

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-524519

(P2020-524519A)

(43) 公表日 令和2年8月20日(2020.8.20)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)		
C 12 Q 1/6851 (2018.01)	C 12 Q 1/6851	Z	2 G 045	
G 01 N 33/50 (2006.01)	G 01 N 33/50	P	4 B 063	
G 01 N 33/53 (2006.01)	G 01 N 33/53	M		
C 12 Q 1/686 (2018.01)	C 12 Q 1/686	Z		
C 12 Q 1/6869 (2018.01)	C 12 Q 1/6869	Z		
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁)				
(21) 出願番号	特願2019-571052 (P2019-571052)	(71) 出願人	510321893	
(86) (22) 出願日	平成30年6月20日 (2018.6.20)		ザ メディカル カレッジ オブ ウィス	
(85) 翻訳文提出日	令和2年2月20日 (2020.2.20)		コンシン, インコーポレイテッド	
(86) 國際出願番号	PCT/US2018/038598		The Medical College	
(87) 國際公開番号	W02018/237075		of Wisconsin, Inc.	
(87) 國際公開日	平成30年12月27日 (2018.12.27)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53	
(31) 優先権主張番号	62/572,556		226 ミルウォーキー ウォータータウ	
(32) 優先日	平成29年10月15日 (2017.10.15)		ン ブランク ロード 8701	
(33) 優先権主張国・地域又は機関		(74) 代理人	100102842	
	米国(US)		弁理士 葛和 清司	
(31) 優先権主張番号	62/522,533	(72) 発明者	ミッチャエル, アオイ, トミタ	
(32) 優先日	平成29年6月20日 (2017.6.20)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		122、エルム グローブ、ストーンフィ	
			ールド コート 13835	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】全セルフリーDNAによる移植合併症リスクの評価

## (57) 【要約】

本発明は、全セルフリーDNA（例えば移植対象からのもの）の量を評価するための方法および組成物に関する。本明細書において提供される方法および組成物は、対象における感染、心停止および死亡を含む移植の後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。

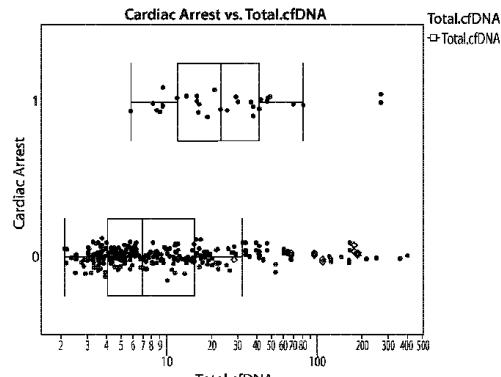


Fig. 4

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

移植対象からの試料を評価する方法であって、

(a) 対象からの試料中の全 c f - D N A の量を決定すること、ここで、対象は、移植合併症を有するか、これを有することが疑われるか、これを既に有しているか、またはこれを有するリスクがある；ならびに

(b) 全 c f - D N A の量を報告および／または記録することを含む、前記方法。

**【請求項 2】**

(c) 全 c f - D N A の量を、全 c f - D N A の閾値または少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A 量と比較すること

をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

**【請求項 3】**

(d) 全 c f - D N A の閾値および／または少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A 量と比較して決定した全 c f - D N A の量に基づいて、対象が、移植合併症を有すること、または移植合併症のリスクが増大しているものと決定すること、  
をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

**【請求項 4】**

移植対象を評価する方法であって、

(a) 対象からの試料中の全 c f - D N A の量を得ること、ここで、対象は、移植合併症を有するか、これを有することが疑われるか、これを既に有しているか、またはこれを有するリスクがある；

(b) 全 c f - D N A の量を、全 c f - D N A の閾値および／または少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A 量と比較すること；ならびに

(c) 全 c f - D N A の閾値および／または少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A 量と比較して決定された全 c f - D N A の量に基づいて、対象のための処置またはモニタリングレジメンを決定すること

を含む、前記方法。

**【請求項 5】**

全 c f - D N A の閾値および／または少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A 量と比較して決定された全 c f - D N A の量に基づいて、対象を、移植合併症を有するものとして、または移植合併症を有するリスクが増大しているものとして、分類することをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

**【請求項 6】**

対象が、機械的サポートを受けているかまたはこれを必要としている、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 7】**

対象が、移植合併症を有すると決定されている、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前に対象に適用された 1 つ以上のさらなる検査により、対象が移植合併症を有すると決定されたか、または対象に対する 1 つ以上のさらなる検査を行うことをさらに含む、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 c f - D N A の量を決定または比較することなく、評価または決定が行われる、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 10】**

移植合併症が、心停止、感染または死亡である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

**【請求項 11】**

10

20

30

40

50

全 c f - D N A 量が、レポートにおいて提供される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

また対象からの試料中のものであった少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A の量も含むレポートにおいて、量が提供される、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

全 c f - D N A 量が、データベースにおいて記録される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

データベースがまた、対象からの試料中のものであった少なくとも 1 つの前の全 c f - D N A の量を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法であって、全 c f - D N A の量が、  
( a ) 複数の単一ヌクレオチドバリアント ( S N V ) 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 組のプライマーペアにより、ポリメラーゼ連鎖反応 ( P C R ) 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 組のプライマーペアのうちの一方は、プライマー中に、 S N V 標的の一方のアレルと比較して 3 ' の最後から 2 番目にミスマッチを含むが、該 S N V 標的の別のアレルと比較して 3 ' の二重のミスマッチは含まず、該 S N V 標的の一方のアレルを特異的に増幅し、少なくとも 2 組のプライマーペアの他方は、該 S N V 標的の他方のアレルを特異的に増幅する、ならびに

( b ) 結果に基づいて全 c f - D N A 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、前記方法。

【請求項 1 6】

ドナーの遺伝子型が既知である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

ドナーの遺伝子型が不明である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】

全 c f - D N A の量は、増幅ベースの定量アッセイを用いて決定するかまたは得られる、1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

増幅ベースの定量アッセイが、定量リアルタイム P C R ( q R T - P C R ) である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

全 c f - D N A の量が、配列決定、例えばハイスループットな配列決定または次世代配列決定を用いて決定するかまたは得ることができる、1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

8 または 9 n g / m L またはそれより多い量が、心停止または死亡のリスクを表す、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 2】

2 0 n g / m L またはそれより多い量が、感染または増大した感染のリスクの存在を表す、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 3】

少なくとも 1 つの量が、臓器移植の後 4 、 5 、 6 、 7 または 8 日以内に対象から採取された試料において決定される、請求項 1 ~ 2 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 4】

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増大した全 c f - D N A の量が、増大したリスク、または増大中のリスクを表す、請求項 1 ~ 2 3 のいずれ

10

20

30

40

50

か一項に記載の方法。

【請求項 25】

閾値よりも低いか、および／またはより早い時点からの量と比較して低下した全 c f - D N A の量が、低下したリスク、または低下中のリスクを表す、請求項 1～24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

モニタリングレジメンを決定することは、対象において全 c f - D N A の量を経時的にもしくはその後の時点において決定すること、または対象にかかるモニタリングを示唆することを含む、請求項 4～25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

対象を、1カ月ごと、または2カ月ごとに評価する、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

対象を、6カ月まで、8カ月まで、10カ月まで、または1年までにわたり評価する、請求項 1～27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

閾値、またはより早い時点からの量と比較して全 c f - D N A の量が増大する場合、試料採取の間の時間が短縮される、請求項 1～28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

全 c f - D N A のさらなる量を、記録または報告する、請求項 1～29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

さらなる量が、レポートにおいて報告される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

さらなる量が、データベースにおいて記録される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 33】

モニタリングレジメンを決定することが、対象を評価するために、1つ以上のさらなる検査を使用すること、またはこれの使用を示唆することを含む、請求項 4～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

処置レジメンを決定することが、対象のための処置を選択または示唆することを含む、請求項 4～33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

処置レジメンを決定することが、対象を処置することを含む、請求項 4～34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

処置が、本明細書において提供される処置のいずれか1つを含む、請求項 4～35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

処置レジメンを決定することが、処置についての情報を対象に提供することを含む、請求項 4～36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

処置が、抗感染処置である、請求項 4～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

処置が、抗拒絶処置である、請求項 4～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 40】

処置が、心停止処置である、請求項 4～37 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 41】

試料が、血液、血漿または血清試料である、請求項 1～40 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

血液試料が、血漿試料である、請求項 4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

移植対象が、心臓移植対象である、請求項 1 ~ 4 2 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 62/522,533、2017年10月15日に出願された米国仮出願番号 62/572,556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、移植に関連する1つ以上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。本発明はさらに、移植合併症のリスクの評価のために、多重最適化ミスマッチ増幅 (multiplexed optimized mismatch amplification: M O M A) などのアッセイ、および / または配列決定技術を用いて、全セルフリーデオキシリボ核酸 (c f - D N A) 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

本開示は、少なくとも部分的に、臓器移植などの移植の後の合併症のリスクが、全セルフリー D N A の量と相関しているという驚くべき発見に基づく。試料中の全セルフリー D N A を定量するための多様な手段のいずれか1つを用いて、感染、心停止および死亡を含む移植合併症のリスクを決定すること、ならびにこれを経時的にモニタリングすることができる。

【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。

30

【0 0 0 5】

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。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。

40

【0 0 0 6】

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。

一側面において、本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つが提供される。本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つの一態様において、特定のリスクまたは合併症の指標である量は、本明細書において記載されるカットポイントまたはその範囲のいずれか1つである。本明細書において提供される方法のうちのいずれか1つの一態様において、試料を得るための時間は、本明細書において記載される時間のいずれか1つである。本明細書において提供される方法のいずれか1つの一態様において、対象は

50

、本明細書において記載される対象のいずれか1つである。

【0007】

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。

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。

【0008】

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、本開示の実施可能用件のために必要とされるものではない。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【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SNVBの検出がもたらし、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、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3】図3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4】図4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心停止に至った（1）か否か（0）を表すグラフである。

【図5】図5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。

【0010】

【図6】図6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7】図7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。

【図8】図8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。

【図9】図9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10】図10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。

【0011】

【図11】図11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12】図12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。

【図13】図13は、298の試料からの全cf-DNAを用いた、感染についてのカッ

10

20

30

40

50

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14】図14は、各々の対象の最後の試料からの全c f - 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15】図15は、85の試料からの全c f - 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表である。

【0012】

【図16】図16は、85の試料からの全c f - 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、図91の結果のグラフ表示である。

【図17】図17は、85の試料からの全c f - 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表である。

【図18】図18は、85の試料からの全c f - 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、図93の結果のグラフ表示である。

【図19】図19は、292の試料からの全c f - 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表である。

【図20】図20は、292の試料からの全c f - 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】

【0013】

発明の詳細な説明

全セルフリーDNA（全c f - DNA）は、移植合併症と相関し、結果として、対象を評価および／またはモニタリングするために用いることができるを見出した。合併症として、これらに限定されないが、感染、心停止および／または死亡が挙げられる。したがって、本開示の側面は、少なくとも部分的に、移植合併症またはそれに関連するリスクを評価または決定するために、試料中の全c f - DNAを定量する方法に関する。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つによりモニタリングすることができる。

【0014】

本明細書において用いられる場合、「セルフリーDNA」（または「c f - DNA」）とは、対象の細胞の外側に、例えば血液、血漿、血清、尿などにおいて存在するDNAである。いかなる特定の理論または機序によても拘束されることは望まないが、c f - DNAは、例えば細胞のアポトーシスを介して、細胞から放出されると考えられる。「セルフリーDNA」（または「c f - 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c f - DNA」）は、試料中に存在するc f - 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c f - 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、全セルフリーDNAの量、および対象の移植に関連する合併症リスクを決定するために用いることができる。

【0015】

本明細書において提供されるのは、全c f - DNAを測定するために用いることができる方法および組成物であって、これは、したがって、対象の移植に関連する合併症のリスクを評価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よい。いくつかの態様において、移植は、心臓移植である。

【0016】

10

20

30

40

50

重要なことに、全 c f - D N A の量は、移植合併症のリスクを評価または決定するため 10 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、方法のいずれか 1 つを用いて、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、例えば移植合併症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、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 20 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。

#### 【0017】

対象は、1 つ以上の全 c f - D N A の量を決定するかまたはこれを得ることにより、評価することができる。全 c f - D N A 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。

#### 【0018】

c f - D N A 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、拒絶の合併症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。

#### 【0019】

本明細書において提供される場合、移植合併症の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。上述のとおり、提供される方法のいずれか 1 つは、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。対象は、本明細書において提供される対象のいずれか 1 つであってよい。本明細書において提供される方法のいずれか 1 つの一態様において、対象は、機械的サポートを受け

10

20

30

40

50

ているもの、または機械的サポートの必要があるものである。

#### 【0020】

「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

#### 【0021】

処置は、決定される合併症リスクに基づいて示される任意の処置を含む。一態様において、処置は、心停止処置である。心停止処置として、例えば、血圧の医薬、不随意神経系遮断薬、および抗不整脈剤が挙げられる。さらに、対象を冠動脈カテーテルで処置しても、および/または心臓除細動器 (cardioverter-defibrillator) を移植してもよい。

#### 【0022】

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、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、駆虫剤、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、セファロスポリン、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。

20

#### 【0023】

抗拒反応治療として、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、プレドニゾロ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、ナイトロジエンマスター（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 (Cytoxan)）、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ブトプリンなどのプリン、ピリミジンアノログ、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、ドロトレコギンアルファ（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

30

40

50

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。

他の治療は、当業者に公知である。

#### 【0024】

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)。

10

#### 【0025】

処置および臨床経過は、本明細書において提供されるように決定される対象の状態、および/または対象の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、全cf-DNAの量が8ng/mL以上である場合、対象は、上記のもののような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することができる。

#### 【0026】

「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DScf-DNAおよび/または全cf-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DScf-DNAおよび/または全cf-DNAの量を決定するかもしくはこれを得ることを含む。

20

#### 【0027】

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cf-DNAは、なるべく早く、移植手術の4日後には検出してよい。他の態様において、全cf-DNAは、移植の後5、6、7または8日以内またはそれより後に定量してもよい。対象の全cf-DNAレベルをモニタリングするために、試料は、1カ月ごと、2カ月ごと、またはそれより頻繁な間隔で、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、採取してもよい。全cf-DNAのレベルの増大がリスクの増大と相關することが見出されたことから、対象の全cf-DNAが複数の時点の間で増大することが見出された場合、医師は、当該対象はより頻繁な試料採取をうけるべきであることを決定することができる。対象が、複数の時点の間で全cf-DNAのレベルが低下していることが見出された場合、医師は、より頻度の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。モニタリングのタイミングおよび/または頻度はまた、1つ以上の閾値との比較によっても決定することができる。例えば、全cf-DNAの量が、8ng/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)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cf-DNAの量が、8ng/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。

30

#### 【0028】

40

50

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、試料中の全c f - DNAなどの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全c f - DNAなどの全核酸の量を経時に提供する。

#### 【0029】

いくつかの態様において、量は、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。

10

#### 【0030】

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、試料中の全c f - DNAを表す。

20

#### 【0031】

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、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全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全核酸の量が低いか同様の対象は、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。

#### 【0032】

「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でとなる、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、多様な形態をとつてよい。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二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つてよい。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つてよい。

30

40

#### 【0033】

本明細書において提供される閾値は、対象における移植合併症のリスクを決定するため用いることができる。したがって、測定される全c f - DNAの量が、8、9、10、

50

11、12、13、14、15、16、17、18、19または20ng/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9ng/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、20ng/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。

#### 【0034】

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、全cf-DNAの量が、本明細書において提供される閾値の1つよりも高いか、および/または経的に増大している場合、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、本明細書において提供される閾値のいずれか1つよりも高い場合、対象の処置が示され得る。量が、本明細書において提供される閾値のいずれか1つよりも高い場合、対象のさらなる検査（生検などによるもの）が示され得る。

10

#### 【0035】

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。さらなる検査の型は、対象の状態に依存し、および/または十分に当業者の決定能力の範囲内である。

20

感染が疑われる対象のための例示的なさらなる検査として、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。

#### 【0036】

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ー、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。

30

#### 【0037】

全cf-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、全cf-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、対象の核酸中の当該遺伝子座におけるヌクレオチド同一性である。

40

#### 【0038】

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。

50

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。

#### 【0039】

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)、ポロニーシークエンシング (polony sequencing)、454パイロシークエンシング、Illumina (Solexa)シークエンシング、SOLiDシークエンシング、イオン半導体シークエンシング、DNAナノボールシークエンシング、ヘリスコープ (heliscope) 单分子シークエンシング、单分子リアルタイム (SMRT) シークエンシング、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, Yinhua; 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）。

#### 【0040】

一態様において、全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。

全cf-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、全cf-DNAを決定するための方法のいずれか1つは、PCT公開番号WO2016/176662A1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。

#### 【0041】

複数のSNV標的について全cf-DNAを決定することができる。「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。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。

#### 【0042】

10

20

30

40

50

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、S N V 標的に対する1つ以上のプライマーペアは、S N V 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（遺伝子型の知識などにより）、予め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

#### 【0043】

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S N V 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、S N V 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、S N V 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。

20

#### 【0044】

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S N V 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、試料中の全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は、全核酸の量は、メジャーおよびマイナーアレルの量により決定することができる。

20

#### 【0045】

M O M A 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、P C R 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、S N V 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、S N V 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、P C R 反応などの増幅反応において増幅生成物を生成し（好適なリバースプライマーと組み合わせて）、それにより、それぞれのS N V 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S N V が存在しない場合、かつS N V 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S N V 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、特異的アレルの増幅のみをもたらす。

30

#### 【0046】

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

40

50

て、両アレル型である各々の S N V 標的に対して、2つのプライマーペアが存在し、各々が、2つのアレルのうちの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单一のミスマッチ、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 S N V 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。

#### 【 0 0 4 7 】

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 S N V 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。

#### 【 0 0 4 8 】

本明細書において記載されるプライマーペアは、P C R 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、P C R 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、P C R 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、P C R 反応におけるプライマーペアは、それらが同じP C R 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P C R 反応において多重化された場合に、それらの標的D N A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P C R 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。

#### 【 0 0 4 9 】

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、全核酸の量を定量するために、P C R 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。

#### 【 0 0 5 0 】

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

10

20

30

40

50

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。

#### 【0051】

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。

10

#### 【0052】

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いてよく、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、純粹な色素のスペクトルを用いて補正してもよい。

20

#### 【0053】

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。

30

#### 【0054】

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。

40

#### 【0055】

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、

50

SYBR (登録商標) Green 色素シグナルは増大するであろう。

【0056】

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、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。

10

【0057】

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 maritime*(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 MasterTaq(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)が挙げられる。

20

【0058】

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<sub>2</sub>、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1.5~2.0nM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、錆型、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<sup>2+</sup>]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<sup>2+</sup>]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0.1mMまたは0.5mMの増加において約5mMまで補充することにより、最適化することができる。

30

【0059】

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、標的核酸の增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10μM~約500μM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。

40

50

## 【0060】

いくつかの態様において、P C R 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、P C R 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 . 0 5  $\mu$  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 n M ~ 約 1  $\mu$  M である。本開示に従うプライマーは、P C R 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、G C 含有量、純度、標的D N A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。

10

## 【0061】

いくつかの態様において、P C R 反応の熱プロフィールを、改変または最適化する。P C R 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。

P C R 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P C R 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。

20

## 【0062】

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。

P C R 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、增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D N A ）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。

30

試料中の全セルフリーD N A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D N Aは、RNase Pを標的として用いて、TAQMAN（商標）リアルタイムP C Rにより決定される。

## 【0063】

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全フリーD N A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D N Aを単離するための例示的な方法を記載する。E D T AまたはD T Aなどの抗凝固剤を含む血液を、対象から採取する。c f - D N A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、c f - D N Aを抽出する。c f - D N A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 D N A

40

50

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.5 205-5210 ; 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）。 10

#### 【0064】

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15ngのセルフリーアクティベーター-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4uMであった。試料は、約25サイクルを経る。反応は、合計で25uL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。 20

#### 【0065】

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。

#### 【0066】

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ができる。 30

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、同時にを行うことを含んでもよい。

#### 【0067】

通常の用語、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、(当該通常の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、その後に列記される項目および

10

20

30

40

50

さらなる項目を包含することを意図される。

【0068】

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。

【0069】

例

例1 - コンピューターにより実行される態様の例

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2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2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。

【0070】

図2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、全核酸（セルフリーDNAなど）の量を決定する（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。

【0071】

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、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。

10

20

30

40

50

## 【0072】

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

## 【0073】

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

## 【0074】

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ーを含んでもよく、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ー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

## 【0075】

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。

## 【0076】

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についての全核酸（セルフリーDNAなど）の量を閾値と比較することにより、対象802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802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。

40

50

## 【0077】

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810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802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、これらの場合には、対象802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802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810Aと同じであっても異なってい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。

## 【0078】

いくつかの態様において、診断設備は、対象802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802についての1つ以上の試料806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。

## 【0079】

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802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。

## 【0080】

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802および／または医師（医師804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814（デバイス814A、814B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812を介してデバイス814に伝達することができる。

## 【0081】

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

10

20

30

40

50

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、1つ以上の専用プロセッサーまたは多目的プロセッサー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ー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いてもよいことが、理解されるべきである。

10

#### 【0082】

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ーコードを含むソフトウェアとして実装された、コンピューター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ー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

#### 【0083】

本明細書において記載される技術をコンピューター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ー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、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ー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ーに特定の演算子(operational role)を実行させる、コンピューター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ー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

#### 【0084】

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/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。

40

#### 【0085】

50

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

#### 【0086】

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

#### 【0087】

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2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ー）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ーは、コンピューター処理デバイスまたはプロセッサー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单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な系と統合されて、その作動を指揮することができる。

40

#### 【0088】

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

50

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、プロセッサー、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。

## 【0089】

10

## 例2 - 全セルフリー-DNA (cf-DNA) の移植合併症との相関

移植レシピエントの全cf-DNAを、上記の方法を用いて定量した。全cf-DNAと様々な移植合併症との間の相関を試験して、グラフによる結果を、図3～14において表す。

死亡結果分析の統計学を、以下の表1において表す。

表1. 死亡結果の統計学のまとめ

## 【表1】

20

	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	$-3.3358 + 0.0480 * \text{全cfDNA}$ ( $p=0.01$ )

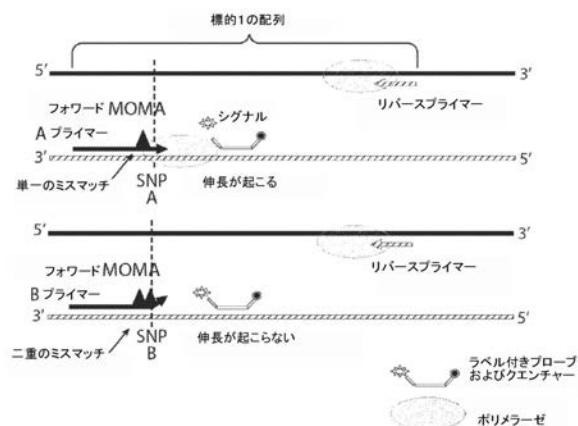
## 【0090】

## 例3 - 全セルフリー-DNA (cf-DNA) の移植合併症との相関

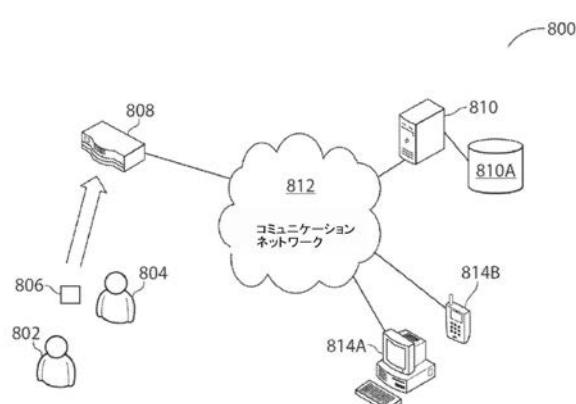
心臓移植レシピエントから、移植、任意の拒絶のための処置、再入院の時点周辺において、および生検および/または脈管障害の前に、プロスペクティブに血液試料を採取した。cf-DNAを定量した。全cf-DNAと様々な移植合併症との間の相関を試験し、表およびグラフによる結果を、図15～20において提示する。生検および脈管障害、ならびに心停止、死亡、および感染のための処置の結果は、15ナノグラム/ミリリットル (ng/mL) のカットポイントにおいてcf-DNAレベルと相関した。88人のレシピエントからの298の試料を分析した。>15ng/mLのcf-DNAは、死亡 [p < 0.001、OR: 20.10 (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。

30

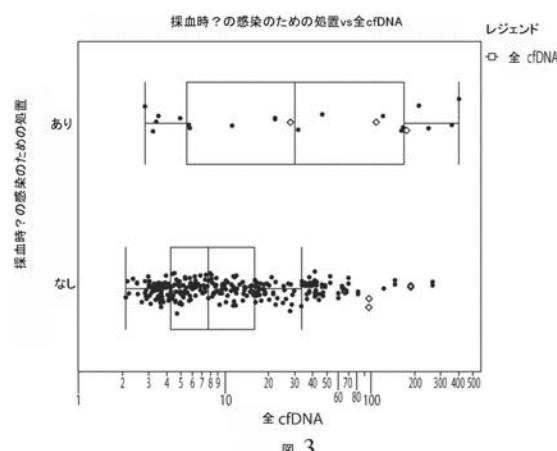
【図1】



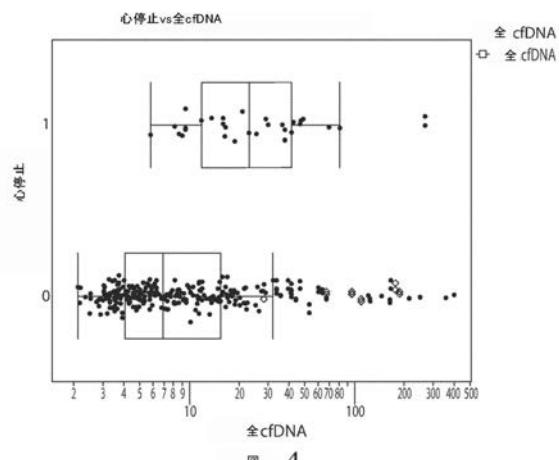
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

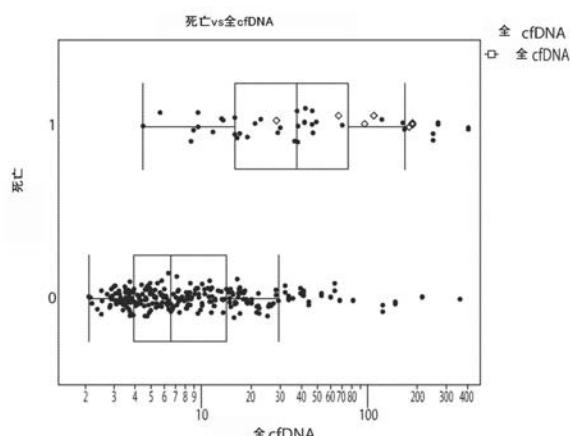


図5

【図6】

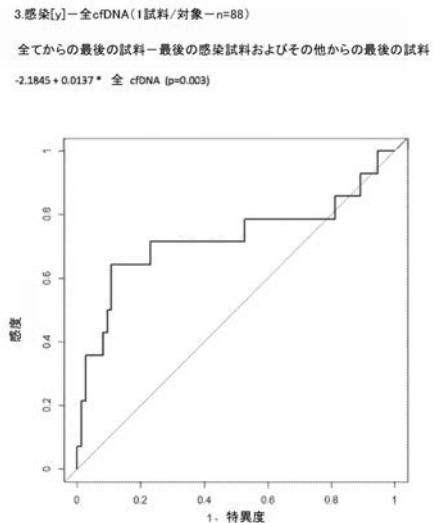
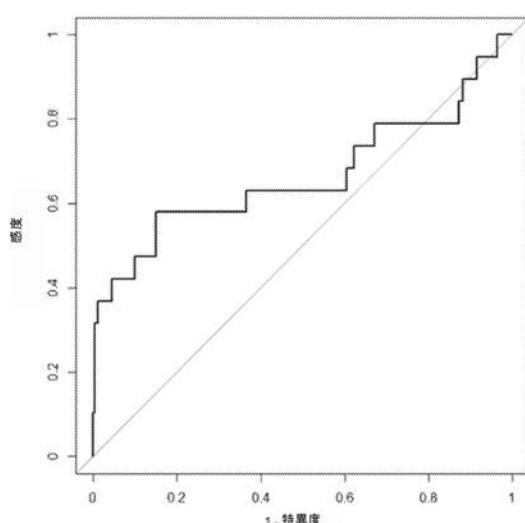


図6

【図7】

2.感染[y]—全cfDNA(メッシュ支持体は除外)

6の機械的支持試料を除外した

 $-3.0884 + 0.0159 * \text{全 cfDNA}$  ( $p<0.0001$ )

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

図7

【図8】

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

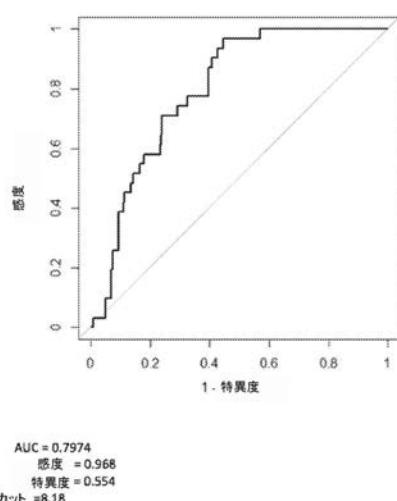
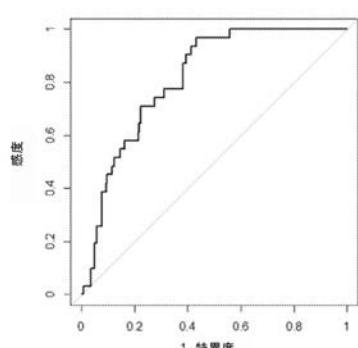


図8

【図9】

2.停止－全cfDNA(メッシュ支持体除外後、292の試料)

全292を用いた

-2.3036 + 0.0005 \* 全 cfDNA ( $p=0.04$ )

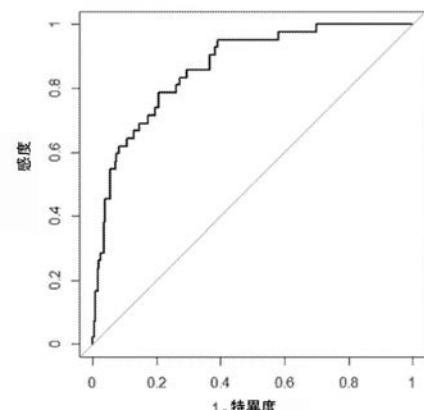
AUC = 0.8131  
感度 = 0.968  
特異度 = 0.567  
カットオフ = 9.06

図9

【図10】

1.死亡－全cfDNA(全298試料)

全298を用いた

-1.9463 + 0.0023 \* 全 cfDNA ( $p=0.03$ )

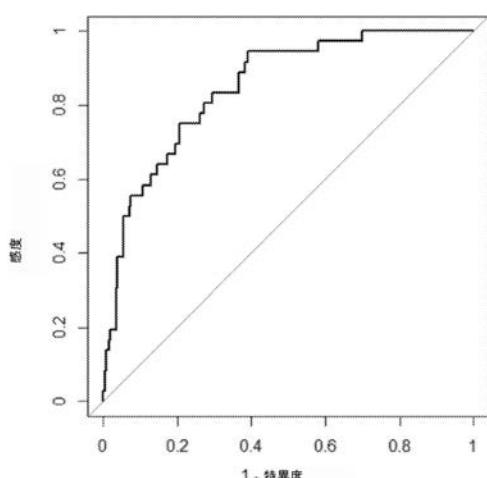
AUC = 0.8664  
感度 = 0.786  
特異度 = 0.793  
カットオフ = 15.96

図10

【図11】

2.死亡－全cfDNA(メッシュ支持体は除外)

6の機械的支持試料を除外した

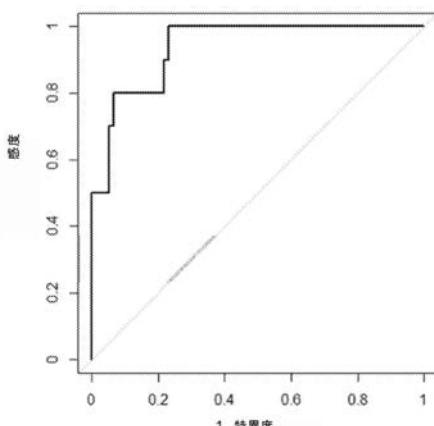
-2.0805 + 0.0019 \* 全 cfDNA ( $p=0.04$ )

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

図11

【図12】

3.死亡(1試料/対象-n=88)  
全てからの最後の試料(N=88)  
-3.3358 + 0.0480 \* 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12

【図 13】

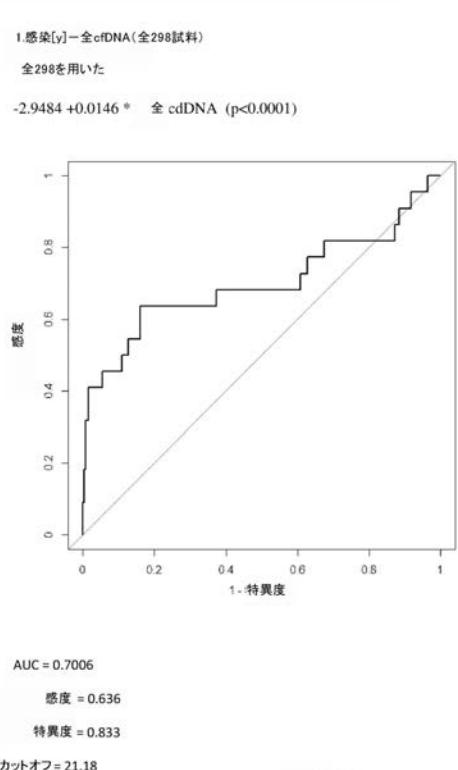


図 13

【図 14】

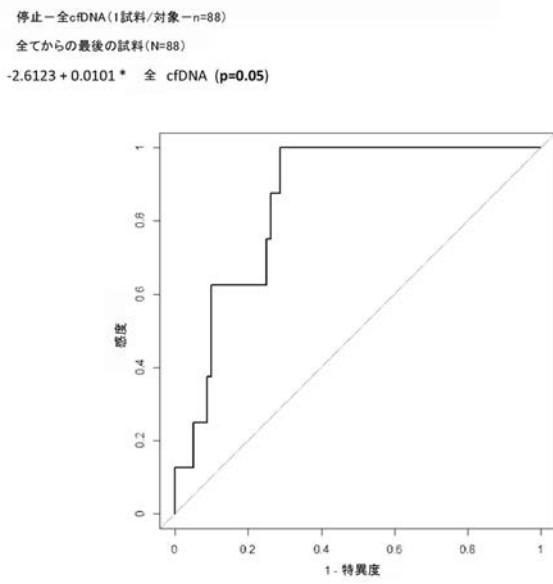


図 14

【図 15】

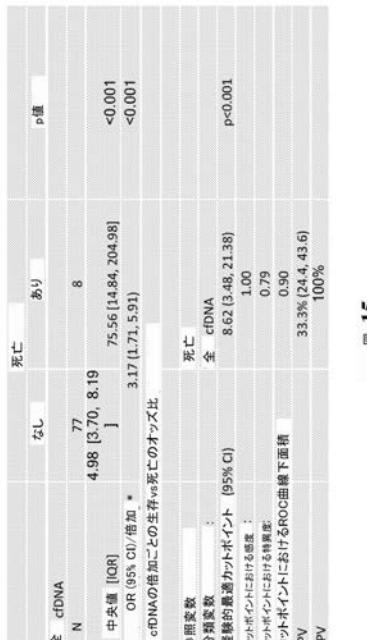


図 15

【図 16】

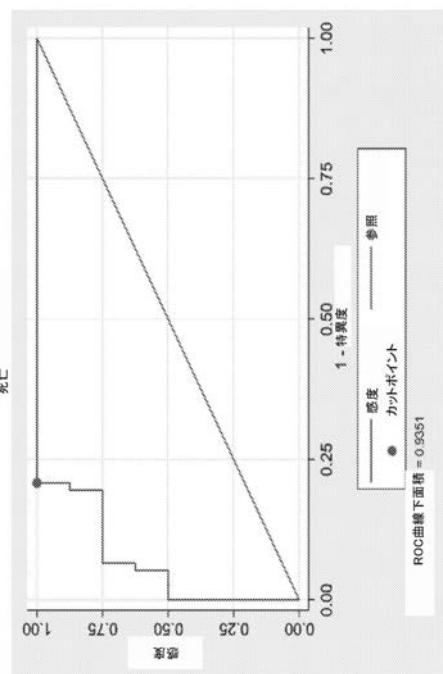


図 16

【図17】

採血時の感染のための処置		検査無仮説、		統計学的試験	
なし	あり	感染のための処置間で、	中央値	OR (95% CI) / 倍加*	p値
中央値 [IQR]	中央値 [IQR]	中央値は同じである	19		
273	19				
N					
全 cDNA	21.97 [4.29, 15.94]	p=0.343			
全立試料	21.97 [4.98, 16.07]				
立中失値試験					
カットポイント推定					
参考文献					
分類変数					
全 cDNA	21.44 [10.17, 45.18]	p<0.001			
経験的最高カットポイント (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				
PPV	21.2% (14.3, 30.2)				
NPV	96.7% (94.5, 98.0)				

図17

【図18】

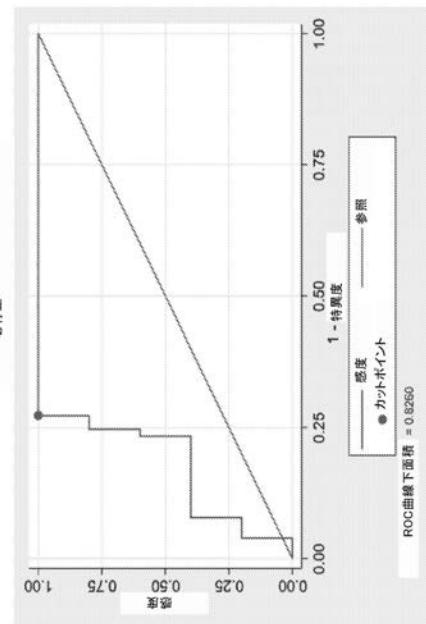


図18

【図19】

採血時の感染のための処置		検査無仮説、		統計学的試験	
なし	あり	感染のための処置間で、	中央値	OR (95% CI) / 倍加*	p値
中央値 [IQR]	中央値 [IQR]	中央値は同じである	19		
273	19				
N					
全 cDNA	21.97 [4.29, 15.94]	p=0.343			
全立試料	21.97 [4.98, 16.07]				
立中失値試験					
カットポイント推定					
参考文献					
分類変数					
全 cDNA	21.44 [10.17, 45.18]	p<0.001			
経験的最高カットポイント (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				
PPV	21.2% (14.3, 30.2)				
NPV	96.7% (94.5, 98.0)				

図19

【図20】

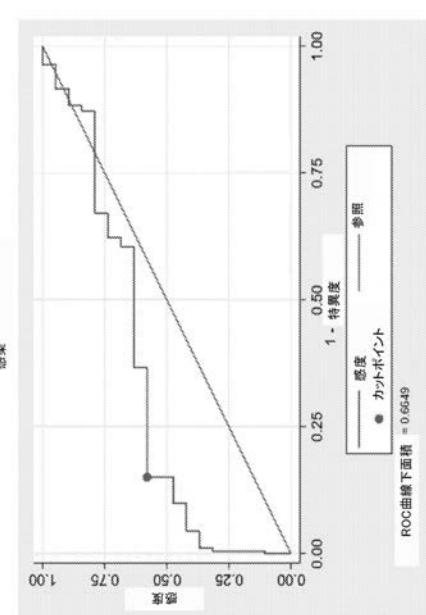


図20

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/38598
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C12Q 1/68, C12Q 1/6809, C12Q 1/6883 (2018.01) CPC - C12Q 1/6883, C12Q 2600/118, C12Q 1/6827, C12Q 2600/156, C12Q 1/6858, C12Q 1/686, C12Q 1/6809		
<b>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</b>		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0086477 A1 (MEDICAL COLLEGE OF WISCONSIN, INC.) 26 March 2015 (26.03.2015), para [0004], [0012], [0056], [0074], [0077], [0080], [0121]	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 8 August 2018	Date of mailing of the international search report <b>07 SEP 2018</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer: <b>Lee W. Young</b> <small>PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774</small>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 18/38698						
<b>Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)</b>								
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: . because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: . because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 6 - 43 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>								
<b>Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)</b>								
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.: .</p> <p>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: .</p>								
<p><b>Remark on Protest</b></p> <table> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/></td> <td>No protest accompanied the payment of additional search fees.</td> </tr> </table>			<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.	<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.	<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.							
<input type="checkbox"/>	The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.							
<input type="checkbox"/>	No protest accompanied the payment of additional search fees.							

---

フロントページの続き

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT

(72)発明者 ミッケル,ミカエル

アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 53122、エルム グローブ、ストーンフィールド コート 13835

F ターム(参考) 2G045 AA25 CA25 CA26 DA13 FB01 FB02  
4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ08 QQ42 QR08 QR32 QR42  
QR56 QR62 QS25 QS34 QX02 QX10