数の S N V 標的是、少なくとも 6 つの情報提供的な S N V 標的である。提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的是、少なくとも 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または 32 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24 または 23 未満の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、6 ~ 10、6 ~ 15、6 ~ 20、6 ~ 25 または 6 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、7 ~ 10、7 ~ 15、7 ~ 20、7 ~ 25 または 7 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか 1 つのいくつかの態様において、複数の S N V 標的は、8 ~ 10、8 ~ 15、8 ~ 20、8 ~ 25 または 8 ~ 30 の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物または

10

20

30

40

50

キットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、10～15、10～20、10～25または10～30の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、15～20、15～25または15～30の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は17～20、17～25または17～30の情報提供的標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、20～25または20～30の情報提供的標的である。

【0086】

本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つの態様において、複数のSNV標的は、少なくとも18、21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60、63、66、69、72、75、78、81、84、87、90、93または96の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、100、99、98、97～96、95、94、93、92、91、90、87、84、81、78、75、72または69未満の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、18～30、18～45、18～60、18～75、18～80、18～85、18～90、18～95または18～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、21～30、21～45、21～60、21～75、21～80、21～85、21～90、21～95または21～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、24～30、24～45、24～60、24～75、24～80、24～85、24～90、24～95または24～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、30～45、30～60、30～75、30～80、30～85、30～90、30～95または30～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、40～45、40～60、40～75、40～80、40～85、40～90、40～95または40～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、45～60、45～75、45～80、45～85、45～90、45～95または45～100の標的である。本明細書で提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つのいくつかの態様において、複数のSNV標的は、50～60、50～75、50～80、50～85、50～90、50～95または50～100の標的である。提供される方法または組成物またはキットのいずれか1つについて、方法または組成物またはキットは、前述の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つに向けられ得る。したがって、方法または組成物またはキットのいずれか1つは、前記の数の標的または情報提供的標的のいずれか1つについての少なくとも2つのプライマー対に向けられ得る。

【0087】

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

いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つは、緩衝液をさらに含む。いくつかの態様において、緩衝液は、界面活性剤、ジメチルスルホキシド(DMso)、グリセロール、ウシ血清アルブミン(BSA)およびポリエチレングリコ-

10

20

30

40

50

ル(PEG)または他のPCR反応添加剤などの添加剤を含む。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つが、例えばポリメラーゼをさらに含む場合、組成物またはキットは、以下を含んでよい：大腸菌DNAポリメラーゼ、大腸菌DNAポリメラーゼIのクレノウ断片、T7DNAポリメラーゼ、T4DNAポリメラーゼ、T5DNAポリメラーゼ、クレノウクラスのポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、PfuDNAポリメラーゼ、Ventポリメラーゼ、バクテリオファージ29、REDTaq(商標)ゲノムDNAポリメラーゼ、またはシークエナーゼ。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つはさらに、1つ以上のdNTP(例えば、dATP、dCTP、dGTP、dTTP)を含む。いくつかの態様において、提供される組成物またはキットのいずれか1つはさらに、プローブ(例えば、TAQMAN(商標)プローブ)を含む。

【0088】

本明細書で使用される「キット」とは、典型的には、前述のように、1つ以上の本発明の組成物、および/または本発明に関連する他の組成物を含む、パッケージまたはアセンブリを定義する。本明細書で提供されるキットのいずれか1つはさらに、少なくとも1つの反応チューブ、ウェル、チャンバーなどを含んでよい。本明細書に記載のプライマー、プライマーシステム(複数の標的のためのプライマーのセットなど)またはプライマー組成物のいずれか1つは、キットの形態で提供され得るか、またはキット内に含まれ得る。

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

【0089】

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

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

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

【0090】

本明細書で使用される語法および専門用語は、説明目的のものであり、限定的であると見なされるべきではない。「含む(including)」、「含む(comprising)」、「有する」、「含有する(containing)」、「伴う(involved)」、およびそれらの変形の使用

10

20

30

40

50

は、その後に列挙される項目および追加の項目を包含することを意味する。

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

【実施例】

【0091】

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

S N V 標的選択

開示による多重化のための標的の同定は、現在記載されているように、以下のステップの1つ以上を含み得る。第1に、既知の困難領域を除いて、いくつかの民族対照集団(Hardy-Weinberg $p > 0.25$)で高度にヘテロ接合性のS N Pをスクリーニングした。困難領域は、患者および染色体の動原体およびテロメアを含む低い複雑性の領域で異常である可能性のある症候性領域を含む。次いで、所望の長さの標的フラグメントをin silicoで設計した。具体的には、それぞれのS N Pの70 bpウインドウにわたる2つの20~26 bpプライマーを設計した。次いで、BLASTを使用して全ての候補プライマーをGCRh37に照会した。十分に特異的であることが見出されたプライマーは保持され、オフターゲットヒット、特にフラグメントの3'末端でモニタリングされた。オフターゲット候補のヒットを、サイズ選択を生き延びるペアワイズフラグメント生成について分析した。次いで、選択されたプライマーをin silico多重化評価に供した。プライマーの計算された融解温度およびグアニン-シトシンパーセンテージ(GC%)を使用して、中程度の範囲の配列をフィルタリングした。反復遺伝子アルゴリズムおよび模擬アニーリングを使用して、400の標的に適合する候補プライマーを選択し、最終的に800のプライマーを選択した。800のプライマーを生成し、共通の溶解温度で共通の溶液で多重能力を物理的に試験した。具体的には、マルチプレックス画面および中程度の読み取り深度ウンドウにおいて偶数倍の増幅に基づいてプライマーをフィルタリングした。最高性能の多重化S N Pを使用してMOMAについて48のアッセイを設計した。それぞれのS N Pは、4つのミスマッチの選択肢でWT/MUTで設計されたプローブを有していた。アッセイ当たり8つのプローブがあった。新しく入れ子になったプライマーを、70 bpの豊富なフラグメント内に設計した。最終的に、増幅効率を評価するために、既知のヘテロ接合性個体を用いてプライマーを実験的に増幅した(TAQMAN(商標)を使用して、3回で8プローブ×48アッセイ)。

【0092】

各アッセイの推測的遺伝子型決定の情報性(informativeness)

それぞれのアッセイされたS N Pでの既知のレシピエントおよびドナー遺伝子型を使用して、情報提供的なアッセイのサブセットを選択した。レシピエントのホモ接合部位をドナーが任意の他の遺伝子型である場合に使用できることに留意されたい。さらに、ドナーの遺伝子型がわからない場合、移植前に明確なレシピエントの遺伝子型が利用可能であるという条件で、血漿データの相違を使用するなどによって、それは推論することができる。遺伝子型は、シーケンシング、S N Pマイクロアレイ、または既知の0%(クリーンレシピエント)試料に対するMOMAアッセイの適用によっても学習することができる。

【0093】

多重アッセイ性能の後処理分析

患者特異的MOMAプローブバイアスを実験コホートにわたって推定した。反復的な選択を洗練して最終的なドナー・パーセント・コールを行った。さらに、異常値の自動検出により、患者特異的な異常ゲノム領域を提供した。

【0094】

再構成実験

アッセイの感度と精度を、既知の混合比で再構成された血漿試料を使用して評価した。具体的には、比率1:10、1:20、1:100、1:200、および1:1000を

10

20

30

40

50

評価した。

再構成実験の結果を図3に示す。1つの標的は完全情報提供的であり、ここではホモ接合性ドナーがホモ接合性レシピエントに対して存在する（陰影付けしたデータ点）。他の標的は半情報提供的であり、ここではヘテロ接合性ドナーがホモ接合性レシピエントに対して存在する（白抜きのデータ点）。さらに、移植レシピエント患者からの血漿試料をMOMA法で分析した（図4）。すべてのデータは、生検を受けた患者からのものである。濃い点は拒絶反応を意味する。図5に示すさらなるデータは、本明細書で提供されるMOMA方法が、実際の血漿試料で機能したことを実証する。移植手術後、ドナーのパーセントレベルは低下した。一般に、本明細書に記載の95個のSNV標的に対するプライマーがこれらの実験に使用された。

10

【0095】

例2 - レシピエントの遺伝子型情報はあるがドナーの遺伝子型情報はないMOMAアッセイ
ドナーの遺伝子型情報なしで作業するために、以下の手順を行って情報提供的アッセイを推測し、血漿試料中のドナー特異的無細胞DNAの定量化を可能にすることができます。すべてのアッセイは、完全情報提供シナリオでの性能について評価した。したがってこの手順は、各アッセイでクリーンなAA/A B/B B遺伝子型および各定量化的バイアスなしの挙動を仮定した。レシピエントの遺伝子型を用いて、レシピエントにホモ接合性であることが知られているアッセイを選択した。いかなる汚染もドナー核酸に起因し、アッセイの集合は、非、半、および完全に情報提供的アッセイに対応する3つのクラスターのアッセイを持つ3モード分布を作成した。十分な数のレシピエントホモ接合性アッセイを用いて、ドナーの完全情報提供的アッセイの存在を仮定することができる。

20

【0096】

レシピエントの遺伝子型がホモ接合性で既知の場合であって、レシピエントの遺伝子型ではない測定値が観察された場合、真にドナーホモ接合性であるプローブは最も高いクラスターを有し、推測と等しいであろうが、一方ドナーにヘテロ接合性であるプローブは、推測と半分等しいであろう。確率分布をプロットすることができ、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定することができる。これらを用いて、本明細書で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アルゴリズムを使用して、アッセイされたすべてのSNV標的において最も有望なドナー遺伝子型を推測した。推測されたドナー遺伝子型を用いて、定量化を全情報シナリオのように進めることができる。EM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」からはじかれる）ことを前提とすると、アッセイで見いだされたマイナーなアレル比率が、レシピエントとドナーの各組み合わせについて1つずつの3つのモードの分布をとるという仮定から、始めることができる。全てのドナー遺伝子型が未知である場合、マイナーアレルがほぼゼロを示すアッセイはドナーAAであり、最高はドナー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。すべてのドナー遺伝子型についての最初の推測を記録し、各クラスターの平均を算出した。ドナーBBアッセイの平均がドナーABの2倍であることを強制すると、検索が制限される。次にアルゴリズムは、クラスターおよび組み込みの仮定に基づいて推測されたドナー遺伝子型を、再割り当てる。このプロセスは、これ以上変更が加えられなくなるまで反復的であった。最終結果は、バックグラウンドから測定された発散を考慮した、最も有望なドナー遺伝子型のセットである。一般に、すべての標的がモデルに入る；結果は、最大化後にグループ間でトスされ得る。

30

【0097】

図6および7は、このようにして処理された血漿試料からの例示的な結果を示す。X軸は、レシピエントがホモ接合性であると見出された任意のアッセイのドナー%である。点の列は、個々のPCRアッセイ結果を表す。一番下の円の列は、ドナー遺伝子型の最初の推定値、いくつかのAA、いくつかのA/BおよびいくつかのBBを表す。次いで、最初のアッセイを中心とするベータ分布を示す実曲線を描いた；ドットはホモ接合性（完全情報提供的）、および白はヘテロ接合性（半情報提供的）で、黒色の曲線は非情報提供的ア

40

50

ッセイまたはバックグラウンドノイズの分布を表す。アッセイは、2番目の列において、再割り当てされ更新された推定であった。2番目の列の曲線は破線を使用する。一番上の列は、変化が起きたので最終的な推定である。白色破線の曲線のピークの2倍は最大尤度ドナー%コールに対応して、約10%、またはドットの曲線の平均に等しい。

【0098】

2つの個体のDNAを用いた再構成実験(Recon1)を、10%、5%、1%、0.5%、0.1%で作成した。全てのミックスを、標的の多重ライブラリーで増幅し、洗浄し、次いでMOMA法を用いて定量的に遺伝子型決定した。分析は、真の遺伝子型を知るために各個体の遺伝子型を特定して行った。情報提供的標的は、メジャーな個体の遺伝子型の事前知識を用いて決定され(ホモ接合部位を探す)、第2の個体が異なる場合、情報提供的標的を用いて画分(パーセンテージ)を算出するために使用された。次いで、画分を算出した(黒で示し、「遺伝子型情報あり」を示す)。

2つの個体で開始した第2の再構成実験(Recon2)も、メジャーおよびマイナーを10%、5%、1%、0.5%および0.1%で作成した。全てのミックスを、標的の多重ライブラリーで増幅し、洗浄し、次いでMOMA法を用いて定量的に遺伝子型決定した。分析は、真の遺伝子型を知るために各個体の遺伝子型を特定して行った。上記の第2の個体の遺伝子型の事前知識を用いて、情報提供的標的を決定した。次いで、画分を算出した(黒で示し、遺伝子型情報ありを示す)。

【0099】

これらの再構成は、次の日にも再実行した(Recon3)。

第1の個体(メジャーDNA寄与者)について利用可能な遺伝子型情報のみを用いて、同じ再構成試料(Recon 1、2、3)を再度分析した。第2の個体(マイナーDNA寄与者)からの遺伝子型決定情報は使用しなかった。約38~40個の標的を用いて、遺伝子型解析なしの画分(ドナーなしでシミュレート)を計算し、それらを陰影付けした点で示す(図8)。レシピエントホモ接合性である各標的が、一般に有用であることが見出された。円は最初の推測を示し、閾値化(thresholding)され、右側のものは完全に情報提供的であると考えられ、左側のものはそうではないと考えられた。トップに沿った三角形は同じ標的であったが、最終的な情報提供性の決定のために再着色された。

【0100】

例3 - 天然の遺伝子型情報を有するが非天然の遺伝子型情報を有さないMOMAアッセイ
標的は、一般に、非情報提供的なものと情報提供的なもののいずれかとして同定する。胎児では、赤ん坊が母親に関連しているとき、すべての標的が半情報提供的である。代理妊娠では、標的は半情報提供的および完全情報提供的である。関連する妊娠の文脈に続き、すべての標的は非情報提供的なものまたは半情報提供的なものいずれかである。半情報提供的は、5%の外因性(foreign)を示す標的が10%の全体的な割合を示すようなヘテロ接合性の振る舞いを示す。非情報提供的標的は、バックグラウンドノイズレベルでほぼ0%を示す。情報提供的標的が共通の分布を共有しているという前提に基づいて、それぞれの標的の最も可能性の高い割り当てを推測するために、期待値最大化(EM)アルゴリズムを使用できる。「ベータ」分布などの分布を使用して、0と1との間の連続確率分布を与えることができる。すべての標的がバックグラウンドノイズ分布または胎児特異的比率のいずれかであると仮定すると、EMアルゴリズムは未知の標的分類を満たす。

【0101】

例えば、それぞれがコールされた胎児特異的パーセンテージを有する、10の標的のセットを検討されたい。最初の推測は、25番目未満のパーセンタイルをコールする任意の標的はバックグラウンドノイズであり、その他は半情報提供的である。その場の最初の推測でEMが始まり得る。次に、最大化ステップを実施する。ベータ分布モデルなどの分布モデルをそれぞれの点群にフィッティングし、データ点の対数尤度関数の2次元モデルへの合計を最小にする。ベータ分布を2つの形状パラメータによって定義する。合計で、4つの形状パラメータを収集する(1つの標的情報提供的な群につき2つ)。非天然%の最大尤度の推定は、半情報提供的群のベータモデルの平均の2倍に等しい。次の予測ステッ

10

20

30

40

50

では、すべての標的が評価されて、それぞれが所属する可能性が高い群を見つける。標的は、どちらのモデルがより高い可能性を有するかに基づいて、非情報提供的または半情報提供的な群に再割り当てる。任意の標的が群を変更した場合、最大化ステップを繰り返し、再び予想ステップが続く。収束すると、EMは完了し、すべての標的および最終モデルパラメータの最大尤度の情報提供的な分類をレポートする。

【0102】

遺伝子型を推測する例を図11および12に提供する。ここで、EMを使用して父の遺伝子型が知られていない胎児特異的な算出を決定した。方法は、非情報提供的な部位と半情報提供的な部位とを区別することができた。次いでこれらを2倍して胎児のフラクションを決定する。

10

さらに、本明細書で提供される方法を使用して、低胎児フラクションが胎児死亡対象と関連することを見出した。10週の胎児妊娠年齢の後に、1~10%の胎児フラクションが発達病理を示したことも見出した。

【0103】

例4 - M O M A c f - D N A アッセイ

M O M A c f - D N A アッセイの原理と手順

この例示的アッセイは、移植レシピエントの血液試料中に存在するDS c f - 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をEDTAチューブに収集し、遠心分離して血漿とバフィーコートを分離する。血漿およびバフィーコートを2つの別個の15mLコニカルチューブに等分し、凍結させることができる。血漿試料は定量的遺伝子型決定(qGT)に使用することができる、バフィーコートはレシピエントの基本的遺伝子型決定(bGT)に使用することができる。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小さな断片を、基本的遺伝子型決定に使用することができる。

20

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

30

【0104】

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

40

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

【0105】

50

MOMAは、移植ドナーとレシピエントとの間ではっきりしている可能性が高く、これらを高度に情報提供的なものとする、両アレルSNPを標的とすることにより、基本的および定量的遺伝子型決定分析の両方を実施することができる。基本的遺伝子型決定は、レシピエントおよびドナーに、それぞれの標的（例えば、ホモ接合性REF、ヘテロ接合性REFおよびVAR、およびホモ接合性VAR）における3つの可能な遺伝子型を標識することができる。この情報は、標準曲線と共に定量的遺伝子型決定に使用して、それぞれの標的のアレル比率を定量することができ、これはマイナー種の割合として知られている。すべての情報提供的および品質管理されたアレル比率の中央値を使用して、cfDNAの%を決定することができる。

【0106】

10

MOMA cf - DNA アッセイの可変性

上記のようにMOMA分析を行った後、1つの対照試料を繰り返し処理した。この試料は構築された混合物であり、約1%のドナーDNAと99%のレシピエントDNAであった。これは「陽性対照」（またはPTC）を構成し、全体のシステムが安定していることを確実にするために繰り返し行った。この期間に、数百の試料が実行された。PTCは、17バッチで再実行され、MOMA cf - DNA アッセイの可変性を調査し、可変性がどのように使用中のサブアッセイ（標的）の数によって影響され得るかを説明する機会を提示した。

マルチアッセイプラットフォームでは、それぞれの「標的」が独立してドナーフラクションを評価する。レシピエントおよびドナーの遺伝子型の知識（またはその推論）を用いて、どの標的が個体間で区別され、したがって全体的な平均cf-DNA結果に情報提供的であるかを知ることができる。それぞれの標的は可変性を有し、コレクションを使用して中央値をレポートすることで精度が得られる。したがって、一般に、より多くの標的を使用すると、最終結果のより向上した精度を可能にする（図15参照）。以下に示す結果は、使用中の標的と結果の正確さとの間の相関関係をさらに示している。

20

【0107】

PTC試料は、使い捨てチューブに細分し、DNA抽出バッチ内でそれぞれ処理した（30の真の研究/患者試料につき約1つ）。したがって、PTCは、研究の過程を通じて、1日に約1回または2回、独立して再処理した。それが少し異なる得られたコールを有するが、すべてが意図した1%の周りにあった。

30

標的ごとのデータセットを収集し、ダウンサンプリングして、情報提供的標的を少なくするという効果を経験的にシミュレートした。PTCは、96の候補標的のうち潜在的に情報提供的な36の標的を有した。臓器移植レシピエントの文脈において、この例の情報提供的標的的最大セットは、レシピエントゲノムにおいて同時にヘテロ接合性ではなく、ドナーゲノムにおいて異なる標的の数である。妊娠の文脈では、非天然のcf-DNAは胎児のものであり、遺伝子型をその両親と共有している。母親の子孫である胎児の場合、情報提供的標的最大セットは、母親のゲノムにおいて同時にヘテロ接合性ではなく、胎児ゲノムにおいて異なる標的の数である。

【0108】

40

PTCは、それぞれの実行に情報提供的かつ堅牢に定量可能な平均して21の標的を有した。使用可能な標的の数の可変性は、他の実行パラメータおよび較正試料から導き出され、標的を最大から減少させる。398の患者試料の集まりから、情報提供的標的の数は28であり（23-31）（中央値、四分位範囲）、情報提供的かつ堅牢に定量可能な標的の数は16であった（13-20）。

ダウンサンプリング手順を使用して、いくつかの標的を無作為に検出し、次いで試料を再分析した。データを、それぞれのシナリオにおける情報提供的標的の数によって収集し、組織化し、結果を可変性について分析した。17回の実行のうちの1つを図13に示し、17回の実行の複合グラフを図14に示す。

【0109】

50

図13に示すように、試料は20%を超える情報提供的標的を有し、約0.9%のコ-

ルを与えた。情報提供的標的が落ちると、平均値はあまり動かないが、誤差バーは大きくなる。情報提供的標的を1つだけ持つことで、試料は0.04%と1.13%との間でどこからでもレポートされた。データは、変動の係数(CoV)について再計算し、表1に収集した。

【表1】

表1. 変動の係数(陽性対照からのデータ)

使用した 標的	CoV	1ステッ プの取得
1	41.0%	12.6%
2	28.5%	5.3%
3	23.2%	4.1%
4	19.1%	1.9%
5	17.1%	2.7%
6	14.5%	0.8%
7	13.7%	1.7%
8	12.0%	0.0%
9	12.0%	1.5%
10	10.5%	0.9%
11	9.5%	1.2%
12	8.3%	0.7%
13	7.6%	0.8%
14	6.8%	0.5%
15	6.3%	0.7%
16	5.6%	0.2%
17	5.4%	0.9%
18	4.5%	0.4%
19	4.1%	0.6%
20	3.6%	0.7%
21	2.8%	0.3%
22	2.5%	

【0110】

表に示されているように、わずか8つの情報提供的標的を使用するとき、試料はわずか1.2%の平均の変動の係数を有する。3番目の列は2番目の列のステップ間の違いであり、1つの情報提供的標的と2つの情報提供的標的との間で大きなゲインが可能であることを示すが、この例では約10の情報提供的標的の後に減少したリターンが見られる。

その結果、どれくらいの変動が許容できるかを決定し、それに応じてデータ駆動型の標的数閾値を選択することができる。たとえば、5%のCoVが必要である場合、17未満の情報提供的標的の試料を「失敗QC」と分類できる。

CoV数およびこの全体の分析は、1%のドナーラインを前提としている。より大きなドナーフラクションは、より少ない標的に対してより堅牢であり、より小さなドナーフラクションは、同じ精度を有するためにより多くの標的を必要とする。

【0111】

例4 - 例示的なMOMAアッセイおよび移植レシピエント試料の感受性および特異性

MOMAアッセイは、移植脈管障害を有する12人の移植レシピエント由来の試料に9

10

20

30

40

50

6のSNV標的のパネルを用いて、上記のものを除く104と比較して実施した。少なくとも6の情報提供的なSNV標的で、MOMAアッセイは、89%の感度および75%の特異性で対象を区別することができることを見出した。結果を図16に示す。

【0112】

例5 - コンピュータで実施される態様の例

いくつかの態様において、上述の診断技術は、1つ以上のソフトウェアファシリティを実行する1つ以上の計算機器を介して実施され、経時的に対象の試料を分析し、試料中の核酸（無細胞DNAなど）を測定し、1つ以上の試料に基づく診断結果を生み出すことができる。図17は、いくつかの態様が動作することができるコンピュータシステムの例を示しているが、態様は図17に示すタイプのシステムでの動作に限定されないことを理解されたい。

10

【0113】

図17のコンピュータシステムは、対象806から試料806を得ることができる対象802および臨床医804を含む。上記から理解されるように、試料806は、対象802のための任意の適切な生物学的材料の試料（対象802の核酸（無細胞DNAなど）の存在を測定するために使用され得、血液試料を含む）であり得る。試料806は分析装置808に提供することができ、これは、当業者が前述のことから理解するように、試料808を分析して、核酸（無細胞DNAなど）の全量および試料806および／または対象802の非天然核酸（無細胞DNAなど）の量を決定する（推定を含む）。図示を容易にするために、分析装置808は単一の装置として示されているが、分析装置808は、任意の適切な形態をとることができ、いくつかの態様において、複数の装置として実施することができることを理解されたい。試料806および／または対象802における核酸（無細胞DNAなど）の量を決定するために、分析装置808は、上記の任意の技術を実施することができ、特定の分析を実施することに限定されない。分析装置808は、他のハードウェアを動作させ、他のハードウェアによって実施されるタスクの結果を受け取るようにプロセッサ（单数または複数）を駆動して、分析の全体的な結果（試料806および／または対象802の核酸（無細胞DNAなど）の量であってもよい）を決定するソフトウェアに実施された分析ファシリティを実行する1つ以上のプロセッサを含むことができる。分析ファシリティは、1つ以上のコンピュータ可読記憶媒体（装置808のメモリーなど）に保存され得る。他の態様において、試料を分析するための本明細書に記載の技術は、特定用途向け集積回路（ASIC）などの1つ以上の専用コンピュータ構成要素、またはソフトウェア実施の代わりになり得る他の適切な形態のコンピュータ構成要素で部分的または全体的に実行され得る。

20

30

【0114】

いくつかの態様において、臨床医804は、試料806を分析装置808に直接提供することができ、対象802から試料806を得るために加えて装置808を作動させることができ、他の態様において、装置808は臨床医804および対象802から地理的に離れていてもよく、試料806は出荷され得、または分析装置808に場所へ転送され得る。いくつかの態様において、試料806は、試料806が得られた日付および／または時間に関する試料806および／または対象802、または試料806を記載または同定する他の情報の識別子（例えば、任意の適切なインターフェースを介した入力）とともに分析装置808に提供される。

40

【0115】

分析装置808は、いくつかの態様において、試料806に対して実行された分析の結果を、データベースまたは他の適切なデータストアとして実施され得るデータストア810Aを含み得る計算機器810に提供するように構成され得る。いくつかの態様において、計算機器810は、クラウドサービスプロバイダなどの分散計算プラットフォームの1つ以上の物理的および／または仮想的な機械を含む1つ以上のサーバとして実施され得る。他の態様において、装置810は、デスクトップまたはラップトップパーソナルコンピュータ、スマート携帯電話、タブレットコンピュータ、専用ハードウェア装置、または他

50

の計算機器として実施することができる。

いくつかの態様において、分析装置 808 は、その分析の結果を、インターネットを含む 1 つ以上の有線および / または無線、ローカルおよび / またはワイドエリアコンピュータ通信ネットワークを介して装置 810 に通信することができる。分析の結果は、任意の適切なプロトコルを使用して通信されてもよく、試料 806 および / または対象 802 の識別子、または試料 806 が得られた日付および / または時間など、試料 806 を記載または同定する情報とともに通信され得る。

【 0116 】

計算機器 810 は、本明細書に記載の診断技術を実行するためのプロセッサ（単数または複数）を駆動し得るソフトウェアに実施された診断ファシリティを実行するための 1 つ以上のプロセッサを含むことができる。診断ファシリティは、装置 810 のメモリなどの 1 つ以上のコンピュータ可読記憶媒体に保存することができる。他の態様において、試料を分析するための本明細書に記載された技術は、特定用途向け集積回路（A S I C）などの 1 つ以上の専用コンピュータ構成要素、またはソフトウェア実施の代わりになり得る他の任意の適切な形態のコンピュータ構成要素で部分的または全体的に実施することができる。

10

【 0117 】

診断ファシリティは、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り、その情報をデータストア 810 A に保存することができる。情報は、対象 802 の以前の試料に関する情報が診断ファシリティによって以前に受信され、保存されている場合など、対象 802 の他の情報に関連して、データストア 810 A に保存されてもよい。複数の試料に関する情報は、対象 802 の識別子などの共通の識別子を使用して関連付けることができる。いくつかの場合において、データストア 810 A は、複数の異なる対象について情報を含むことができる。

20

【 0118 】

診断ファシリティはまた、対象 802 の診断を決定するために、ユーザ入力によって特定された特定の対象 802 に対する 1 つ以上の試料 806 の分析の結果を分析するように動作されてもよい。診断は、対象 802 が特定の状態を有している、有し得る、または将来的に発症し得るというリスクの結論であってもよい。診断ファシリティは、特定の試料 806 について決定された核酸（無細胞 D N A など）の量を 1 つ以上の閾値と比較すること、または試料 806 について経時的に決定された核酸（無細胞 D N A など）の量の経時的な変化を 1 つ以上の閾値と比較することを含む、上記の様々な例のいずれかを使用して診断を決定することができる。例えば、診断ファシリティは、1 つ以上の試料 806 に対する核酸（無細胞 D N A など）の全量を 1 つの閾値と比較し、同じ試料（単数または複数）について非天然核酸（無細胞 D N A など）の量を別の閾値と比較することによって、ある状態の対象 802 に対するリスクを決定することができる。閾値との比較に基づいて、診断ファシリティは、ある状態の対象 802 に対するリスクを示す出力を生成することができる。

30

【 0119 】

前述から理解されるように、いくつかの態様において、核酸（無細胞 D N A など）の量を比較することができる異なる閾値で診断ファシリティを構成することができる。異なる閾値は、例えば、異なる人口統計学的群（年齢、性別、人種、経済的クラス、病歴における特定の処置 / 状態 / 他の有無、または他の人口統計学的分類）、異なる状態、および / または他のパラメータまたはパラメータの組み合わせに対応する。かかる態様において、診断ファシリティは、計算機器 810 のメモリに保存された異なる閾値を用いて、核酸（無細胞 D N A など）の量と比較される閾値を選択するように構成することができる。したがって、選択は、人口統計学的群に基づいて閾値が異なる態様における対象 802 の人口統計学的情報に基づき、これらの場合、対象 802 の人口統計学的情報は、診断ファシリティに提供されるか、または対象 802 の識別子を使用する診断ファシリティによって（別の計算機器、またはデータストア 810 A と同じかまたは異なるデータストア、または

40

50

任意の他の適切な供給源から)回収される。選択は、追加的または代替的に、リスクが決定されるべき条件に基づいてもよく、診断ファシリティは、リスク受信を入力として条件を決定する前に、リスクの決定の基礎となる閾値を選択する条件を使用することができる。診断ファシリティは、複数の閾値がサポートされる態様において、任意の特定の方法で閾値を選択することに限定されないことを理解されたい。

【0120】

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

10

【0121】

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

20

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

【0122】

本明細書で説明される原理に従って動作する技術は、任意の適切な方法で実施されてもよい。上記の議論には、核酸(無細胞DNAなど)の量の分析に基づく状態のリスクを決定する様々なプロセスのステップおよび動作を示す一連のフローチャートが含まれている。上述の処理ブロックおよび決定ブロックは、これらの様々なプロセスを実行するアルゴリズムに含まれ得るステップおよび動作を表す。これらのプロセスから導出されたアルゴリズムは、1つ以上の单一または多目的プロセッサの動作に統合され、その動作を指示するソフトウェアとして実施されてもよく、デジタル信号処理(DSP)回路または特定用途向け集積回路(AVIC)などの機能的に等価な回路として実施されてもよく、あるいは他の適切な方法で実施することができる。態様は、任意の特定の回路または任意の特定のプログラミング言語またはプログラミング言語のタイプの任意の特定の構文または動作に限定されないことを理解されたい。むしろ、当業者であれば、上記の説明を使用して回路を製作するか、または本明細書で説明したタイプの技術を実行する特定の装置の処理を実行するコンピュータソフトウェアアルゴリズムを実施することができる。本明細書で別段の指示がない限り、上述のステップおよび/または動作の特定のシーケンスは、本明細書に記載された原理の実施および態様において実施され、変更され得るアルゴリズムの單なる例示であることも理解されたい。

30

【0123】

したがって、いくつかの態様において、本明細書に記載の技術は、アプリケーションソフトウェア、システムソフトウェア、ファームウェア、ミドルウェア、埋め込みコード、または任意の他の適切なタイプのコンピュータコードを含む、ソフトウェアとして実施されるコンピュータ実行可能命令で実行することができる。かかるコンピュータ実行可能命

40

50

今は、任意の多数の適切なプログラミング言語および／またはプログラミングツールまたはスクリプトツールを使用して記述することができ、フレームワークまたは仮想機械上で実行される実行可能な機械言語コードまたは中間コードとしてコンパイルすることもできる。

【0124】

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

【0125】

一般に、機能的ファシリティは、特定のタスクを実行するか、または特定の抽象データタイプを実施するルーチン、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、機能的ファシリティの機能性は、それらが動作するシステムにおいて所望に応じて組み合わされ、または分散されてもよい。いくつかの実施において、本明細書で技術を実行する1つ以上の機能的ファシリティは一緒に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。これらの機能的ファシリティは、代替的な態様において、ソフトウェアプログラムアプリケーションを実施するために、他の無関係の機能的ファシリティおよび／またはプロセスと相互作用するように適合されてもよい。

1つ以上のタスクを実行するために、いくつかの例示的な機能的ファシリティが本明細書で説明されている。しかし、説明された機能的ファシリティおよびタスクの分割は、本明細書に記載された例示的技術を実施することができる機能的ファシリティのタイプの單なる例示であり、態様は、機能的ファシリティの任意の特定の数、分割またはタイプで実施されることに限定されないことを理解されたい。いくつかの実施において、すべての機能性が单一の機能的ファシリティで実施されてもよい。いくつかの実施において、本明細書で説明される機能的ファシリティのいくつかは他のものと一緒にまたは別々に（すなわち、単一のユニットまたは別個のユニットとして）実施され得るか、またはこれらの機能的ファシリティのいくつかが実施され得ないことを理解されたい。

【0126】

本明細書で説明される技術を（1つ以上の機能的ファシリティとして実施されるとき、または他の任意の方法で）実施するコンピュータ実行可能命令は、いくつかの態様において、1つ以上のコンピュータ可読媒体上にコードされ、媒体に機能性を提供し得る。コンピュータ可読媒体は、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（C D）またはデジタル多用途ディスク（D V D）などの光媒体、永続的または非永続的なソリッドステートメモリ（例えば、フラッシュメモリ、磁気R A Mなど）、または任意の他の適切な記憶媒体を含む。かかるコンピュータ可読媒体は、計算機器の一部またはスタンダロンの別個の記憶媒体を含む、任意の適切な方法で実施することができる。本明細書で使用する場合、「コンピュータ可読媒体」（「コンピュータ可読記憶媒体」とも呼ばれる）は、有形の記憶媒体を指す。有形の記憶媒体は、非一時的であり、少なくとも1つの物理的な構造的構成要素を有する。本明細書で使用する場合、「コンピュータ可読媒体」において、少なくとも1つの物理的構造的構成要素は、埋め込まれた情報を有する媒体を

10

20

30

40

50

作成するプロセス、それに情報を記録するプロセス、または情報で媒体をコードする任意の他のプロセスの間に何らかの形で変更され得る少なくとも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されてもよい。

【0127】

技術がコンピュータ実行可能命令として実施され得るいくつかの（すべてではない）実施において、これらの命令は、図17の例示的なコンピュータシステムを含む任意の適切なコンピュータシステムで動作する1つ以上の適切な計算機器（単数または複数）上で実効され得、または、または1つ以上の計算機器（または1つ以上の計算機器の1つ以上のプロセッサ）は、コンピュータ実行可能命令を実行するようにプログラムされてもよい。計算機器またはプロセッサは、命令が、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、バスを介してアクセス可能なコンピュータ可読記憶媒体など）など、計算機器またはプロセッサにアクセス可能な方法で保存されているときに命令を実行するようにプログラムされ得る。これらのコンピュータ実行可能命令を含む機能的ファシリティは、単一の多目的プログラム可能デジタル計算機器、処理能力を共有し本明細書に記載の技術を共同して実行する2以上の多目的計算機器の調整されたシステム、本明細書に記載された技術を実行するための（共同配置または地理的に分散された）単一の計算機器または計算機器の調整されたシステム、本明細書に記載の技術を実行するための1つ以上のフィールドプログラム可能ゲートアレイ（FPGA）、または任意の他の適切なシステムと統合し、それを指示することができる。

10

【0128】

技術が回路および／またはコンピュータ実行可能命令で実施される態様を説明した。いくつかの態様において、少なくとも1つの例が提供された方法の形態であってもよいことを理解されたい。方法の一部として実施される行為は、任意の適切な方法で順序付けられ得る。したがって、例示的な態様では連続的な動作として示されていても、いくつかの動作を同時に実行することを含み得る、示されていない順序で動作が行われる態様が構築されてもよい。上述のデバイス、システム、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、またはそれらの任意の組合せを含む、上記のいずれか1つが、他の側面において本明細書で提供される。

20

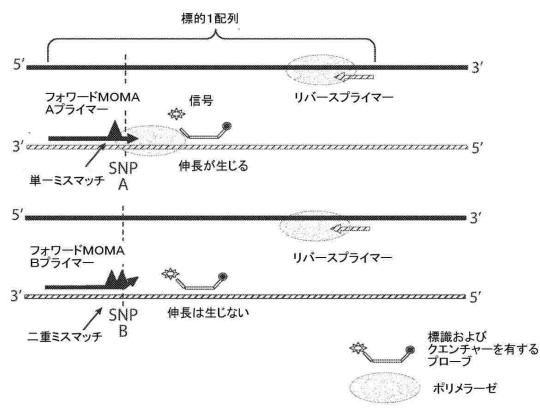
30

40

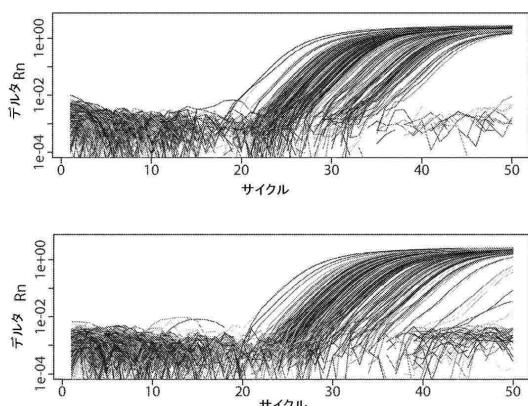
50

【図面】

【図 1】

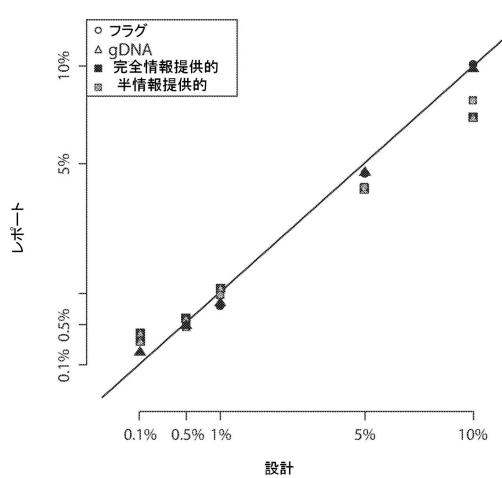


【図 2】

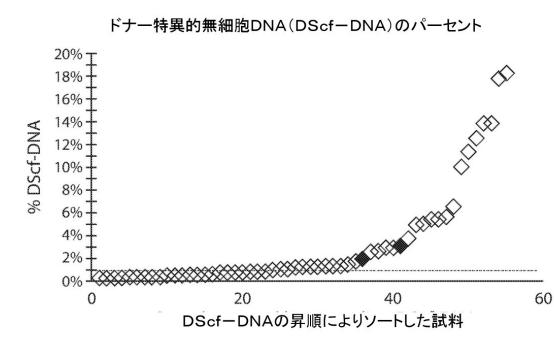


10

【図 3】



【図 4】



20

30

40

50

【図 5】

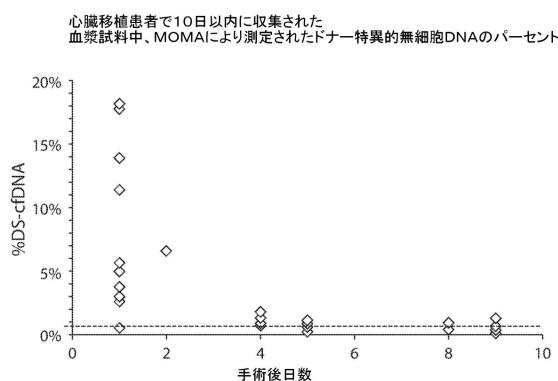


図 5

【図 6】

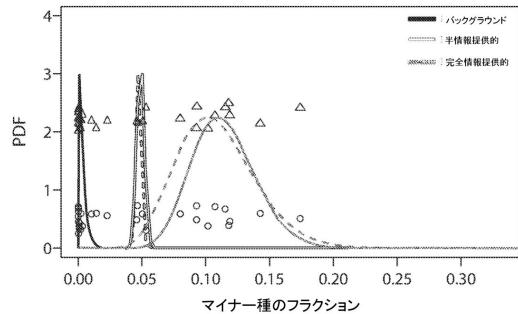


図 6

【図 7】

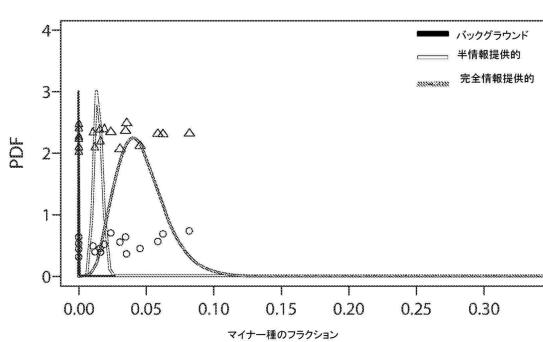


図 7

【図 8】

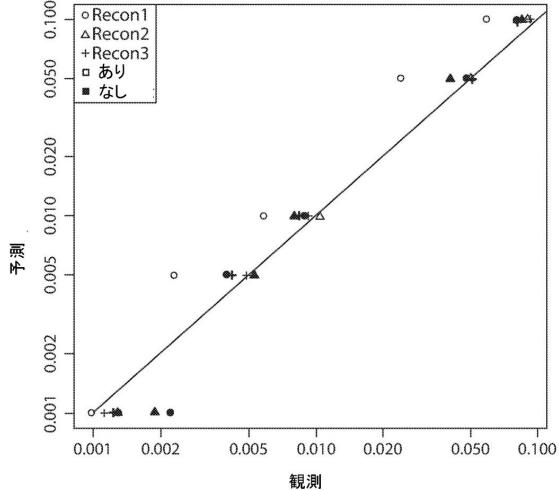
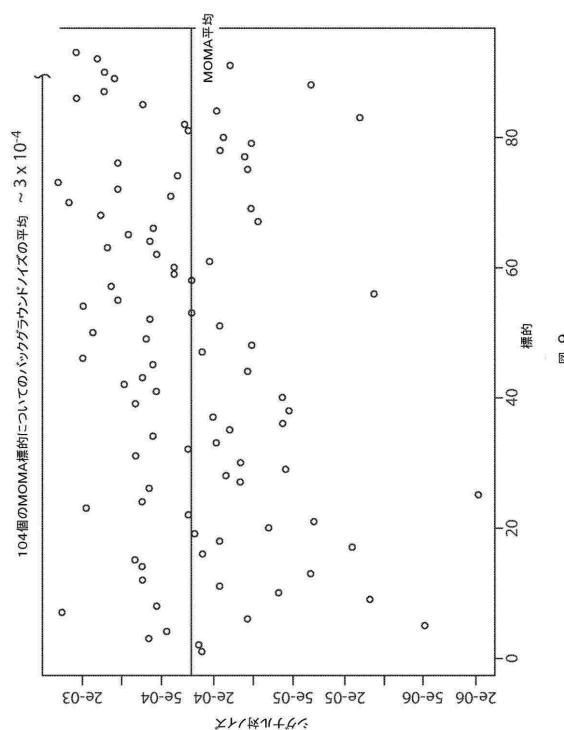
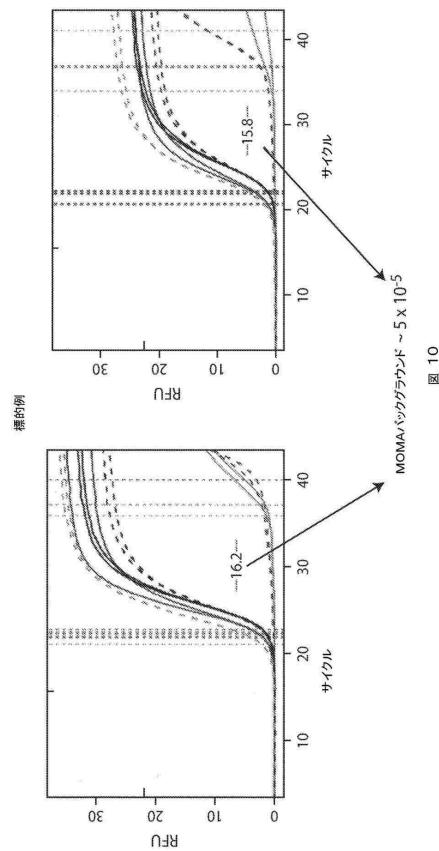


図 8

【図 9】



【図 10】



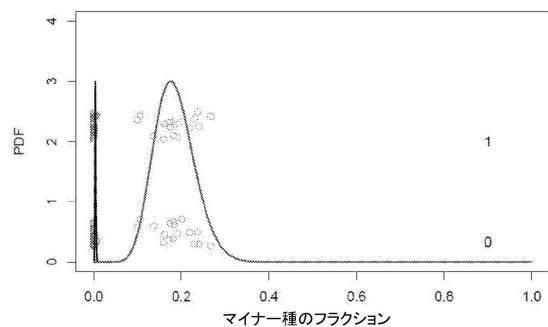
10

20

30

40

【図 11】



【図 12】

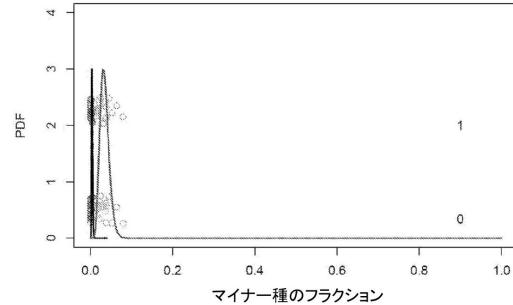


図 12

図 11

50

【図 13】

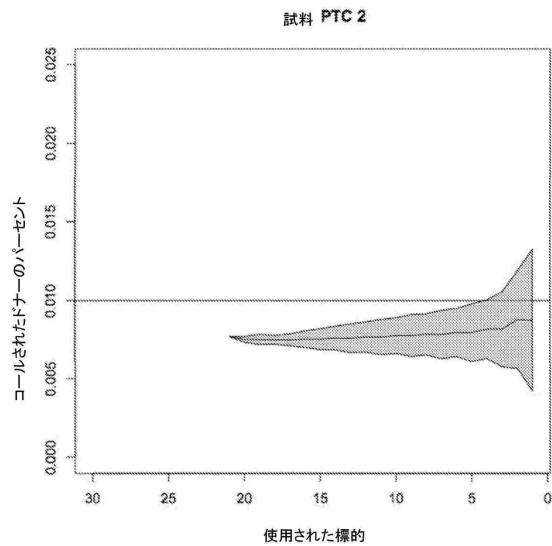


図 13

【図 14】

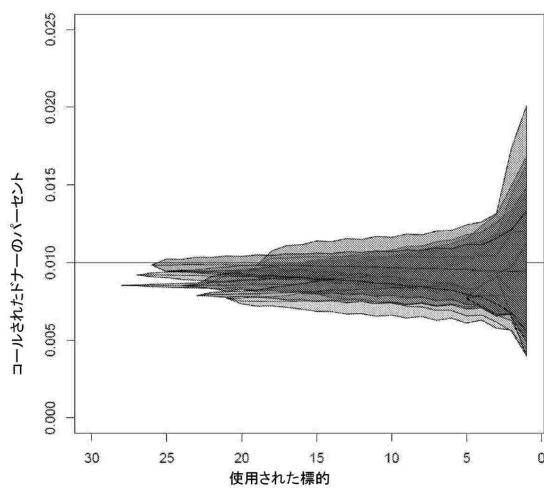


図 14

10

20

【図 15】

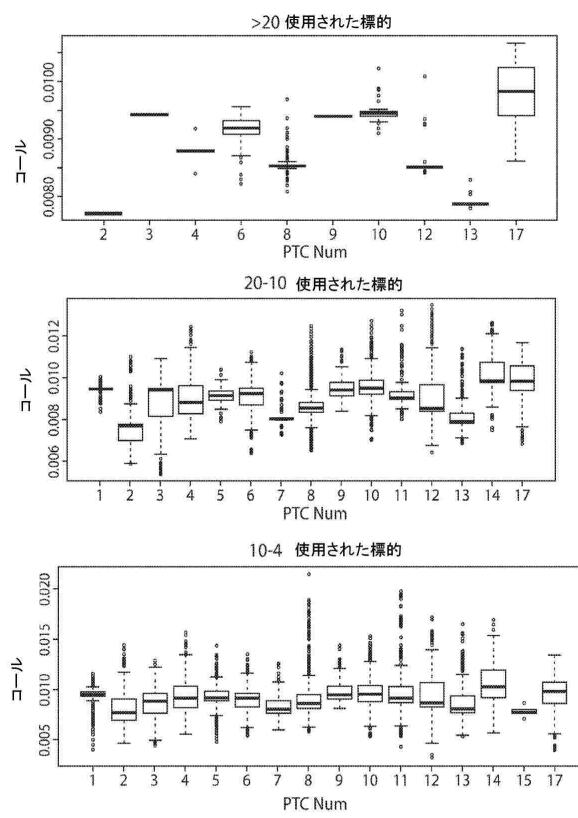


図 15

【図 16】

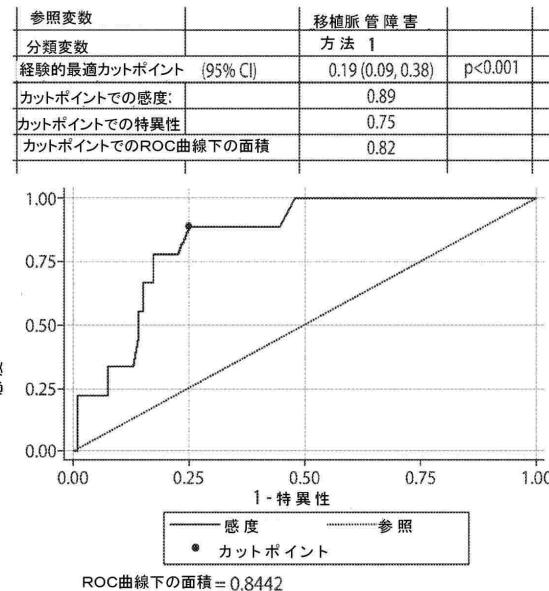


図 16

30

40

50

【図 1 7】

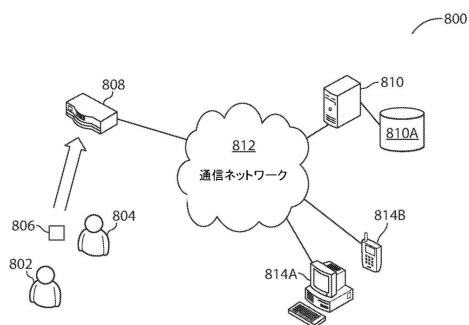


図 17

10

20

30

40

50

フロントページの続き

米国(US)

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

合議体

審判長 福井 悟

審判官 上條 肇

審判官 小暮 道明

(56)参考文献 国際公開第2013/159035 (WO, A2)

国際公開第2014/194113 (WO, A2)

国際公開第2011/118603 (WO, A1)

Mutation Research, 1999, Vol. 430, p. 1-12

BMC Genomics, 2007, Vol. 8, Issue 1, Article: 2
75

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00 - 3/00

BIOSIS / EMBASE / MEDLINE / CAPplus (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (STN)