(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-509966
(P2025-509966A)
(43)公表日　令和7年4月11日(2025.4.11)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ｃ１２Ｑ	*1/6869(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6869	ＺＺＮＡ	４Ｂ０６３
Ｃ１２Ｑ	*1/686(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/686	Ｚ	４Ｃ０８４
Ｃ１２Ｑ	*1/6851(2018.01)*	Ｃ１２Ｑ	1/6851	Ｚ	
Ａ６１Ｐ	*37/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	37/06		
Ａ６１Ｋ	*45/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	45/00		

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全72頁）

(21)出願番号　特願2024-556143(P2024-556143)
(86)(22)出願日　令和5年3月21日(2023.3.21)
(85)翻訳文提出日　令和6年9月20日(2024.9.20)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/064790
(87)国際公開番号　WO2023/183826
(87)国際公開日　令和5年9月28日(2023.9.28)
(31)優先権主張番号　63/322,144
(32)優先日　令和4年3月21日(2022.3.21)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,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
最終頁に続く

(71)出願人　314015136
ケアディーエックス， インコーポレイテッド
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００５， ブリズベン， ベイショア ブールバード ３２６０
(74)代理人　100078282
弁理士　山本 秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下 夏樹
(74)代理人　100181674
弁理士　飯田 貴敏
(74)代理人　100181641
弁理士　石川 大輔
(74)代理人　230113332
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　異種間移植における臓器の健康を非侵襲的に監視する方法

(57)【要約】
本開示は、移植レシピエントにおける異種間移植片の状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための方法、並びに免疫抑制療法を監視する、施す、及び調整するための方法に関する。本開示は、移植片の健康状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための、並びにドナー及びレシピエントが異なる種に属するドナーからの臓器、細胞、又は組織移植片のレシピエントにおける移植拒絶反応状態を検出、予測、及び／又は監視するための、高感度で非侵襲的な方法及びキットを記載する。そのような方法及びキットは、移植後の血液、血清、血漿、又は尿を含むが、これらに限定されない体液中のＤＮＡ又はＲＮＡなどのドナー特異的核酸の検出及び定量に基づく。

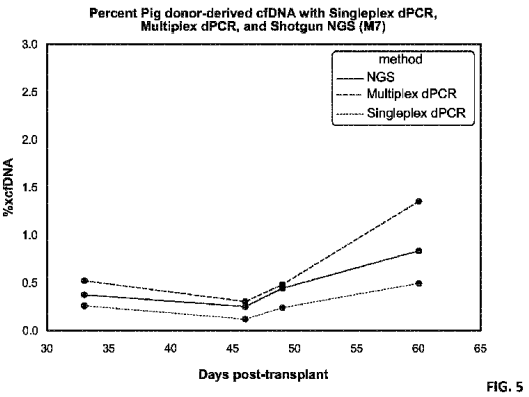


FIG. 5

【特許請求の範囲】
【請求項１】
移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための方法であって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、
ａ）前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の前記移植レシピエントからのサンプルを提供することと、
ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、前記無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された前記配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応する、決定すること、並びに前記生成された配列リードを少なくとも前記ドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、
ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、を含む、方法。
【請求項２】
ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照を前記サンプルに添加することを更に含み、前記スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記決定するステップが、前記生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
配列決定リードが、前記ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される、請求項１～３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５】
ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６】
領域が、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項１～４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
ドナーからの移植片のレシピエントにおける移植拒絶反応を治療するための方法であって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、
ａ）前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、
ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、前記無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された前記配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応する、決定すること、並びに前記生成された配列リードを少なくとも前記ドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、

ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、
ｄ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、前記移植レシピエントに免疫抑制治療を施すことと、を含む、方法。
【請求項９】
ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照を前記サンプルに添加することを更に含み、前記スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記決定するステップが、前記生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む、請求項８又は９に記載の方法。
【請求項１１】
配列決定リードが、前記ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される、請求項８～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項８～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１３】
領域が、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項８～１１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
ドナーからの移植片のレシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法であって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、
ａ）前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、
ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、前記無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された前記配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応する、決定すること、並びに前記生成された配列リードを少なくとも前記ドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、
ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、
ｄ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、前記移植レシピエントに施されている免疫抑制治療を調整することと、を含む、方法。
【請求項１６】
ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照を前記サンプルに添加することを更に含み、前記スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される、請求項１５に記載の方法。
【請求項１７】
前記決定するステップが、前記生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む、請求項１５又は１６に記載の

方法。
【請求項１８】
配列決定リードが、前記ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される、請求項１５～１７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１９】
ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２０】
領域が、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する、請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、前記ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、前記領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い、請求項１５～１８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記ハイスループット配列決定アッセイが、次世代配列決定アッセイを含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための方法であって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、
ａ）移植後の前記移植レシピエントからのサンプルであって、前記サンプルが、前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、サンプルを提供することと、
ｂ）ＰＣＲアッセイによって、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、
（ｉ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は
（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、
ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、
ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、を含む、方法。
【請求項２４】
前記ＰＣＲアッセイが、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、リアルタイムＰＣＲ定量である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２５】
前記ＰＣＲアッセイが、デジタルＰＣＲアッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、エンドポイントＰＣＲ定量である、請求項２３に記載の方法。
【請求項２６】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、
（ａ）単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は
（ｂ）単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１

つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、を含む、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記デジタルＰＣＲアッセイが、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである、請求項２５に記載の方法。

【請求項２８】

前記デジタルＰＣＲアッセイが、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、

（ａ）前記第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、

（ｂ）前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項２６に記載の方法。

【請求項２９】

前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項２８に記載の方法。

【請求項３０】

前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが

（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び

（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項２７に記載の方法。

【請求項３１】

前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項２７又は３０に記載の方法。

【請求項３２】

移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応を治療するための方法であって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、

ａ）移植後の前記移植レシピエントからのサンプルであって、前記サンプルが、前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、サンプルを提供することと、

ｂ）ＰＣＲアッセイによって、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、

（ｉ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は

（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、

ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、

ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、

ｄ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、前記移植レシピエントに免疫抑制治

療を施すことと、を含む、方法。
【請求項３３】
前記ＰＣＲアッセイが、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、リアルタイムＰＣＲ定量である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記ＰＣＲアッセイが、デジタルＰＣＲアッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、エンドポイントＰＣＲ定量である、請求項３２に記載の方法。
【請求項３５】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、
（ａ）単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は
（ｂ）単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、を含む、請求項３４に記載の方法。
【請求項３６】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである、請求項３４に記載の方法。
【請求項３７】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、
（ａ）前記第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、
（ｂ）前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項３５に記載の方法。
【請求項３８】
前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが
（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び
（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項３６に記載の方法。
【請求項４０】
前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項３６又は３９に記載の方法。
【請求項４１】
ドナーからの移植片のレシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法であっ

て、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記方法が、
ａ）移植後の移植レシピエントからのサンプルであって、前記サンプルが、前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、サンプルを提供することと、
ｂ）ＰＣＲアッセイによって、前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、
（ｉ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は
（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、
ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、
ｃ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、
ｄ）前記ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、前記移植レシピエントに施されている免疫抑制治療を調整することと、を含む、方法。
【請求項４２】
前記ＰＣＲアッセイが、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、リアルタイムＰＣＲ定量である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
前記ＰＣＲアッセイが、デジタルＰＣＲアッセイであり、前記ＰＣＲ定量が、エンドポイントＰＣＲ定量である、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、
（ａ）単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は
（ｂ）単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイであって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、を含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである、請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、
（ａ）前記第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、
（ｂ）前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項４４に記載の方法。
【請求項４７】
前記第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項４６に記載の方法。
【請求項４８】

前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが
（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び
（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項４５に記載の方法。
【請求項４９】
前記マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイが、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項４５又は４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記方法が、感染因子の存在について試験することを更に含む、請求項１～４９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記感染因子が、ウイルス、細菌、真菌、及び寄生生物からなる群から選択される、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記感染因子が、サイトメガロウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アネロウイルス科（Anelloviridae）、及びＢＫウイルスからなる群から選択されるウイルスである、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記方法が、レシピエントにおいて、１つ以上の遺伝子発現プロファイリングアッセイを実施することを更に含む、請求項１～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
組み合わせスコアが、前記サンプル中の前記ドナー由来の無細胞核酸の量及び前記遺伝子発現プロファイリングアッセイの結果に基づいて計算される、請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するためのキットであって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属し、前記キットが、
（ａ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー由来の無細胞核酸をＰＣＲ定量するための、前記移植レシピエントからのサンプル中の無細胞核酸中のドナー特異的又はレシピエント特異的標的配列にハイブリダイゼーションする１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットと、
（ｂ）ドナー由来の無細胞核酸の量を決定するためのデータ分析のための説明書と、を含む、キット。
【請求項５６】
前記ＰＣＲ定量が、ｑＰＣＲ定量である、請求項５５に記載のキット。
【請求項５７】
前記ＰＣＲ定量が、デジタルＰＣＲ定量である、請求項５５に記載のキット。
【請求項５８】
前記ドナー由来及び／又は前記レシピエント由来の無細胞核酸が、ＤＮＡである、請求項１～５４のいずれか一項に記載の方法又は請求項５５～５７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項５９】

前記ドナー由来及び／又は前記レシピエント由来の無細胞核酸が、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、又はそれらの組み合わせである、請求項１～５４のいずれか一項に記載の方法、又は請求項５５～５７のいずれか一項に記載のキット。

【請求項６０】

前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のゲノム長の差を補正するための補正因子で調整される、請求項１～２２及び５８～５９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６１】

前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、前記ドナー由来である無細胞核酸と前記レシピエント由来である無細胞核酸との間の無細胞核酸断片サイズ差を補正するための補正因子で調整される、請求項１～２２及び５８～６０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６２】

前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、ドナー由来の無細胞核酸の全無細胞核酸又はレシピエント由来の無細胞核酸に対する比である、請求項１～５４及び５８～６１のいずれか一項に記載の方法、又は請求項５５～５９のいずれか一項に記載のキット。

【請求項６３】

前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、全無細胞核酸と比較したドナー由来の無細胞核酸のパーセンテージである、請求項１～５４及び５８～６１のいずれか一項に記載の方法又は請求項５５～５９のいずれか一項に記載のキット。

【請求項６４】

前記移植片が、実質臓器、組織、又は細胞移植片である、請求項１～５４及び５８～６３のいずれか一項に記載の方法、又は請求項５５～５９及び６２～６３のいずれか一項に記載のキット。

【請求項６５】

前記移植片の前記ドナーが、動物である、請求項６４に記載の方法又はキット。

【請求項６６】

前記動物が、ブタである、請求項６５に記載の方法又はキット。

【請求項６７】

前記次世代配列決定アッセイが、アンプリコンに基づくものである、請求項２２に記載の方法。

【請求項６８】

前記次世代配列決定アッセイが、アンプリコンに基づかないものである、請求項２２に記載の方法。

【請求項６９】

ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントであって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属する、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントからの生体サンプルを分析するための方法であって、前記方法が、

ａ）無細胞核酸であって、前記無細胞核酸が、前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、無細胞核酸を、前記移植レシピエントからの生体サンプルから単離することと、

ｂ）前記無細胞核酸の標的領域であって、前記標的領域が、ドナー特異的であるヌクレオチド配列を含む１つ以上の標的領域及び／又はレシピエント特異的であるヌクレオチド配列を含む１つ以上の標的領域を含む、標的領域を増幅することによってアンプリコンを生成することと、

ｃ）前記アンプリコンを配列決定することによって、生成された前記アンプリコンから配列リードを生成することであって、

生成された前記配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列に対応する１つ以上の配列リード及び／又はレシピエント特異的ゲノム配列に対応する１つ以上の配列リードを含む、生成すること、並びに

任意選択で、前記生成された配列リードを少なくともドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、任意選択で、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、
ｃ）前記サンプル中の前記生成された配列リードから無細胞核酸の量を定量することと、を含む、方法。
【請求項７０】
前記無細胞核酸の量が、前記サンプル中の移植ドナー由来の無細胞核酸の量である、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記無細胞核酸の量が、前記サンプル中の全無細胞核酸の量である、請求項６９に記載の方法。
【請求項７２】
１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照を前記サンプルに添加することと、前記１つ以上のスパイクイン核酸対照を配列決定することによって前記１つ以上のスパイクイン核酸対照に対応する配列リードを生成することと、を更に含み、前記スパイクイン対照に対応する配列リードが、前記サンプル中の全無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される、請求項６９又は７１に記載の方法。
【請求項７３】
１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照を前記サンプルに添加することと、前記１つ以上のスパイクイン核酸対照を配列決定することによって前記１つ以上のスパイクイン核酸対照に対応する配列リードを生成することと、を更に含み、前記スパイクイン対照からの配列リードが、前記サンプル中の移植ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される、請求項６９又は７０に記載の方法。
【請求項７４】
前記１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照が、ステップａ）の前に添加される、請求項７２又は７３に記載の方法。
【請求項７５】
前記１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照が、ステップａ）の後に添加される、請求項７２又は７３に記載の方法。
【請求項７６】
前記１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照が、ステップａ）の前及び後に添加される、請求項７２又は７３に記載の方法。
【請求項７７】
ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のゲノム長の差を補正するための補正因子を使用して、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差を考慮することを含む、請求項６９～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントであって、前記ドナー及び前記レシピエントが、異なる種に属する、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントからの生体サンプルを分析するための方法であって、前記方法が、
ａ）無細胞核酸であって、前記無細胞核酸が、前記ドナー由来である無細胞核酸及び前記レシピエント由来である無細胞核酸を含む、無細胞核酸を、前記レシピエントからの生体サンプルから単離すること、
ｂ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、デジタルＰＣＲアッセイであって、前記デジタルＰＣＲアッセイが
（ｉ）１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイ、又は
（ｉｉ）１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的及び１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイを含む、デジタルＰＣＲアッセイによって、決定すること、を含み

、
前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、前記レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、
前記ドナー由来の無細胞核酸の量が、
（ｉ）前記サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は
（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、
ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のデジタルＰＣＲ定量によって、決定される、方法。
【請求項７９】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、（ａ）単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対する第１のデジタルＰＣＲアッセイであって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、第１のデジタルＰＣＲアッセイと、（ｂ）単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対する第２のデジタルＰＣＲアッセイであって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、第２のデジタルＰＣＲアッセイと、を含む、請求項７８に記載の方法。
【請求項８０】
前記第２のデジタルＰＣＲアッセイが、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、前記レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、前記ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである、請求項７８に記載の方法。
【請求項８２】
前記デジタルＰＣＲアッセイが、複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、前記ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである、請求項８１に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、２０２２年３月２１日に出願された米国仮出願第６３／３２２，１４４号の利益を主張し、これは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００２】
（電子配列表への参照）
電子配列表の内容（５０６６１２００３０４０ＳＥＱＬＩＳＴ．ｘｍｌ、サイズ：２１０７５バイト、及び作成日：２０２３年３月２１日）は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。
【０００３】
（発明の分野）
本明細書では、臓器、細胞、又は組織の異種間移植片の状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための方法及びキット、並びにそれに関連する治療方法が提供される。
【背景技術】
【０００４】
ある種から別の種への細胞、組織、又は臓器の移植である異種間移植又は異種移植は、移植に利用可能なヒト臓器、細胞、及び組織の深刻な不足に対する有望な解決策である。

しかしながら、異種間移植では、少なくとも部分的に、異種間の感染の伝染の可能性、移植レシピエントによる免疫拒絶反応、並びにドナーとレシピエントとの間の遺伝的、解剖学的、及び生理学的な差に起因する課題が提示される。異種間移植片の免疫拒絶反応は、移植レシピエントにおける獲得免疫及び自然免疫の両方を介して媒介される場合がある。いくつかの場合では、異種間移植に対するレシピエントの免疫応答は、超急性拒絶反応、急性抗体媒介性拒絶反応、急性細胞拒絶反応、又は混合抗体媒介及び細胞拒絶反応をもたらす場合がある。例えば、Ｌｕ ｅｔ ａｌ.「Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｓｔａｔｕｓ ｉｎ Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ.」Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ.１０ ３０６０.２３ Ｊａｎ.２０２０を参照されたい。したがって、異種間移植片の免疫拒絶反応を予防又は阻害するために、レシピエントの免疫系を医学的に抑制することが必要である。

【０００５】

移植後、移植片の評価機能及び移植片の免疫媒介性拒絶反応を含む移植レシピエントにおける移植片の状態は、レシピエントの生涯にわたって監視される場合がある。心臓移植において、例えば、拒絶反応についての監視は、病理学者による組織学的評価のための心筋の標本を提供するために、移植の最初の１年以内に最大１５回の予定された生検を含む場合がある。各生検処置は、侵襲的で、ストレスが多く、不便で、患者にとって処置上のリスクがあるだけでなく、高価である。更に、生検サンプリングは、非常に局所的であるため、心臓の任意の非生検領域における組織学的異常が見逃される。生検の等級付けは、主観的であり、独立した病理学者間で生検所見の不一致は、ありふれている。更に、生検は、移植後最初の１年以内の移植拒絶反応の監視のために主に使用されるが、この侵襲的方法は、より長期の（例えば、移植後１年を超える）個別化された免疫抑制療法を導くために十分に適合されていないか、又は確立されていない。同種異系移植片、すなわち、同じ種内の遺伝的バリエーション、例えば、一塩基多型（single nucleotide polymorphism、ＳＮＰ）又はヒト白血球抗原（human leukocyte antigen、ＨＬＡ）遺伝子に基づく多型に基づいて、単一種のメンバー間の移植片の状態を評価するための臨床検査が開発されている。しかし、これらの実験室試験は、ドナー及びレシピエントが異なる種に属する移植片の状態を評価するために適用できないか、又は十分に適合されていない場合がある。

したがって、移植レシピエントにおける異種間移植片の状態を検出、予測、診断、及び／又は監視する改善された非侵襲的方法、並びに異種間移植片の移植レシピエントに免疫抑制療法を施すか又は施されている免疫抑制療法を調整する必要性を決定する方法が必要とされている。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｌｕ ｅｔ ａｌ.「Ｘｅｎｏｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ：Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｓｔａｔｕｓ ｉｎ Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ.」Ｆｒｏｎｔｉｅｒｓ ｉｎ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ｖｏｌ.１０ ３０６０.２３ Ｊａｎ.２０２０

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【０００７】

一態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応す

る、決定すること、並びに生成された配列リードを少なくともドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、方法は、ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照をサンプルに添加することを更に含み、スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、決定するステップは、生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む。いくつかの実施形態では、配列決定リードは、ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される。いくつかの実施形態では、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態は、領域は、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態では、ハイスループット配列決定アッセイは、次世代配列決定アッセイを含む。

【０００８】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ドナーからの移植片のレシピエントにおける移植拒絶反応を治療するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応する、決定すること、並びに生成された配列リードを少なくともドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに免疫抑制治療を施すことと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、方法は、ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照をサンプルに添加することを更に含み、スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、決定するステップは、生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む。いくつかの実施形態では、配列決定リードは、ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される。いくつかの実施形態では、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態は、領域は、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態では、ハイスループット配列決定アッセイは、次世代配列決定アッセイを含む。

【０００９】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ドナーからの移植片のレシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に

属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ハイスループット配列決定アッセイにおいて、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、無細胞核酸から配列リードを生成することによって決定することであって、生成された配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列に対応する、決定することと、並びに生成された配列リードを少なくともドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに施されている免疫抑制治療を調整することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、方法は、ステップａにおいて、定量的スパイクイン核酸対照をサンプルに添加することを更に含み、スパイクイン対照からの配列リードが、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、決定するステップは、生成された配列リードをドナー特異的ゲノム配列及びレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む。いくつかの実施形態では、配列決定リードは、ゲノムの選択されたサイズの領域から生成される。いくつかの実施形態では、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のサイズ差は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジを利用することによって考慮され、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態は、領域は、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基のサイズを有する。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージであり、領域が、十分なカバレッジを有するのに十分大きく、バックグラウンドノイズが、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの実施形態では、ハイスループット配列決定アッセイは、次世代配列決定アッセイを含む。

【００１０】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、分析されたサンプルの量に関して、又はドナー由来の無細胞核酸の全ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のデジタルＰＣＲ定量によって決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を、デジタルＰＣＲアッセイによって決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、１つ以上のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一のデジタルＰＣＲ反応における２つ以上のＰＣＲアッセイからなるマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイである。いくつかの実施形態では、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける単一コピーのレシピエント特異的標的を有し、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける少なくとも１又は２個の単一コピーのレシピエント特異的標的、及び半数体ドナーゲノムにおける少なくとも１つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、各ＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。

【００１１】
別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応を治療するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、分析されたサンプルの量に関して、又はドナー由来の無細胞核酸の全ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のデジタルＰＣＲ定量によって決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を、デジタルＰＣＲアッセイによって決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに免疫抑制治療を施すことと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、１つ以上のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一のデジタルＰＣＲ反応における２つ以上のＰＣＲアッセイからなるマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイである。いくつかの実施形態では、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける単一コピーのレシピエント特異的標的を有し、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける少なくとも１又は２個の単一コピーのレシピエント特異的標的、及び半数体ドナーゲノムにおける少なくとも１つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、各ＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。

【００１２】
別の態様では、本明細書で提供されるのは、ドナーからの移植片のレシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、分析されたサンプルの量に関して、又はドナー由来の無細胞核酸の全ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のデジタルＰＣＲ定量によって決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を、デジタルＰＣＲアッセイによって決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに施されている免疫抑制治療を調整することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、１つ以上のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一のデジタルＰＣＲ反応における２つ以上のＰＣＲアッセイからなるマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイである。いくつかの実施形態では、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける単一コピーのレシピエント特異的標的を有し、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムにおける少なくとも１又は２個の単一コピーのレシピエント特異的標的、及び半数体ドナーゲノムにおける少なくとも１つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的を有する。いくつか

の実施形態では、各ＰＣＲアッセイは、半数体ドナーゲノムにおける２コピー又はより多くのコピーのドナー特異的標的を有する。

【００１３】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、方法は、感染因子の存在について試験することを更に含む。いくつかの実施形態では、感染因子は、ウイルス、細菌、真菌、又は寄生生物から選択される。いくつかの実施形態では、感染因子は、サイトメガロウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アネロウイルス科（Ａｎｅｌｌｏｖｉｒｉｄａｅ）、又はＢＫウイルスから選択されるウイルスである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、方法は、レシピエントにおいて、１つ以上の遺伝子発現プロファイリングアッセイを実施することを更に含む。いくつかの実施形態では、組み合わせスコアは、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量及び遺伝子発現プロファイリングアッセイの結果に基づいて計算される。

【００１４】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するためのキットであって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、キットが、分析されるサンプルの量に関して、又は分析される全無細胞核酸に関して、ドナー由来の無細胞核酸のデジタルＰＣＲ定量のための、移植レシピエントからの無細胞核酸中のドナー特異的又はレシピエント特異的標的配列にハイブリダイゼーションする１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットと、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定するためのデータ分析のための説明書と、を含む、キットである。

【００１５】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸は、ＤＮＡである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、又はそれらの組み合わせである。

【００１６】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のゲノム長の差を補正するための補正因子で調整される。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナー由来である無細胞核酸とレシピエント由来である無細胞核酸との間の無細胞核酸断片サイズ差を補正するための補正因子で調整される。

【００１７】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナー由来の無細胞核酸の全無細胞核酸又はレシピエント由来の無細胞核酸に対する比である。いくつかの実施形態では、比は、全無細胞核酸又はレシピエント由来の無細胞核酸の質量に対するドナー由来の無細胞核酸質量の比である。いくつかの実施形態では、比は、全無細胞核酸ゲノム又はレシピエント由来の無細胞核酸ゲノムコピー等価物に対するドナー由来の無細胞核酸ゲノムコピー等価物の比である。

【００１８】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、全無細胞核酸と比較したドナー由来の無細胞核酸のパーセンテージである。いくつかの実施形態では、パーセンテージは、全無細胞核酸の質量と比較したドナー由来の無細胞核酸の質量のパーセンテージである。いくつかの実施形態では、パーセンテージは、全無細胞核酸ゲノムコピー等価物と比較したドナー由来の無細胞核酸ゲノムコピー等価物のパーセンテージである。

【００１９】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、移植片は、実質臓器、組織、又は細胞移植片である。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、移植片のドナーは、動物である。いくつかの実施形態では、動物は、ブタである。

【００２０】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、次世代配列決定アッセイは、アンプリコンに基づくものである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、次世代配列決定アッセイは、アンプリコンに基づかないものである。

【００２１】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）移植後の移植レシピエントからのサンプルであって、サンプルがドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ＰＣＲアッセイによって、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、（ｉ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、定量的ＰＣＲ（quantitative PCR、ｑＰＣＲ）アッセイであり、ＰＣＲ定量は、リアルタイムＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、デジタルＰＣＲアッセイであり、ＰＣＲ定量は、エンドポイントＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は（ｂ）レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも、１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、（ａ）第１のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、（ｂ）第２のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標

的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。

【００２２】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移植片の移植拒絶反応を治療するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）移植後の移植レシピエントからのサンプルであって、サンプルがドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レシピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ＰＣＲアッセイによって、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、（ｉ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに免疫抑制治療を施すことと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイであり、ＰＣＲ定量は、リアルタイムＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、デジタルＰＣＲアッセイであり、ＰＣＲ定量は、エンドポイントＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は（ｂ）レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、（ａ）第１のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、（ｂ）第２のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに対するものである。

【００２３】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ドナーからの移植片のレシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法であって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、方法が、ａ）移植後の移植レシピエントからのサンプルであって、サンプルがドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、移植後の移植レ

シピエントからのサンプルを提供することと、ｂ）ＰＣＲアッセイによって、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量であって、ドナー由来の無細胞核酸の量が、（ｉ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のＰＣＲ定量によって、決定される、ドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、ｃ）ドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することと、ｄ）ドナー由来の無細胞核酸の量に基づいて、移植レシピエントに施されている免疫抑制治療を調整することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）アッセイであり、ＰＣＲ定量は、リアルタイムＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲアッセイは、デジタルＰＣＲアッセイであり、ＰＣＲ定量は、エンドポイントＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又は（ｂ）レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、（ａ）第１のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、（ｂ）第２のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。

【００２４】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、方法は、感染因子の存在について試験することを更に含む。いくつかの実施形態では、感染因子は、ウイルス、細菌、真菌、及び寄生生物からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、感染因子は、サイトメガロウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アネロウイルス科、及びＢＫウイルスからなる群から選択されるウイルスである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、方法は、レシピエントにおいて、１つ以上の遺伝子発現プロファイリングアッセイを実施することを更に含む。いくつかの実施形態では、組み合わせスコアは、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量及び遺伝子発現プロファイリングアッセイの結果に基づいて計算される。

【００２５】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、移植レシピエントにおけるドナーからの移

植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するためのキットであって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属し、キットが、（ａ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又はサンプル中のドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー由来の無細胞核酸をＰＣＲ定量するための、移植レシピエントからのサンプル中の無細胞核酸中のドナー特異的又はレシピエント特異的標的配列にハイブリダイゼーションする１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットと、（ｂ）ドナー由来の無細胞核酸の量を決定するためのデータ分析のための説明書と、を含む、キットである。いくつかの実施形態では、ＰＣＲ定量は、ｑＰＣＲ定量である。いくつかの実施形態では、ＰＣＲ定量は、デジタルＰＣＲ定量である。

【００２６】

前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来及び／又はレシピエント由来の無細胞核酸は、ＤＮＡである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来及び／又はレシピエント由来の無細胞核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、又はそれらの組み合わせである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のゲノム長の差を補正するための補正因子で調整される。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナー由来である無細胞核酸とレシピエント由来である無細胞核酸との間の無細胞核酸断片サイズ差を補正するための補正因子で調整される。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナー由来の無細胞核酸の全無細胞核酸又はレシピエント由来の無細胞核酸に対する比である。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、全無細胞核酸と比較したドナー由来の無細胞核酸のパーセンテージである。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、移植片は、実質臓器、組織、又は細胞移植片である。前述の態様又は実施形態のうちのいずれかと組み合わされ得るいくつかの実施形態では、移植片のドナーは、動物である。いくつかの実施形態では、動物は、ブタである。

【００２７】

別の態様では、本明細書で提供されるのは、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントであって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属する、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントからの生体サンプルを分析するための方法であって、方法が、ａ）無細胞核酸であって、無細胞核酸が、ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、無細胞核酸を、移植レシピエントからの生体サンプルから単離することと、ｂ）無細胞核酸の標的領域であって、標的領域が、ドナー特異的であるヌクレオチド配列を含む１つ以上の標的領域及び／又はレシピエント特異的であるヌクレオチド配列を含む１つ以上の標的領域を含む、標的領域を増幅することによってアンプリコンを生成することと、ｃ）アンプリコンを配列決定することによって、生成されたアンプリコンから配列リードを生成することであって、生成された配列リードが、ドナー特異的ゲノム配列に対応する１つ以上の配列リード及び／又はレシピエント特異的ゲノム配列に対応する１つ以上の配列リードを含む、生成すること、並びに任意選択で、生成された配列リードを少なくともドナー特異的ゲノム配列にマッピングすることであって、任意選択で、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差が考慮される、マッピングすることと、ｃ）サンプル中の生成された配列リードから無細胞核酸の量を定量することと、を含む、方法である。いくつかの実施形態では、無細胞核酸の量は、サンプル中の移植ドナー由来の無細胞核酸の量である。いくつかの実施形態では、無細胞核酸の量は、サンプル中の全無細胞核酸の量である。いくつかの実施形態では、方法は、１つ以上の定

量的スパイクイン核酸対照をサンプルに添加することと、１つ以上のスパイクイン核酸対照を配列決定することによって１つ以上のスパイクイン核酸対照に対応する配列リードを生成することと、を更に含み、スパイクイン対照に対応する配列リードが、サンプル中の全無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、方法は、１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照をサンプルに添加することと、１つ以上のスパイクイン核酸対照を配列決定することによって１つ以上のスパイクイン核酸対照に対応する配列リードを生成することと、を更に含み、スパイクイン対照からの配列リードが、サンプル中の移植ドナー由来の無細胞核酸の絶対量を決定するために使用される。いくつかの実施形態では、１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照は、ステップａ）の前に添加される。いくつかの実施形態では、１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照は、ステップａ）の後に添加される。いくつかの実施形態では、１つ以上の定量的スパイクイン核酸対照は、ステップａ）の前及び後に添加される。いくつかの実施形態では、方法は、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとの間のゲノム長の差を補正するための補正因子を使用して、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズの差を考慮することを更に含む。

【００２８】

別の態様では、本明細書に提供されるのは、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントであって、ドナー及びレシピエントが、異なる種に属する、ドナーから実質臓器移植片を受けた移植レシピエントからの生体サンプルを分析するための方法であって、方法が、無細胞核酸であって、無細胞核酸が、ドナー由来である無細胞核酸及びレシピエント由来である無細胞核酸を含む、無細胞核酸を、レシピエントからの生体サンプルから単離すること、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を、デジタルＰＣＲアッセイであって、デジタルＰＣＲアッセイが、（ｉ）１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイ、又は（ｉｉ）１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的及び１つ以上の単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイを含む、デジタルＰＣＲアッセイによって、決定すること、を含み、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、ドナー由来の無細胞核酸の量が、（ｉ）サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は（ｉｉ）ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー特異的核酸及びレシピエント特異的核酸のデジタルＰＣＲ定量によって、決定される、方法である。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対する第１のデジタルＰＣＲアッセイと、（ｂ）単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対する第２のデジタルＰＣＲアッセイと、を含む。いくつかの実施形態では、第２のデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。

【図面の簡単な説明】

【００２９】

【図１Ａ】ＰＣＲブタ及びヒトＤＮＡの混合物を含有するサンプル中のブタＤＮＡのパー

センテージを決定するためのデジタルＰＣＲ（digital PCR、ｄＰＣＲ）アッセイの精度及び直線性を示す。図１Ａに示される結果は、既知のパーセンテージの対照ブタ及びヒトゲノムＤＮＡを含有する対照サンプルにおいて、２コピーのブタ特異的標的（「ブタアッセイＡ」、表２を参照されたい）及び単一コピーのヒト特異的標的（「ヒトアッセイＡ」、表２を参照されたい）を使用したシングルプレックスｄＰＣＲアッセイを用いて生成された。ｘ軸は、各サンプル中のブタＤＮＡの既知のパーセンテージ（すなわち、「予測ブタＤＮＡ％」）を示し、ｙ軸は、ｄＰＣＲアッセイを使用して測定されたブタＤＮＡのパーセンテージ（「測定ブタＤＮＡ％」）を示す。グラフ中の各点は、１つのサンプルを表し、グラフ上の当てはめた線及び対応する式は、予測結果及び測定結果の線形性を示す。図１Ｂに示された結果は、２つの単一コピーのブタアッセイ（「ブタアッセイＢ」及び「ブタアッセイＣ」、表２を参照されたい）及び１つの単一コピーのヒトアッセイ（「ヒトアッセイＢ」、表２を参照されたい）を含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイを用いて生成された。

【図１Ｂ】ＰＣＲブタ及びヒトＤＮＡの混合物を含有するサンプル中のブタＤＮＡのパーセンテージを決定するためのデジタルＰＣＲ（digital PCR、ｄＰＣＲ）アッセイの精度及び直線性を示す。図１Ａに示される結果は、既知のパーセンテージの対照ブタ及びヒトゲノムＤＮＡを含有する対照サンプルにおいて、２コピーのブタ特異的標的（「ブタアッセイＡ」、表２を参照されたい）及び単一コピーのヒト特異的標的（「ヒトアッセイＡ」、表２を参照されたい）を使用したシングルプレックスｄＰＣＲアッセイを用いて生成された。ｘ軸は、各サンプル中のブタＤＮＡの既知のパーセンテージ（すなわち、「予測ブタＤＮＡ％」）を示し、ｙ軸は、ｄＰＣＲアッセイを使用して測定されたブタＤＮＡのパーセンテージ（「測定ブタＤＮＡ％」）を示す。グラフ中の各点は、１つのサンプルを表し、グラフ上の当てはめた線及び対応する式は、予測結果及び測定結果の線形性を示す。図１Ｂに示された結果は、２つの単一コピーのブタアッセイ（「ブタアッセイＢ」及び「ブタアッセイＣ」、表２を参照されたい）及び１つの単一コピーのヒトアッセイ（「ヒトアッセイＢ」、表２を参照されたい）を含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイを用いて生成された。

【図２】単一コピーのヒト特異的標的及び２コピーのブタ特異的標的（半数体ゲノム当たり２つのブタコピー）を検出するために、シングルプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＡ」及び「ブタアッセイＡ」、表２を参照されたい）を使用して評価された、ブタ心臓移植片のヒト移植レシピエントからのｃｆＤＮＡサンプル中のブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｄｄ－ｃｆＤＮＡ％）及び血漿１ｍｌ当たりのコピー（ｃｐ／ｍｌ）の縦断的分析を提供する。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント及びｃｐ／ｍｌ（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後日数（すなわち、臓器移植後６、１３、１９、２５、３３、４６、５５、及び６０日目）にヒト臓器移植レシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。

【図３】ショットガン次世代配列決定（next-generation sequencing、ＮＧＳ）を使用して評価された、ブタ心臓移植片のヒトレシピエントからのｃｆＤＮＡサンプル中のブタ由来のｃｆＤＮＡパーセントの縦断的分析を提供する。ＮＧＳ結果を、本明細書の実施例１及び表３に記載されるフィルタリングモデルＭ１～Ｍ７に従って分析した。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後日数（すなわち、臓器移植後６、１３、１９、２５、３３、４６、５５、及び６０日目）にヒト臓器移植レシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。

【図４】シングルプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＡ」及び「ブタアッセイＡ」、表２を参照されたい）又はショットガンＮＧＳによって測定された、ブタ心臓移植片のヒトレシピエントからのサンプル中のブタドナー由来のｃｆＤＮＡ推定値パーセントの比較を示す。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後日数（すなわち、臓器移植後６、１３、１９、２５、３３、４６、５５、及び６０日目）にヒト臓器移植レシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。ＮＧＳ結果を、本明細書の実施例１及び表３に記載されるフィルタリングモデルＭ７に従って分析

した。
【図５】シングルプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＡ」及び「ブタアッセイＡ」、表２を参照されたい）、マルチプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＢ」、「ブタアッセイＢ」、及び「ブタアッセイＣ」、表２を参照されたい）、及びショットガンＮＧＳによって測定された、ブタ心臓移植片のヒトレシピエントからのサンプル中のブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセントの比較を示す。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後日数（すなわち、臓器移植後３３、４６、４９、及び６０日目）にヒト臓器移植レシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。ＮＧＳ結果を、本明細書の実施例１及び表３に記載されるフィルタリングモデルＭ７に従って分析した。
【図６Ａ】マルチプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＣ」及び「ブタアッセイＤ」、表２を参照されたい）又はショットガンＮＧＳによって測定された、ブタ心臓移植片のヒト死亡モデルレシピエント（レシピエント１及びレシピエント２）からのサンプル中のブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｘｃｆＤＮＡ％）の比較を示す。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後（すなわち、レシピエント１については臓器移植の３０、４８、７２時間後、図６Ａ、及びレシピエント２については０、１２、２４、６０、６６時間、図６Ｂ）のヒト死亡モデルレシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。ＮＧＳ結果を、本明細書の実施例１及び表３に記載されるフィルタリングモデルＭ７に従って分析した。
【図６Ｂ】マルチプレックスｄＰＣＲ（「ヒトアッセイＣ」及び「ブタアッセイＤ」、表２を参照されたい）又はショットガンＮＧＳによって測定された、ブタ心臓移植片のヒト死亡モデルレシピエント（レシピエント１及びレシピエント２）からのサンプル中のブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｘｃｆＤＮＡ％）の比較を示す。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセント（ｙ軸）は、ｘ軸上に示される移植後（すなわち、レシピエント１については臓器移植の３０、４８、７２時間後、図６Ａ、及びレシピエント２については０、１２、２４、６０、６６時間、図６Ｂ）のヒト死亡モデルレシピエントから得られたｃｆＤＮＡサンプルにおいて決定された。ＮＧＳ結果を、本明細書の実施例１及び表３に記載されるフィルタリングモデルＭ７に従って分析した。
【図６Ｃ】マルチプレックスｄＰＣＲによって測定された、移植後のヒト死亡モデルレシピエント１（図６Ｃ）及びレシピエント２（図６Ｄ）からのサンプル１ｍＬ当たりのブタゲノムコピーの比較を示す（「ヒトアッセイＣ」及び「ブタアッセイＤ」、表２を参照されたい）。
【図６Ｄ】マルチプレックスｄＰＣＲによって測定された、移植後のヒト死亡モデルレシピエント１（図６Ｃ）及びレシピエント２（図６Ｄ）からのサンプル１ｍＬ当たりのブタゲノムコピーの比較を示す（「ヒトアッセイＣ」及び「ブタアッセイＤ」、表２を参照されたい）。
【発明を実施するための形態】
【００３０】
以下の説明は、当業者が様々な実施形態を作成及び使用することを可能にするために提示される。特定のデバイス、技術、及び用途の説明は、例としてのみ提供される。本明細書に記載の例に対する様々な改変は、当業者に容易に明らかになり、本明細書で定義される一般原理は、様々な実施形態の趣旨及び範囲から逸脱することなく、他の例及び用途に適用され得る。したがって、様々な実施形態は、本明細書に記載の例に限定されることを意図したものではなく、特許請求の範囲と一致する範囲が与えられるべきである。
【００３１】
概説
本開示は、移植片の健康状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための、並びにドナー及びレシピエントが異なる種に属するドナーからの臓器、細胞、又は組織移植片のレシピエントにおける移植拒絶反応状態を検出、予測、及び／又は監視するための、高感度で非侵襲的な方法及びキットを記載する。そのような方法及びキットは、移植後の血液

、血清、血漿、又は尿を含むが、これらに限定されない体液中のＤＮＡ又はＲＮＡなどのドナー特異的核酸の検出及び定量に基づく。

【００３２】

ドナーからレシピエントへの臓器、細胞、又は組織の移植は、レシピエントの免疫系からの免疫応答を誘発し、これは急性及び／又は慢性移植拒絶反応をもたらし得る。理論に束縛されることを望むものではないが、移植拒絶反応は、臓器、組織、又は細胞移植片からの細胞の死に関連しており、これは、死んでいる、もはや無傷でないドナー細胞からレシピエントの血流及び他の体液中へのドナー由来の無細胞ＤＮＡ（donor-derived cell-free DNA、ｄｄ－ｃｆＤＮＡ）などのドナー由来の核酸の放出をもたらすと考えられる。したがって、本開示の方法は、ｄｄ－ｃｆＤＮＡの量に基づいて移植片の状態を診断するために、ドナー及びレシピエントが異なる種に属する、ドナーからの臓器、細胞、又は組織移植片のレシピエントからのサンプル中の無細胞ＤＮＡ（cell-free DNA、ｃｆＤＮＡ）の分析を含む。本明細書に開示されるように、移植レシピエントから得られたサンプル中のｃｆＤＮＡの分析は、核酸配列決定に基づく方法（例えば、ハイスループット配列決定法及び／又は次世代配列決定法）、並びに核酸を定量するためのＰＣＲに基づく方法（例えば、定量的ＰＣＲ［ｑＰＣＲ］及びデジタルＰＣＲ［ｄＰＣＲ］）を使用して行われ得る。本明細書の実施例１及び２を参照されたい。有利なことに、本開示の核酸配列決定に基づく方法は、ドナーとレシピエントとの間のゲノムサイズ差を考慮することによって、ｄｄ－ｃｆＤＮＡの量の推定値の精度の向上を提供する。本明細書中の実施例１及び２を参照されたい。同様に、本開示の核酸ＰＣＲに基づく方法（例えば、ｄＰＣＲに基づく方法）は、例えば、ドナーの半数体ゲノム中の複数コピーに存在するドナー特異的標的を検出することによって、ｄｄ－ｃｆＤＮＡの希少量の推定における感度及び精度の向上を提供する。したがって、本明細書において実証されるように、本開示の方法は、例えば、移植レシピエントからの体液（例えば、血液）中のｄｄ－ｃｆＤＮＡの量を、反復して長期間にわたって監視することによって、移植レシピエントにおける臓器、細胞、又は組織移植片の状態の高感度で、正確で、非侵襲的な監視を可能にする。例えば、本明細書の実施例２及び実施例３を参照されたい。

【００３３】

定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、別途文脈が明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。

【００３４】

「又は」という用語は、本明細書では、別途文脈が明確に指示しない限り、「及び／又は」という用語を意味するために使用され、それと互換的に使用される。

【００３５】

本明細書で使用される「サンプル」という用語は、全血、血漿、血清、リンパ、末梢血単核細胞、口腔スワブ、唾液、尿、肺洗浄液、又は生検からの組織などの、移植レシピエントから得られる任意のサンプルを指す。

【００３６】

本明細書で使用される「移植片」という用語は、ドナーからレシピエントへの任意の細胞、組織、又は臓器（それらの組み合わせを含む）の移植片を指す。組織又は臓器に関する「移植片」という用語は、全組織若しくは臓器（例えば、全肝臓）又はその一部分を指し得る。

【００３７】

本明細書で使用される「核酸」という用語は、直鎖状、環状若しくは分岐状、一本鎖若しくは二本鎖、又はそれらのハイブリッドであるＲＮＡ又はＤＮＡを指す。この用語はまた、ＲＮＡ／ＤＮＡハイブリッドを包含する。いくつかの場合では、核酸は、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、並びにそれらの断片及び組み合わせのうちのいずれかを指す。

【００３８】
本明細書で使用される「無細胞核酸」という用語は、細胞外に存在する核酸を指す。いくつかの場合では、無細胞核酸は、細胞外に存在し、移植レシピエントの体液（例えば、血液、血漿、血清、尿など）中に存在する核酸である。いくつかの実施形態では、無細胞核酸は、細胞外に存在する任意のＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、並びにそれらの断片及び組み合わせを指す。この用語はまた、臓器特異的又は組織特異的ＲＮＡ転写物を含む。
【００３９】
本明細書で使用される「サンプルを提供する」という用語は、例えば、本開示の方法における使用のためのサンプルを提供することを指す。いくつかの場合では、サンプルを提供することは、サンプルを得るためのプロセスを実施すること（例えば、物理的方法を実施すること）を含む。いくつかの場合では、サンプルは、本開示の方法を実施する当事者又は実体によって提供される。他の場合では、サンプルは、本開示の方法を実施する当事者又は実体以外の実体又は当事者によって提供される。したがって、場合によっては、本開示の方法は、別の当事者又は供給源（例えば、サンプルを得た第三者）からサンプルを受け取ることを含む。
【００４０】
「配列リードを生成する」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、本開示の方法における使用のための配列リードを得るためのプロセスを実施することを指す。例えば、配列リードを生成することは、配列決定法（例えば、次世代配列決定（ＮＧＳ）法又はハイスループット配列決定（high throughput sequencing、ＨＴＳ）法）を実施することを含み得る。そのような配列決定法は、全ゲノム配列決定又は標的化された配列決定を含み得、ゲノムＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡ、ＲＮＡ転写物から得られるｃＤＮＡ、又はＲＮＡを含むがこれらに限定されない核酸を配列決定し得る。いくつかの実施形態では、少なくとも５００個、少なくとも１０００個、少なくとも５０００個、少なくとも１００００個、少なくとも２００００個、少なくとも５００００個、少なくとも１０００００個、又はそれ以上の配列リードが生成され得る。各配列リードは、１リード当たり少なくとも２０塩基、少なくとも５０塩基、少なくとも７５塩基、少なくとも１００塩基、少なくとも１５０塩基以上を含み得る。配列リードは、本開示の方法を実施する当事者又は実体によって生成され得る。他の場合では、配列リードは、本開示の方法を実施する当事者又は実体以外の実体又は当事者によって生成され得る。したがって、いくつかの場合では、本開示の方法は、別の当事者又は供給源（例えば、配列リードを直接生成又は取得した第三者実験室）からの配列リードの情報若しくは知識を受け取ること、又は配列リードを受け取ることを含む。
【００４１】
本明細書で使用される「標的配列」という用語は、目的の配列を含む核酸の領域を指す。本明細書で使用される「標的」という用語は、１つ以上の標的配列を含み得る。
【００４２】
本明細書に記載の全ての方法は、本明細書において別途指示しない限り、又は別途文脈によって明確に否定されない限り、任意の好適な順序で実施され得る。本明細書のある特定の実施形態に関して提供されるありとあらゆる例、又は例示的な言語（例えば、「など」）の使用は、単に実施形態を例示することを意図しており、別途特許請求される実施形態の範囲に限定を課すものではない。本明細書におけるいかなる言語も、実施形態の実施に不可欠な任意の特許請求されていない要素を示すものとして解釈されるべきではない。
【００４３】
Ｉ．本開示の方法
本開示のある特定の態様は、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための方法、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応を治療

するための方法、並びにドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植レシピエントにおける免疫抑制療法を調整するための方法に関する。本開示の他の態様は、例えば、ドナー由来、レシピエント由来、及び／又は全無細胞核酸などの無細胞核酸を定量するために、（例えば、配列決定又はＰＣＲに基づく方法を使用して）、移植レシピエントからの生体サンプルを分析する方法に関する。いくつかの実施形態では、本開示による臓器、組織、又は細胞移植片は、異種間移植片（すなわち、異種（xenogeneic）移植片又は異種（heterologous）移植片）であり、臓器、組織、又は細胞移植ドナーは、移植レシピエントとは異なる種のものである。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植レシピエントにおける異種間、異種（xenogeneic）、若しくは異種（heterologous）の臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／若しくは監視すること、移植レシピエントにおける異種間、異種（xenogeneic）、若しくは異種（heterologous）の臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応を治療すること、並びに／又は異種間若しくは異種の臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植レシピエントにおける免疫抑制療法を調整すること、を含む。

【００４４】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植後のドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片のレシピエントからのサンプルであって、移植レシピエントからのサンプルが、ドナー由来の無細胞核酸（例えば、ｃｆＤＮＡ及び／又はｃｆＲＮＡ）及びレシピエント由来の無細胞核酸（例えば、ｃｆＤＮＡ及び／又はｃｆＲＮＡ）を含む、サンプルを提供することと、サンプルからの無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定することと、ドナー由来の無細胞核酸の決定された量に基づいて移植拒絶反応を検出することと、を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、ドナー由来の無細胞核酸の決定された量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植拒絶反応の検出に少なくとも部分的に基づいて（例えば、ドナー由来の無細胞核酸の決定された量に基づいて）、移植レシピエントに免疫抑制治療を施すことを含む。いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植拒絶反応の検出に少なくとも部分的に基づいて（例えば、ドナー由来の無細胞核酸の決定された量に基づいて）、移植レシピエントの免疫抑制治療を調整することを含む。

【００４５】

いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、以下でより詳細に記載されるように、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）及び／又は次世代配列決定（ＮＧＳ）などの配列決定に基づく方法を使用して決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、以下により詳細に記載されるように、定量的ＰＣＲ（ｑＰＣＲ）又はデジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）などの核酸ＰＣＲに基づく定量方法を使用して決定される。

【００４６】

Ａ．無細胞核酸の定量

本開示のある特定の態様は、以下でより詳細に記載されるように、配列決定に基づく方法又は核酸ＰＣＲに基づく定量方法を使用して、移植レシピエントからのサンプルからの無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定するための方法に関する。

【００４７】

本開示の他の態様は、移植レシピエントからの生体サンプル中の無細胞核酸（レシピエント由来、ドナー由来、及び／又は全無細胞核酸など）を定量するための方法に関する。

【００４８】

配列決定に基づく方法

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、核酸配列決定に基づく方法を使用して、移植レシピエントからのサンプルからの無細胞核酸中の無細胞核酸（レシピエント由来、ドナー由来、及び／又は全無細胞核酸など）の量を決定することを含む。

【００４９】

当技術分野において周知である核酸配列決定及び分析のための様々な方法及びプロトコ

ルが、本開示の方法において使用され得る。例えば、ＤＮＡ配列決定は、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）技術、全ゲノム配列決定、ショットガン配列決定、全エクソーム配列決定、標的化された配列決定、サンガー配列決定、超並列配列決定技術、又は次世代配列決定（ＮＧＳ）を使用して達成され得る。次世代及びハイスループット配列決定の例としては、例えば、超並列シグネチャ配列決定、ポロニー配列決定、４５４パイロ配列決定、ＨｉＳｅｑ、ＭｉＳｅｑ及び他のＩｌｌｕｍｉｎａプラットフォームを用いるＩｌｌｕｍｉｎａ（Ｓｏｌｅｘａ）配列決定、ＳＯＬｉＤ配列決定、イオン半導体配列決定（ＩｏｎＴｏｒｒｅｎｔ）、ナノポア配列決定（例えば、ウェブサイト：ｎａｎｏｐｏｒｅｔｅｃｈ．ｃｏｍ／ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ／ｓｈｏｒｔ－ｆｒａｇｍｅｎｔ－ｍｏｄｅを参照されたい）、ＤＮＡナノボール配列決定、ｈｅｌｉｓｃｏｐｅ単一分子配列決定、単一分子リアルタイム（single molecule real time、ＳＭＲＴ）配列決定、ＭａｓｓＡＲＲＡＹ（登録商標）、及び選択された領域のデジタル分析（Digital Analysis of Selected Regions、ＤＡＮＳＲ（商標））が挙げられる。例えば、Ｓｔｅｉｎ ＲＡ（２００８）．「Ｎｅｘｔ－Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ Ｕｐｄａｔｅ」．Ｇｅｎｅｔｉｃ Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ ＆ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｎｅｗｓ ２８（１５）、Ｑｕａｉｌ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）．「Ａ ｔａｌｅ ｏｆ ｔｈｒｅｅ ｎｅｘｔ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ ｐｌａｔｆｏｒｍｓ：ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｏｆ Ｉｏｎ ｔｏｒｒｅｎｔ，ｐａｃｉｆｉｃ ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ ａｎｄ ｉｌｌｕｍｉｎａ ＭｉＳｅｑ ｓｅｑｕｅｎｃｅｒｓ」．ＢＭＣ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ １３（１）：３４１、Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）．「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 ｅｔ ａｌ．，Ａ ｎｏｖｅｌ ａｐｐｒｏａｃｈ ｔｏｗａｒｄ ｔｈｅ ｃｈａｌｌｅｎｇｅ ｏｆ ａｃｃｕｒａｔｅｌｙ ｑｕａｎｔｉｆｙｉｎｇ ｆｅｔａｌ ＤＮＡ ｉｎ ｍａｔｅｒｎａｌ ｐｌａｓｍａ．Ｐｒｅｎａｔ Ｄｉａｇｎ ２０１０；３０：１２２６－９、及びＳｕｚｕｋｉ ｅｔ ａｌ．，Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ ＤＮＡ ｉｎ ｈｅａｌｔｈｙ ｈｕｍａｎ ｐｌａｓｍａ．Ｃｌｉｎｉｃａ ｃｈｉｍｉｃａ ａｃｔａ；ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２００８；３８７：５５－８を参照されたい。

【００５０】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植レシピエントから得られたサンプルからの無細胞核酸中の１つ以上のドナー特異的ゲノム配列及び／又はレシピエント特異的ゲノム配列に対応する配列リードを生成することを含む。いくつかの実施形態では、配列リードは、例えば、上記のような、ハイスループット配列決定（ＨＴＳ）技術又は次世代配列決定（ＮＧＳ）などの当技術分野で既知の任意の好適な配列決定法を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列リードは、ＮＧＳショットガン配列決定を使用して、例えば、ＩｌｌｕｍｉｎａからのＭｉＳｅｑ又はＮｅｘｔＳｅｑ配列決定プラットフォームを使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列リードは、ペアエンド配列決定を使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列リードは、アンプリコンに基づくＮＧＳを使用して生成され、ゲノムの標的領域は、配列決定の前に、例えば、ＰＣＲを使用して増幅される。いくつかの実施形態では、配列リードは、アンプリコンに基づかないＮＧＳを使用して、例えば、ハイブリッド捕捉ＮＧＳを使用して生成される。いくつかの実施形態では、配列リードは、ドナー及びレシピエントゲノムに対して、同じサイズの選

択されたサイズの領域に群化される。いくつかの実施形態では、方法は、配列リードをドナー特異的ゲノム配列及び／又はレシピエント特異的ゲノム配列にマッピングすることを含む。いくつかの実施形態では、マッピングは、配列リードを参照配列にアラインメントさせることを含む。アラインメント又はマッピングは、バローズ・ホイラーアライナ（Burrows-Wheeler Aligner、ＢＷＡ）を使用するなど、当技術分野で既知の任意の好適な方法を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、配列リードアラインメントは、約９０％の最小アラインメントスコアカットオフ、約５％の許容ギャップパーセント、及び／又はスプリットアラインメントなしで行われる。いくつかの実施形態では、参照配列は、ドナーに対応する参照ゲノム、及び／又はレシピエントに対応する参照ゲノムを含む。いくつかの実施形態では、参照配列は、ドナーに対応する参照ゲノム及びレシピエントに対応する参照ゲノムを含む組み合わせた参照配列である。いくつかの実施形態では、方法は、アラインメント又はマッピングされた配列リードから、参照配列に対して複数のマッチを有する１つ以上の配列リードを除外することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、アラインメント又はマッピングされた配列リードから、欠落メイトを有する１つ以上の配列リード、転座配列リード、及び不適切な配向を有する配列リードを除外することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、アラインメント又はマッピングされた配列リードから、９５％未満又は９８％未満のアラインメントスコアを有する１つ以上の配列リードを除外することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、アラインメント又はマッピングされた配列リードから、１つ以上の部分的にアラインメントされた配列リード又はソフトクリップされた配列リードを除外することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、アラインメント又はマッピングされた配列リードから、１つ以上の部分的にアラインメントされた配列リード又はハード及びソフトクリップされた配列リードを除外することを含むか、又はＭＡＰＱでのアラインメントが、１０未満である。

【００５１】

いくつかの実施形態では、移植レシピエントからのサンプルからの無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナーゲノム及びレシピエントゲノムにアラインメントする配列リードの割合としてのドナーゲノムにアラインメントする配列リードのパーセントに基づいて決定される。

【００５２】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、レシピエントとドナーとの間のゲノムサイズ差を考慮して、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定することを含む。

【００５３】

いくつかの実施形態では、レシピエントとドナーとの間のゲノムサイズ差は、生成された配列リードにおけるドナー及びレシピエントゲノムの配列決定カバレッジに基づいて考慮される。いくつかの実施形態では、レシピエントとドナーとの間のゲノムサイズ差は、生成された配列リードにおけるドナー及びレシピエントゲノムの選択されたサイズの１つ以上の領域にわたる平均カバレッジに基づいて考慮される。そのような実施形態のうちのいくつかでは、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ドナー及びレシピエントゲノムの選択されたサイズの１つ以上の領域にわたる平均カバレッジのパーセンテージとして決定される。いくつかの実施形態では、選択されたサイズの１つ以上の領域は、十分なカバレッジを有するのに十分大きい。いくつかの実施形態では、バックグラウンドノイズは、ドナーゲノムとレシピエントゲノムとを区別するのに十分低い。いくつかの場合では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、m_d／（m_d＋m_r）×１００として決定され、式中、m_dは、ドナーゲノムの選択されたサイズの１つ以上の領域にわたる平均カバレッジの中央値であり、m_rは、レシピエントゲノムの選択されたサイズの１つ以上の領域にわたる平均カバレッジの中央値である。いくつかの実施形態では、ドナーゲノム及びレシピエントゲノムの選択されたサイズの領域は、最大１メガ塩基（megabases、Ｍｂ）、約１Ｍｂ～約１０Ｍｂ、最大１０Ｍｂ、約１０Ｍｂ～約１００Ｍｂ、又は最大１００Ｍｂのうちのいずれかを含む。いくつかの実施形態では、ドナーゲノム及びレシピエントゲノムの選択されたサイズの領域は、最大１Ｍ塩基、最大１０Ｍ塩基、又は最大１００Ｍ塩基を含む。

【００５４】
いくつかの実施形態では、レシピエントとドナーとの間のゲノムサイズ差は、補正因子を使用して考慮される。例えば、レシピエントゲノムよりも小さいドナーゲノムについては、ドナー特異的ゲノム配列にマッピングされる配列リードの割合に、ドナーゲノムサイズとレシピエントゲノムサイズとの比を掛けることによって、補正因子が得られ得る。
【００５５】
ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸断片のサイズは、異なっていてもよく、例えば、本明細書の実施例２及び表４を参照されたく、これは、ヒト移植レシピエントからの無細胞ＤＮＡ断片と比較して、ブタドナー由来の無細胞ＤＮＡ断片の平均断片サイズにおいて差が観察されたことを示す。ドナー由来の無細胞核酸とレシピエント由来の無細胞核酸との間の断片サイズのそのような差は、ドナー由来の無細胞核酸の量の過大評価又は過小評価をもたらし得る。したがって、いくつかの実施形態では、方法は、例えば、補正因子を使用して、ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸の断片サイズの差によるドナー由来の無細胞核酸の量の過大評価又は過小評価の可能性を考慮することを含む。例えば、補正因子は、人工サンプル及びインシリコサンプルにおける断片サイズ比較研究によって決定され得る。加えて、ドナー由来の無細胞核酸とレシピエント由来の無細胞核酸との間の断片サイズの差はまた、生成された配列リードにおけるドナーゲノム及びレシピエントゲノムの配列決定カバレッジの過大評価又は過小評価をもたらし得る。例えば、大きなカバレッジは、大きな核酸断片との比較において、より小さな核酸断片を用いて得られる場合がある。したがって、いくつかの実施形態では、方法は、例えば、補正因子を使用して、ドナー由来の無細胞核酸とレシピエント由来の無細胞核酸との間の断片サイズ差によるドナーゲノム及びレシピエントゲノムの配列決定カバレッジの過大評価又は過小評価の可能性を考慮することを含む。例えば、補正因子は、カバレッジ率（例えば、ドナー及びレシピエントゲノムの選択されたサイズの領域にわたる平均カバレッジ率）に、平均レシピエント核酸断片サイズに対する平均ドナー核酸断片サイズの比を掛けることによって決定され得る。
【００５６】
いくつかの実施形態では、移植レシピエントからのサンプルからの無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量の絶対定量は、配列リードを生成する前に、既知の濃度又は量の対照核酸（例えば、定量的スパイクイン核酸対照）を、移植レシピエントからのサンプル中、又は移植レシピエントからの無細胞核酸中に含めることによって達成され得る。したがって、ドナー由来の無細胞核酸の絶対量は、対照核酸及びドナー由来の無細胞核酸に対応する配列リードに基づいて決定される。
【００５７】
例えば、複数のサンプルが経時的に移植レシピエントから採取される場合、又はサンプルが種々の移植レシピエントから採取される場合など、配列決定される移植レシピエントからの複数の無細胞核酸サンプルが存在する場合、各サンプルは、個々に配列決定され得るか、又は複数のサンプルは、マルチプレックス配列決定を使用して一緒に配列決定され得る。
【００５８】
核酸ＰＣＲに基づく定量に基づく方法
いくつかの実施形態では、本開示の方法は、核酸ＰＣＲ定量法を使用して、移植レシピエントから得られたサンプルからの無細胞核酸中の無細胞核酸（レシピエント由来、ドナー由来、及び／又は全無細胞核酸など）の量を決定することを含む。
【００５９】
定量的ポリメラーゼ連鎖反応（ｑＰＣＲ）、デジタルＰＣＲ（ｄＰＣＲ）、及びリアルタイムｄＰＣＲを含む定量的核酸増幅法など、核酸定量のための様々な方法及びプロトコルが、当技術分野で周知である。
【００６０】
ｑＰＣＲ又はリアルタイム定量ＰＣＲは、標的核酸を同時に増幅及び定量するためにＰ

ＣＲを使用する方法を指す。当技術分野において既知であるように、ｑＰＣＲ反応において蓄積された増幅核酸の定量は、各増幅サイクル後にリアルタイムで実施される。絶対定量は、標準曲線を使用して実施されてもよく、定量は、以下のものなど、検出可能に標識されたプローブ、プライマー、又は色素を使用して実施され得る：二本鎖ＤＮＡ産物に結合するインターカレーティング色素、例えば、ＹＯ－ＰＲＯ－Ｉ、ＳＹＢＲ ｇｒｅｅｎなど（例えば、Ｉｓｈｉｇｕｒｏ ｅｔ ａｌ．Ａｎａｌ．，２２９：２０７－２１３（１９９５）、Ｔｓｅｎｇ ｅｔ ａｌ Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．，２４５：２０７－２１２（１９９７）、Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，２４：９５４－９６２（１９９８）を参照されたい）、プライマー伸長によって強制的に離されるまで、蛍光消光剤に近接して保持された蛍光分子を有するヘアピン構造を有するプライマー（例えば、Ｗｈｉｔｅｃｏｍｂｅ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１７：８０４－８０７（１９９９；「ＡＭＰＬＩＦＬＵＯＲ ｐｒｉｍｅｒｓ」を参照されたい）、又は通常、それらが結合しているオリゴヌクレオチド部分が増幅産物に特異的に結合するまで、蛍光消光剤に近接した蛍光分子を含む配列特異的プローブ（例えば、Ｇｅｌｆａｎｄ ｅｔ ａｌ、米国特許第５，２１０，０１５号（ＴＡＱＭＡＮ）、Ｎａｚａｒｅｎｋｏ ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，２５：２５１６－２５２１（１９９７）（スコーピオンプローブ）、Ｔｙａｇｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１６：４９－５３（１９９８）（分子ビーコン）を参照されたい）。使用され得る他の好適な色素、プライマー、又はプローブとしては、二重ハイブリダイゼーションプローブ、ｅｃｌｉｐｓｅプローブ、ＬＵＸ ＰＣＲプライマー、及びＱＺｙｍｅ ＰＣＲプライマーが挙げられる。そのような色素、プライマー、又はプローブは、本明細書に記載のｑＰＣＲに関連して使用され得るか、又はそれらは、反応の完了時に反応産物の総量を測定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、検出可能に標識されたプローブ、プライマー、又は色素は、例えば、ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＡＴＴＯ５５０、ＲＯＸ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、又は任意の他の好適な色素のうちの１つ以上を使用して、蛍光標識される。

【００６１】

デジタルＰＣＲ又はｄＰＣＲは、標的核酸の絶対定量を可能にする方法を指す。当技術分野で既知のように、ｄＰＣＲは、ＰＣＲ反応を、各区画が１つ、少数の標的配列を含有するか、又は標的配列を含有しないような多数の区画に分割することによって実施される。ＰＣＲ反応後、すなわち、ＰＣＲ反応の終点で、増幅陽性及び区画の総数を使用して、ポアソン統計を使用して標的配列を定量する。陽性区画は、例えば、ｑＰＣＲについての上記のとおり、検出可能に標識されたプローブ、プライマー、又は色素を使用して特定され得る。いくつかの実施形態では、検出可能に標識されたプローブ、プライマー、又は色素は、例えば、ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＡＴＴＯ５５０、ＲＯＸ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、又は任意の他の好適な色素のうちの１つ以上を使用して、蛍光標識される。ｄＰＣＲ法の説明については、例えば、Ｈｉｎｄｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８３（２２）：８６０４－８６１０、Ｐｏｈｌ ａｎｄ Ｓｈｉｈ（２００４）Ｅｘｐｅｒｔ Ｒｅｖ．Ｍｏｌ．Ｄｉａｇｎ．４（１）：４１－４７、Ｐｅｋｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０１１）Ｌａｂ Ｃｈｉｐ １１（１３）：２１５６－２１６６、Ｐｉｎｈｅｉｒｏ ｅｔ ａｌ．（２０１２）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．８４（２）：１００３－１０１１、Ｄａｙ ｅｔ ａｌ．（２０１３）Ｍｅｔｈｏｄｓ ５９（１）：１０１－１０７、及びＱｕａｎ ｅｔ ａｌ．，Ｓｅｎｓｏｒｓ（Ｂａｓｅｌ）．２０１８ Ａｐｒ；１８（４）：１２７１を参照されたい。多数の区画は、ＰＣＲ反応物をマイクロウェル、チャンバ、又は液滴に分割することによってなど、当技術分野で既知の任意の好適な方法を使用して生成され得る。ＰＣＲ反応を液滴に分割することによって多数の区画が生成される場合では、ｄＰＣＲ法は、例えば、ＢｉｏＲａｄ（ｄｄＰＣＲ（商標））又はＳｔｉｌｌａ（例えば、ＣｒｙｓｔａｌデジタルＰＣＲ（商標））から入手可能な、液滴デジタルＰＣＲと称され得る。

【００６２】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、デジタルＰＣＲアッセイを使用して、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定することを含む。

【００６３】

いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、１つ以上のシングルプレックスｄＰＣＲアッセイを含む。そのような実施形態のうちのいくつかでは、シングルプレックスｄＰＣＲアッセイは、１つ以上のレシピエント特異的シングルプレックスｄＰＣＲアッセイ、及び／又は１つ以上のドナー特異的シングルプレックスｄＰＣＲアッセイを含み得る。いくつかの実施形態では、レシピエント特異的シングルプレックスＰＣＲアッセイ及びドナー特異的シングルプレックスＰＣＲアッセイは各々、半数体ゲノム当たり単一コピーの標的を有する。いくつかの実施形態では、レシピエント特異的シングルプレックスｄＰＣＲアッセイ及び／又はドナー特異的シングルプレックスｄＰＣＲアッセイのいくつか又は全部は、半数体ゲノム当たり複数コピー（例えば、２コピー以上）の標的を有し、これは、同じ量のサンプル入力に対してより多くの標的陽性区画（例えば、同じ量のサンプル入力に対して２倍又は複数倍多い標的陽性区画）を生成して、アッセイ検出並びに定量の感度及び精度を増加させる。これは、ドナー由来の無細胞核酸が、サンプルからの全無細胞核酸中にまれな量である場合に特に有用であり得る。いくつかの実施形態では、複数コピーの標的ＰＣＲアッセイは、アクチン、チューブリン、ｒＲＮＡ遺伝子ファミリーなどの重複遺伝子群の複数のメンバー、又はＡｌｕ配列などの反復配列の複数のメンバー、又は二倍体細胞当たりの複数コピーのミトコンドリアＤＮＡを標的とし得る。いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ、及び／又はレシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関する、単一コピー若しくは複数コピーのレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、第１のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイ及び第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、（ａ）第１のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものであり、（ｂ）第２のデジタルＰＣＲアッセイが、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、第２のシングルプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。異なるコピー数の標的を標的とする異なるｄＰＣＲアッセイによる無細胞核酸の定量は、全ドナー及びレシピエントゲノムに対するドナー由来のゲノムの相対定量、又はサンプル１単位当たりのドナー由来のゲノムコピー、例えば、コピー／血漿サンプルｍｌの絶対定量の分析のために、ゲノムコピー定量に対して正規化され得る。

【００６４】

いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、単一のｄＰＣＲ反応において２つ以上のＰＣＲアッセイを含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイである。そのような実施形態のうちのいくつかでは、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを含み得る。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエント又は全無細胞核酸に対して、ドナー由来の無細胞核酸を定量するための、少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイ及び少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイを含み得る。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエント特異的ＰＣＲアッセイ及びドナー特異的ＰＣＲアッセイを含み得、各々、種の半数体ゲノム当たり少なくとも１つの単一コピーの標的を標的とする。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエント特異的ＰＣＲアッセイ及びドナー特異的ＰＣＲアッセイを含み得、各々、半数体ゲノム当たり少なくとも１つの複数コピーの標的を標的として、限定されたサンプル入力で標的検出及び定量化感度を改善する。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは

、半数体ドナーゲノムに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的（例えば、２コピー以上の標的）を用いる少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを含み得（すなわち、各ドナー特異的ＰＣＲアッセイは、ドナーに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を検出する）、標的のコピー数は、ドナーの半数体ゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、ドナーゲノムに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的（例えば、少なくとも１、２コピー、又はそれ以上の標的）を用いる１つ以上の、例えば、１～５個のドナー特異的ＰＣＲアッセイを含み得（すなわち、各ドナー特異的ＰＣＲアッセイは、ドナーに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を検出する）、標的のコピー数は、ドナーの半数体ゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、半数体レシピエントゲノムに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を用いる少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイを含み得（すなわち、各レシピエント特異的ＰＣＲアッセイは、レシピエントに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を検出する）、標的のコピー数は、レシピエントの半数体ゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエントゲノムに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を用いる１つ以上の、例えば、１～５個のレシピエント特異的ＰＣＲアッセイを含み得（すなわち、各レシピエント特異的ＰＣＲアッセイは、レシピエントに対応する少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーの標的を検出する）、標的のコピー数は、レシピエントの半数体ゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、単一デジタルＰＣＲ反応における２つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的及び／又はレシピエント特異的標的に対する少なくとも１つのマルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイを含み、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものであり、レシピエント特異的標的のコピー数が、半数体レシピエントゲノムに関するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、（ａ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び（ｂ）少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、マルチプレックスデジタルＰＣＲアッセイは、少なくとも１つの複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。

【００６５】

いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、アッセイ１つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、１つ以上の単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的及び１つ以上の単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対する少なくとも１つのデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が半数体レシピエントゲノムに関するものである、単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的に対する第１のデジタルＰＣＲアッセイ、及び単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対する第２のデジタルＰＣＲアッセイを含む。いくつかの実施形態では、第２のデジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。

【００６６】

いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的であって、レシピエント特異的標的のコピー数が

半数体レシピエントゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのレシピエント特異的標的、及び少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的であって、ドナー特異的標的のコピー数が半数体ドナーゲノムに関するものである、少なくとも１つの単一コピー又は複数コピーのドナー特異的標的に対するものである。いくつかの実施形態では、デジタルＰＣＲアッセイは、複数コピーのドナー特異的標的に対するものであり、ドナー特異的標的のコピー数が、半数体ドナーゲノムに関するものである。

【００６７】

いくつかの実施形態では、レシピエントに対応する単一コピーの標的は、レシピエントの半数体ゲノム中に単一コピーとして存在し、ドナーのゲノム中には存在しない。いくつかの実施形態では、ドナーに対応する単一コピーの標的は、ドナーの半数体ゲノム中に単一コピーとして存在し、レシピエントのゲノム中には存在しない。いくつかの実施形態では、ドナーに対応する複数コピーの標的（例えば、２コピー以上の標的）は、ドナーの半数体ゲノム中の複数のコピー（例えば、２コピー以上）中に存在し、レシピエントのゲノム中には存在しない。いくつかの実施形態では、ドナーに対応する標的及び／又はレシピエントに対応する標的は、ドナーゲノム又はレシピエントゲノムのイントロン領域にある。いくつかの実施形態では、ドナーに対応する標的及び／又はレシピエントに対応する標的は、ドナーゲノム又はレシピエントゲノムのミトコンドリアＤＮＡ中にある。いくつかの実施形態では、ドナーに対応する複数コピー（例えば、２コピー以上）の標的は、ドナーのゲノム中の重複遺伝子群中の配列を含む。重複遺伝子群の非限定的な例としては、ｒＲＮＡ、Ｈｏｘ、ヒストン、及びチューブリン遺伝子ファミリーが挙げられる。

【００６８】

いくつかの実施形態では、各レシピエント特異的ＰＣＲアッセイは、例えば、ＰＣＲ反応中のレシピエント特異的標的の直接増幅によって、レシピエント特異的標的（例えば、レシピエントに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対を含む。いくつかの実施形態では、各ドナー特異的ＰＣＲアッセイは、例えば、ＰＣＲ反応中のドナー特異的標的の直接増幅によって、ドナー特異的標的（例えば、ドナーに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対を含む。いくつかの実施形態は、プライマー対中の各プライマーは、列挙された範囲の各々内の任意の値を含む、約５～約５０、約１０～約５０、約１５～約３０、約１５～約２５、約１８～約３０、又は約２０～約３０塩基長である。いくつかの実施形態では、プライマー対中の各プライマーは、約５５℃、約５６℃、約５７℃、約５８℃、約５９℃、約６０℃、約６１℃、約６２℃、約６３℃、約６４℃、約６５℃、約６６℃、約６７℃、約６８℃、約６９℃、又は約７０℃のうちのいずれかの融解温度（T_m）を含む。いくつかの実施形態では、プライマー対中の各プライマーは、約６０℃の融解温度（T_m）を含む。

【００６９】

上記のように、ｄＰＣＲアッセイにおけるドナー特異的又はレシピエント特異的陽性区画の検出は、ＤＮＡ結合蛍光色素（例えば、ＳＹＢＲグリーン又はＥｖａＧｒｅｅｎ）又は検出可能に標識されたプローブ（例えば、蛍光標識プローブ）などの任意の好適な検出試薬を使用して実施され得る。ドナー特異的又はレシピエント特異的陽性区画が検出可能に標識されたプローブを使用して検出される場合、レシピエント特異的ＰＣＲ又はドナー特異的ＰＣＲアッセイは、レシピエント特異的又はドナー特異的標的を別個に検出するのに好適な検出可能に標識されたプローブを含む。そのような実施形態のうちのいくつかでは、各レシピエント特異的ＰＣＲアッセイは、レシピエント特異的標的（例えば、レシピエントに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対、及びレシピエント特異的標的にハイブリダイゼーションする検出可能に標識されたプローブを含み、かつ／又は各ドナー特異的ＰＣＲアッセイは、ドナー特異的標的（例えば、ドナーに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対、及びドナー特異的標的にハイブリダイゼーションする検出可能に標識されたプローブを含む。いくつかの実施形態では、検出可能に標識されたプローブは、レシピエント特異的標的又はドナー特異的

標的にハイブリダイゼーションするように構成されたオリゴヌクレオチド、蛍光標識、及び消光剤を含む。いくつかの実施形態では、蛍光標識はオリゴヌクレオチドの一端にあり、消光剤はオリゴヌクレオチドの他端にある。いくつかの実施形態、蛍光標識は、ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＡＴＴＯ５５０、ＲＯＸ、Ｃｙ５、及びＣｙ５．５を含むがこれらに限定されない、当技術分野において既知の任意の標識又は色素である。いくつかの実施形態では、消光剤は、当技術分野で既知の任意の消光剤、例えば、ＢＨＱ、ＩＡＢｋＦＱ、ＴＡＭＲＡである。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、列挙された範囲の各々内の任意の値を含む、約５～約５０、約１０～約５０、約１５～約３０、約１５～約２５、又は約２０～約３０塩基長の配列を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、約６０℃、約６１℃、約６２℃、約６３℃、約６４℃、約６５℃、約６６℃、約６７℃、約６８℃、約６９℃、又は約７０℃のうちのいずれかの融解温度（Ｔｍ）を含む。いくつかの実施形態では、プローブは、この範囲内の任意の値を含む、約６５℃～約７０℃の融解温度（Ｔｍ）を含む。

【００７０】

いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、１つ以上のシングルプレックスＰＣＲアッセイ（例えば、レシピエント特異的ＰＣＲアッセイ、及び／又はドナー特異的ＰＣＲアッセイ）を含み、各シングルプレックスＰＣＲアッセイは、固有の色素又は検出可能な標識（例えば、固有の蛍光色素又は標識）を有する検出試薬の使用を含む。例えば、１つ以上の単一ＰＣＲアッセイ（例えば、レシピエント特異的ＰＣＲアッセイ、及び／又はドナー特異的ＰＣＲアッセイ）を含むｄＰＣＲアッセイでは、レシピエント特異的ＰＣＲアッセイは、第１の蛍光標識を有する検出試薬を含み、ドナー特異的ＰＣＲアッセイは、第１の蛍光標識とは異なる第２の蛍光標識を有する検出試薬を含む。したがって、一実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、レシピエント特異的標的（例えば、レシピエントに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対、並びにレシピエント特異的標的にハイブリダイゼーションする検出可能に標識されたプローブであって、検出可能に標識されたプローブが第１の蛍光標識で標識されている、検出可能に標識されたプローブ、を含むレシピエント特異的ＰＣＲアッセイと、ドナー特異的標的（例えば、ドナーに対応する単一コピー又は複数コピーの標的）を検出するプライマー対、並びにドナー特異的標的にハイブリダイゼーションする検出可能に標識されたプローブであって、検出可能に標識されたプローブが第１の蛍光標識とは異なる第２の蛍光標識で標識されている、検出可能に標識されたプローブ、を含むドナー特異的ＰＣＲアッセイと、を含む。

【００７１】

いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、例えば、サンプル１ｍＬ当たりの絶対ドナー（ゲノム）コピー、例えば、血漿１ｍＬ当たりのコピーとして、又はＤＮＡ量当たりのドナー（ゲノム）コピー、例えば、ＤＮＡ　１ｎｇ当たりのコピーとして、ドナー由来の無細胞核酸定量のための、単一ｄＰＣＲ反応における２つ以上のＰＣＲアッセイ、例えば、少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイである。いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイは、サンプル中のレシピエント由来の無細胞核酸又は全ドナー及びレシピエント由来の無細胞核酸に関する相対的ドナー由来の無細胞核酸定量のための、単一ｄＰＣＲ反応における２つ以上のＰＣＲアッセイ、例えば、少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイ、及び１つ以上のレシピエント特異的ＰＣＲアッセイを含む、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイであり、固有の色素若しくは検出標識（例えば、固有の蛍光色素若しくは標識）を含む検出剤が、マルチプレックスｄＰＣＲ反応における各ＰＣＲアッセイに使用されるか、又は、マルチプレックスｄＰＣＲ反応における少なくとも２つのＰＣＲアッセイが、同じ色素若しくは検出可能な標識（例えば、同じ蛍光色素若しくは標識）を含む検出試薬を含む。したがって、一実施形態では、単一のｄＰＣＲ反応における少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイ及び少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイにおいて、ｄＰＣＲ反応における各ＰＣＲアッセイは、固有の蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含み得る。

例えば、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエントに対応する単一コピー又は複数コピーの標的を用いる少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイと、ドナーに対応する単一コピー又は複数コピー（例えば、２コピー以上）の標的を用いる少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイとを含み得、ｄＰＣＲ反応における各ＰＣＲアッセイ（すなわち、各レシピエント特異的ＰＣＲアッセイ及び各ドナー特異的ＰＣＲアッセイ）は、固有の蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含む。別の実施形態では、単一ｄＰＣＲ反応における少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイ及び少なくとも１つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを含むマルチプレックスｄＰＣＲアッセイにおいて、ｄＰＣＲ反応における少なくとも２つのレシピエント特異的又はドナー特異的ＰＣＲアッセイは、同じ色素又は検出可能な標識（例えば、同じ蛍光色素又は標識）を含む検出試薬を含む。例えば、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、レシピエントに対応する単一コピー又は複数コピーの標的を用いる少なくとも１つのレシピエント特異的ＰＣＲアッセイと、ドナーに対応する単一コピー又は複数コピー（例えば、２コピー以上）の標的を用いる２つ以上のドナー特異的ＰＣＲアッセイとを含み得、ｄＰＣＲ反応における少なくとも２つのドナー特異的ＰＣＲアッセイは、同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含む。

【００７２】

（例えば、本開示の方法に従って決定される）移植レシピエントからの無細胞核酸サンプル中に存在するドナー由来の無細胞核酸の量は、様々な方法で表され得る。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中の全無細胞核酸のパーセンテージとして決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中の全無細胞核酸（例えば、ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸）に対する比として決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中の、ドナー由来の無細胞核酸のレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中の１つ以上の参照核酸分子と比較した比又はパーセンテージとして決定される。例えば、ドナー由来の無細胞核酸の量は、無細胞核酸サンプル中の全核酸（又は全ＤＮＡ若しくはＲＮＡ）分子の１０％であると決定され得る。代替的には、ドナー由来の無細胞核酸の量は、無細胞ＤＮＡサンプル中の全核酸（又はＤＮＡ若しくはＲＮＡ）分子と比較して１：１０の比であり得る。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、濃度として決定され得る。例えば、無細胞核酸サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル１ｍＬ当たり１μｇ、サンプル１ｍＬ当たり１００ドナー（ゲノム）コピー、ＤＮＡ　１ｎｇ当たり１０ドナー（ゲノム）コピーなどのＤＮＡ量当たり１０ドナー（ゲノム）コピーなどであると決定され得る。本明細書に記載の値は、ドナー由来の無細胞核酸の量を表現するための様々な方法を例示するための単なる例示である。移植レシピエントからの無細胞核酸サンプル中のドナー由来の無細胞核酸のパーセンテージは、極めて低い可能性がある。無細胞核酸サンプル中のレシピエント由来の無細胞核酸の量はまた、ドナー由来の無細胞核酸について記載された様式で表され得ることに留意されたい。無細胞核酸サンプル中の核酸の所与の供給源、タイプ、又は配列の量を表す更なる方法は、当業者に容易に明らかになるであろう。

【００７３】

いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、ｄＰＣＲアッセイによって分析されるサンプルの量に関して決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、移植レシピエントからのサンプル中のドナーゲノムのコピー数（例えば、サンプル１ｍＬ当たりの、又はサンプル中の無細胞核酸の量当たりのドナーゲノムのコピー数）として決定され得る。一実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、レシピエントからの血漿の体積（例えば、ｍＬ）当たりのドナーゲノムのコピー数など、レシピエントからのサンプルの体積当たりのドナーゲノムのコピー数として決定され得る。別の実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、レシピエントからのサンプル中の無細胞

核酸１ｎｇ当たりのドナーゲノムのコピー数など、レシピエントからのサンプル中の全無細胞核酸の量当たりのドナーゲノムのコピー数として決定され得る。一例では、ｄＰＣＲアッセイによって決定されるドナー特異的標的配列分子のコピー数（例えば、１μＬ当たりのドナーＤＮＡ分子のコピー数として）は、ｄＰＣＲアッセイにおけるドナー特異的半数体ゲノムのコピー数に調整される（例えば、ドナー半数体ゲノムに対応する２コピーの標的についてのドナー特異的ＰＣＲアッセイにおいて、ｄＰＣＲアッセイによって決定されるドナー標的配列のコピー数は、２コピー／半数体ゲノムによって除算される）。ｄＰＣＲアッセイによって決定されるレシピエント標的配列分子のコピー数は、ドナー特異的標的配列についての上記のように調整され得る。次いで、移植レシピエントからのサンプル中のドナーゲノムのコピー数（例えば、サンプル１ｍＬ当たり又はサンプル中の無細胞核酸の量当たりのドナーゲノムのコピー数）を、ｄＰＣＲアッセイに使用された体積、サンプルからの無細胞核酸の体積（例えば、移植レシピエントからのサンプルから抽出された無細胞核酸の体積）、及び移植レシピエントからのサンプルの体積（例えば、無細胞核酸が抽出された移植レシピエントからのサンプルの体積）に基づいて決定される。ｄＰＣＲ反応における（例えば、マルチプレックスｄＰＣＲアッセイにおける）２つ以上のＰＣＲアッセイが、同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含む場合、方法は、同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含むＰＣＲアッセイの数に対して正規化することを更に含む。同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含むｄＰＣＲ反応における２つのドナー特異的単一コピー標的ＰＣＲアッセイを用いるマルチプレックスｄＰＣＲアッセイの一例では、ｄＰＣＲアッセイによって決定されるドナー特異的標的配列のコピー数（例えば、１μＬ当たりのドナー特異的配列のコピー数の合計として）は、同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含むｄＰＣＲ反応におけるドナー特異的ＰＣＲアッセイの数によって（例えば、同じ蛍光色素又は標識を有する検出試薬を含む２つのドナー特異的ＰＣＲアッセイを用いるｄＰＣＲアッセイにおいて、１μＬ当たりのドナーゲノムのコピー数は、測定された全コピー／μＬを２で割ることによって得られる）、及びＰＣＲアッセイにおける各ドナー特異的標的のコピー数に対して（例えば、ドナーに対応する２コピーの標的に対するドナー特異的ＰＣＲアッセイにおいて、ドナーゲノムのコピー数は、測定されたコピー／μＬを２で割ることによって得られる）、調整（除算）される。ｄＰＣＲアッセイによって決定されるレシピエントゲノムのコピー数（例えば、１μＬ当たりのレシピエントゲノムのコピー数として）はまた、ドナーゲノムのコピー数についての上記のように調整され得る。次いで、移植レシピエントからのサンプル中のドナーゲノムのコピー数（例えば、サンプル１ｍＬ当たり又はサンプル中の無細胞核酸の量当たりのドナーゲノムのコピー数）を、ｄＰＣＲアッセイに使用された体積、サンプルからの無細胞核酸の体積（例えば、移植レシピエントからのサンプルから抽出された無細胞核酸の体積）、及び移植レシピエントからのサンプルの体積（例えば、無細胞核酸が抽出された移植レシピエントからのサンプルの体積）に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、（１）ｄＰＣＲ機器からのドナー標的コピー／μｌを、半数体ゲノム当たりのドナー標的コピーの数で除算し（２つ以上のドナー標的アッセイが蛍光チャネルにおいて組み合わされる場合、蛍光チャネルにおけるドナー標的アッセイの数でも除算する）、反応におけるドナー標的コピー／μｌを得るステップ、（２）反応物中のドナー標的コピー／μｌに反応物の体積を掛けることによって、反応物中の全ドナーゲノムコピーを計算するステップ、（３）反応における全ドナーゲノムコピーを、反応において使用された核酸サンプルの体積で割り、核酸サンプルの体積当たりの全ドナーゲノムコピーを得るステップ、（４）サンプルの核酸体積当たりの全ドナーゲノムコピーに、核酸抽出から得られた核酸サンプルの全体積を掛けて、核酸抽出から得られた全ドナーゲノムコピーを得るステップ、及び（５）核酸抽出から得られた全ドナーゲノムコピーを、核酸抽出に使用された血漿の体積で割ることによって、レシピエントからの血漿の体積当たりの全ドナーゲノムコピーを計算するステップのうちの１つ以上又は全てを使用して決定される。

【００７４】

いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸の量は、サンプル中のドナー特異的

核酸及びレシピエント特異的核酸の両方のｄＰＣＲアッセイによる定量に基づいて、ドナー由来の無細胞核酸の全ドナー特異的及びレシピエント特異的核酸に対する比として決定される。いくつかの実施形態では、ｄＰＣＲアッセイによって決定されるドナーゲノムのコピー数（例えば、反応物１μＬ当たりのドナーゲノムのコピー数として）は、ｄＰＣＲアッセイにおける各ドナー特異的標的のコピー数に対して調整される（例えば、ドナーに対応する２コピーの標的については、ｄＰＣＲアッセイによって決定されるドナーゲノムのコピー数を２で割る）。ｄＰＣＲアッセイによって決定されるレシピエントゲノムのコピー数（例えば、反応物１μＬ当たりのレシピエントゲノムのコピー数として）は、ドナーゲノムのコピー数についての上記のように調整され得る。したがって、ドナーゲノムコピー対レシピエントゲノム及びドナーゲノムのコピーの総数の比が決定される。いくつかの場合では、レシピエントゲノム及びドナーゲノムのコピーの総数に対するドナーゲノムコピーの割合又はパーセントが決定される。

【００７５】

Ｂ．臓器、組織、又は細胞移植拒絶反応状態

例えば、臓器、組織、又は細胞の移植後、レシピエントは、免疫静止状態を経験する場合があり、これは、免疫活性の不在若しくは低レベル、又は生検で確認された拒絶反応などの拒絶反応関連臨床症状の不在、又は例えば、血清クレアチニンレベルの上昇によって示される臓器機能の顕著な変化、推定糸球体濾過率の減少、異常な心エコー図結果、又は生検の臨床上の必要性を示す他の何らかの臨床上の懸念を特徴とし得る状態である。

【００７６】

代替的には、レシピエントは、Ｔ細胞媒介性拒絶反応（Ｔ cell-mediated rejection、ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（antibody-mediated rejection、ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又はこれら２つの組み合わせ（すなわち、（「混合」拒絶反応）に起因し得る能動的拒絶反応を経験する場合がある。ＡＢＭＲは、急性活性抗体媒介性拒絶反応、慢性活性抗体媒介性拒絶反応、及び慢性安定抗体媒介性拒絶反応を含むがこれらに限定されない、臓器、組織、又は細胞移植片の抗体媒介性拒絶反応を指す。ＴＣＭＲは、ＴＣＭＲ　ＩＡ、ＩＢ、ＩＩＡ、ＩＩＢ、ボーダーラインＴＣＭＲ及び慢性ＴＣＭＲを含むがこれらに限定されない、臓器、組織、又は細胞移植片の細胞性又はＴ細胞媒介性拒絶反応を指す。

【００７７】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法のうちのいずれかによって決定される臓器、組織、又は細胞移植片の状態は、例えば、免疫静止を特徴とする拒絶反応の不在であり得る。他の実施形態では、本明細書で提供される方法のいずれかによって決定される臓器、組織、又は細胞移植片の状態は、能動的拒絶反応、Ｔ細胞媒介性拒絶反応、抗体媒介性拒絶反応、又は混合拒絶反応などの拒絶反応の存在であり得る。更なる実施形態では、本明細書で提供される方法のいずれかによって決定される臓器、組織、又は細胞移植片の状態は、能動的拒絶反応、Ｔ細胞媒介性拒絶反応、抗体媒介性拒絶反応、又は混合拒絶反応などの拒絶反応の予測されるリスク又は可能性であり得る。

【００７８】

移植拒絶反応の検出

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／又は監視することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、（例えば、本開示の方法に従って決定される）移植レシピエントから得られたサンプル中の無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量が所定の閾値を超える場合、移植拒絶反応を検出することを含む。

【００７９】

所定の閾値は、概して、状態の存在若しくは非存在、又は拒絶反応若しくは非拒絶反応などの状態の存在若しくは非存在のリスク若しくは可能性の存在若しくは非存在を示す任意の所定のレベル又はレベルの範囲を指す。本開示による所定の閾値は、様々な形態をとり得る。それは、中央値又は平均値などの単一のカットオフ値であり得る。別の例として

、所定の閾値は、状態の存在、又は状態の存在のリスク若しくは可能性の前、あるいは治療の過程の後のベースライン値から決定され得る。そのようなベースラインは、試験されているリスク又は状態と相関しない移植レシピエントにおける正常又は他の状態を示し得る。例えば、ベースライン値は、移植前の移植レシピエントからのサンプル中のドナー由来の無細胞ＤＮＡなどのドナー由来の無細胞核酸のレベルであり得、これは、おそらくゼロ又は無視できるが、システムにおけるベースライン誤差も示す場合もある。いくつかの実施形態では、所定の閾値は、試験される移植レシピエントのベースライン値であり得る。所定の閾値は、移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸（例えば、ＤＮＡ）の量の顕著な変化を区別することに関連するため、大幅に変動し得る。当業者は、移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸（例えば、ＤＮＡ）の量の経時的な顕著な変化を決定するための適切なパラメータ及び手段を認識するであろう。適切な分析パラメータが選択されると、一定期間にわたる移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸（例えば、ＤＮＡ）の量の変化を決定することにより、移植片の状態の情報を得ることができる。

【００８０】

いくつかの実施形態では、経時的な移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量の増加は、移植拒絶反応又は移植拒絶反応のリスク若しくは可能性、免疫抑制療法を施すか若しくは調整することの必要性、免疫抑制治療腎毒性、感染、及び／又は移植片状態の更なる調査の必要性を示す。理論に束縛されることを望むものではないが、ドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量が、移植レシピエントにおいて経時的に増加している場合、移植片の細胞は、経時的にアポトーシス及び／又は壊死を次第に増加して経験しており、これは、移植拒絶反応又は移植拒絶反応のリスク若しくは可能性を示すと考えられる。

【００８１】

いくつかの実施形態では、経時的な移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量の減少は、移植寛容、免疫抑制療法を調整する必要性（例えば、減少させること）、及び／又は移植片状態の更なる調査の必要性を示す。理論に束縛されることを望むものではないが、ドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量が、移植レシピエントにおいて経時的に減少している場合、移植片の細胞は、経時的にアポトーシス及び／又は壊死を次第に減少して経験しており、これは、移植寛容、過剰免疫抑制、又は適切な免疫抑制を示すと考えられる。

【００８２】

いくつかの実施形態では、経時的に移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量が変化しないことは、安定した移植拒絶反応状態及び／又は免疫抑制療法を調整する機会を示す。理論に束縛されることを望むものではないが、ドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量が、移植レシピエントにおいて経時的に変化しない場合、移植片の細胞は、経時的に定常状態レベルのアポトーシスを経験しており、これは、安定な移植拒絶反応状態を示すと考えられる。安定な移植拒絶反応状態は、分析された時間ウィンドウの間の移植片の状態の情報を与え得るが、移植片が、拒絶又は寛容のいずれの方向に向かって進行するのかの情報を与えない場合がある。例えば、移植片は、移植レシピエントにおいて能動的拒絶反応を受けている可能性があるが、安定な移植拒絶反応状態は、拒絶反応速度が、それが分析された時間の間に変化していない（すなわち、移植拒絶反応速度が増加又は減少していない）ことを示す。同様に、移植片は、移植レシピエントにおいて能動的寛容を受けている可能性があるが、安定な移植拒絶反応状態は、寛容速度が、それが分析された時間の間に変化していない（すなわち、移植寛容の速度が増加又は減少していない）ことを示す。

【００８３】

Ｃ．免疫抑制療法を施すこと又は調整すること

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応を治療すること、及び／又は

ドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植レシピエントにおける免疫抑制療法を調整することを含む。

【００８４】

免疫抑制療法は、概して、移植レシピエントにおける免疫応答を抑制する免疫抑制剤又は他の治療剤の投与を指す。移植レシピエントにおける免疫抑制の医療行為は、典型的には、リンパ球を枯渇させるための誘導療法から始まり、その後コルチコステロイド、カルシニューリン阻害剤（タクロリムスなど）、及びリンパ球複製の更なる阻害剤（ミコフェノール酸モフェチルなど）などのリンパ球の活性化又は複製を阻害することを意図した維持薬が続く、予防的薬理学的薬剤のレジメンを含むように進化してきた。移植後、免疫抑制剤の投薬量は、移植片の免疫拒絶反応を依然として回避しながら、感染症のリスクの増加などの副作用の発生率及び重症度を低減するために、経時的に低減され得る。

【００８５】

いくつかの実施形態では、免疫抑制療法は、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の特定に応答して、施され得るか、又は施されることが推奨され得る。他の実施形態では、免疫抑制療法の投薬量又は頻度は、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶を含む、臓器、組織若しくは細胞移植片の拒絶反応、又は拒絶反応のリスク若しくは可能性の特定に応答して、増加させ得るか、又は増加させることを推奨され得る。例えば、ＴＣＭＲの特定に応答して、ボーラスステロイド治療が開始され得る（又は開始することを推奨され得る）か、又は用量及び／若しくは頻度に関して維持免疫抑制療法が増加し得る（又は増加することを推奨し得る）。別の例では、ＡＢＭＲの特定に応答して、血漿交換又は静脈内免疫グロブリン（intravenous immunoglobulin、ＩＶＩｇ）が開始され得る（又は開始されることが推奨され得る）。

【００８６】

他の実施形態では、免疫抑制療法の投薬量又は頻度は、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の非存在、例えば、免疫静止の特定に応答して、維持され得るか、又は維持されることが推奨され得る。他の実施形態では、免疫抑制療法の投薬量又は頻度は、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の非存在、例えば、免疫静止の特定に応答して、低減され得るか、又は低減されることが推奨され得る。他の実施形態では、免疫抑制療法の投薬量又は頻度は、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の非存在、例えば、免疫静止の特定に応答して、停止若しくは中止され得るか、又は停止若しくは中止されることが推奨され得る。

【００８７】

他の実施形態では、本開示の方法は、投与されるか又は投与されることが推奨される薬剤に関して免疫抑制療法を改変することを含み得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制療法は、例えば、Ｔ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の特定に応答して、別の免疫抑制療法に置き換えられ得る（又は置き換えられることが推奨され得る）。他の実施形態では、免疫抑制療法は、例えば、Ｔ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の特定に応答して、１つ以上の追加の免疫抑制療法と組み合わせて施され得る（又は施されることが推奨され得る）。

【００８８】

免疫抑制療法、及び免疫抑制療法に対する改変（例えば、１つの療法を別の療法に置き換えること、又は療法を組み合わせること）は、免疫抑制療法が、臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反応を軽減若しくは減少させるか、臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反応の症状を軽減若しくは減少させるか、臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反応の任意の直接的若しくは間接的な病理学的結果を減少させるか、臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反応の速度を減少させるか、臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反

応の状態を改善若しくは緩和するか、臓器、組織、若しくは細胞移植片の予後を改善するか、又は臓器、組織、若しくは細胞移植片の拒絶反応の進行を遅らせる可能性などの様々な因子に基づいて選択され得る。

【００８９】

移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量は、免疫抑制療法を施す又は調整する必要性又はその欠如を決定する場合に考慮される唯一の因子ではない場合があることに留意する必要がある。例えば、移植片の拒絶反応及び感染の重篤度の増加の両方を示す移植レシピエントについて、現在の免疫抑制療法を増加させるか、又は維持することさえも得策ではない場合がある。したがって、移植レシピエントに施される免疫抑制療法は、他の制御又は寄与臨床因子の存在又は非存在に応じて、移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの決定された量に関係なく、増加、減少、又は維持され得ることに留意する必要がある。したがって、免疫抑制療法を選択するか、施すか、改変するか、又は調整する場合に考慮され得る更なる因子としては、有害事象、望ましくない副作用、毒性、望ましくない薬物間相互作用、望ましくない症状などの免疫抑制療法の望ましくない効果の予防、制御、改善、又は低減が含まれる。

【００９０】

本開示の方法に従って使用され得る例示的な免疫抑制療法としては、例えば、アスピリン、アザチオプリン、Ｂ７ＲＰ－１－ｆｃ、ブレキナールナトリウム、カンパス－１Ｈ、セレコキシブ、クロロキン、クマジン、シクロホスファミド、シクロスポリンＡ、ＤＨＥＡ、デオキシスパーグアリン、デキサメタゾン、ジクロフェナク、ドロビド、エトドラク、エベロリムス、ＦＫ７７８、フェルデン、フェノプロフェン、フルルビプロフェン、ヘパリン、ヒドララジン、ヒドロキシクロロキン、ＣＴＬＡ－４又はＬＦＡ３免疫グロブリン、イブプロフェン、インドメタシン、ＩＳＡｔｘ－２４７、ケトプロフェン、ケトロラク、レフルノミド、メクロフェナメート、メフェナム酸、メパクリン、６－メルカプトプリン、メロキシカム、メトトレキサート、ミゾリビン、ミコフェノール酸誘導体、ナプロキセン、オキサプロジン、プラケニル、ＮＯＸ－１００、プレドニゾン、メチルプレドニゾロン、ラパマイシン（シロリムス）、スリンダク、タクロリムス（ＦＫ５０６）、チモグロブリン、トルメチン、トレスペリムス、ＵＯ１２６を含む、カルシニューリン阻害剤、ｍＴＯＲ阻害剤、ＡＣＥ阻害剤、抗凝固剤、抗マラリア薬、β遮断剤、コルチコステロイド、心臓血管薬、非ステロイド抗炎症薬（non-steroidal anti-inflammatory drugs、ＮＳＡＩＤ）、及びステロイド、並びに、例えば、アルファリンパ球抗体、アダリムマブ、抗ＣＤ３、抗ＣＤ２５、抗ＣＤ５２、抗ＩＬ２Ｒ、抗ＴＡＣ抗体、バシリキシマブ、ダクリズマブ、エタネルセプト、ｈｕ５Ｃ８、インフリキシマブ、ＯＫＴ４、及びナタリズマブを含む抗体、並びにそれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。

【００９１】

移植関連療法を施すこと又は調整すること

本開示の方法はまた、他の移植関連療法を施すか、又は調整する必要性の情報を与えるために使用され得る。概して、移植レシピエントにおける所定の閾値を超えるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量は、他の移植関連療法を施すか又は調整する必要性を決定することに関して有益であり得る。

【００９２】

他の移植関連療法には、移植片の生存を促進するため、又は移植関連症状）例えば、サイトカイン放出症候群、神経毒性）を治療するために移植レシピエントに施される移植又は免疫抑制療法以外の治療又は療法が含まれる。他の移植関連療法の例としては、抗体、抗原標的化リガンド、非免疫抑制薬、及び移植活性に重要であるか、又は１つ以上の移植活性を直接活性化若しくは阻害する、移植片構成要素を安定化若しくは不安定化する他の薬剤の投与が挙げられるが、これらに限定されない。これらの活性には、免疫応答を誘導、改変、又は減弱し、特定の抗原を認識し、複製し、かつ／又は損傷組織の修復を誘導する能力が含まれ得る。

【００９３】
移植レシピエントの監視の調整
本開示の方法はまた、移植片のレシピエントの監視を調整する必要性の情報を与えるために使用され得る。概して、移植レシピエントにおける所定の閾値を超えるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの量は、移植片のレシピエントの監視を調整する必要性を決定することに関して有益であり得る。いくつかの実施形態では、上記のように移植片の状態を決定することは、移植レシピエントの監視を調整する必要性を決定することに関して有益である。
【００９４】
移植片の状態に依存して、レシピエントの監視はそれに応じて調整され得る。例えば、監視は、適宜、監視の頻度を増加又は減少させることによって調整され得る。監視は、監視の手段を変更することによって、例えば、レシピエントを監視するために使用される測定基準又はアッセイを変更することによって調整され得る。
【００９５】
Ｄ．報告
いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、報告を作成及び／又は提供することを含み得る。
【００９６】
いくつかの実施形態では、報告は、例えば、本明細書に記載の方法に従って決定される、移植レシピエントにおける臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応状態の評価又は診断を含む。いくつかの実施形態では、報告は、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の存在を示す。いくつかの実施形態では、報告は、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応のリスク又は可能性を示す。いくつかの実施形態では、報告は、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の非存在、例えば、免疫静止を示す。いくつかの実施形態では、報告は、例えば、上でより詳細に記載されているように、例えば、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む、本明細書で提供される方法による臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の検出に少なくとも部分的に基づいて、移植レシピエントに免疫抑制療法を施す推奨を含む。いくつかの実施形態では、報告は、上でより詳細に記載されているように、例えば、本明細書で提供される方法による臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の存在又は非存在の検出に少なくとも部分的に基づいて、移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整又は改変するための推奨、例えば、用量若しくは頻度を増加、減少、若しくは維持するか、又は免疫抑制療法を中止若しくは改変する推奨を含む。
【００９７】
いくつかの実施形態では、報告は、例えば、上でより詳細に記載されているように、レシピエントにおける臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応（例えば、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む）の存在を示し、移植レシピエントに免疫抑制療法を施す推奨を含む。いくつかの実施形態では、報告は、上でより詳細に記載されているように、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応（例えば、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む）の存在を示し、移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整する、例えば、用量若しくは頻度を増加させるか、又は免疫抑制療法を改変する推奨を含む。いくつかの実施形態では、報告は、例えば、上でより詳細に記載されているように、レシピエントにおける臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応（例えば、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭ

Ｒ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む）のリスク又は可能性を示し、移植レシピエントに免疫抑制療法を施す推奨を含む。いくつかの実施形態では、報告は、上でより詳細に記載されているように、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応（例えば、臓器、組織、又は細胞移植片のＴ細胞媒介性拒絶反応（ＴＣＭＲ）、抗体媒介性拒絶反応（ＡＢＭＲ若しくはＡＭＲ）、又は混合拒絶反応を含む）のリスク又は可能性を示し、移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整する、例えば、用量若しくは頻度を増加させるか、又は免疫抑制療法を改変する推奨を含む。いくつかの実施形態では、報告は、上でより詳細に記載されているように、臓器、組織、又は細胞移植片の拒絶反応の非存在を示し、移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整若しくは改変する、例えば、用量若しくは頻度を維持若しくは減少させる、又は免疫抑制療法を中断若しくは改変する推奨を含む。

【００９８】

本開示による報告は、デジタル、電子、ウェブベース、又は紙の形態などの任意の好適な形態であり得る。いくつかの実施形態では、報告は、移植レシピエント、介護者、医師、病院、診療所、第三者支払人、保険会社、政府機関、及びそれらの任意の組み合わせなどの１つ以上の当事者に提供され得る。

【００９９】

いくつかの実施形態では、報告は、予後、又は潜在的若しくは提案される治療選択肢に関する情報を含み得る。報告は、治療選択肢の可能性のある有効性、治療選択肢の受容性、又は治療選択肢を移植レシピエントに適用することの妥当性に関する情報を含み得る。例えば、報告は、免疫抑制療法などの薬物の投与、並びに推奨される投薬量若しくは治療レジメン、及び／又は他の薬物の組み合わせに関する情報又は推奨を含み得る。

【０１００】

いくつかの実施形態では、報告は、移植レシピエントからサンプルを入手するか若しくは受け取ってから、又は臓器、細胞、若しくは組織移植片の状態（例えば、臓器、細胞、若しくは組織移植片の拒絶反応の有無）を決定してから、１日未満以内に、又は約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約１週間、約２週間、約３週間、約４週間、若しくは約１か月のうちのいずれか以内に作成し、かつ／又は当事者に提供され得る。

【０１０１】

ＩＩ．無細胞核酸

本明細書で提供される方法は、移植レシピエントにおける臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出及び監視するための、移植レシピエントからの無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ、ＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、二本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡ、一本鎖ＤＮＡヘアピン、ＤＮＡ／ＲＮＡハイブリッド、ＲＮＡヘアピン、及びそれらの組み合わせ）の分析を含む。

【０１０２】

無細胞核酸とは、概して、例えば、移植レシピエントの体液（例えば、血液、血漿、血清、尿など）中に存在する核酸などの、細胞外に存在するか又は循環する核酸を指す。無細胞核酸は、細胞内の様々な位置を起源とし得る。例えば、無細胞ＤＮＡなどの無細胞核酸は、例えば、核ＤＮＡ及び／又はミトコンドリアＤＮＡを起源とし得る。理論に束縛されることを望むものではないが、無細胞核酸は、細胞のアポトーシス又は壊死（すなわち、細胞死）を介して細胞から放出されると考えられる。したがって、理論に束縛されることを望むものではないが、移植拒絶反応の間、臓器、組織、又は細胞移植片からの細胞のアポトーシス又は壊死は、ドナー由来の無細胞核酸が移植レシピエントの体液中に放出されることをもたらすと考えられる。したがって、移植拒絶反応を受けている移植レシピエントは、自身の内因性無細胞核酸（レシピエント由来の無細胞核酸）並びにドナーを起源とする無細胞核酸（ドナー由来の無細胞核酸）の両方を含む無細胞核酸集団を体液中に有し得る。したがって、本明細書に開示されるように、本開示の方法に従って移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸のレベルの評価は、臓器、組織、又は細胞移植片の

状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するために使用され得る。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、例えば、本明細書で提供される検出／定量方法のうちのいずれかに従って、移植レシピエントからの無細胞核酸を含むサンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定することを含む。以下により詳細に記載されるように、移植レシピエントからのサンプルは、全血、血漿、血清、リンパ、尿、口腔スワブ、骨髄、唾液、汗、肺洗浄液、涙、耳流液、痰、骨髄液懸濁液、精液、膣流、脳脊髄液、脳液、腹水、乳、気道の分泌物、腸管液、又は尿生殖路液を含む任意の体液であり得るか、又はこれら由来であり得る。いくつかの実施形態、サンプルは、尿であるか、又は尿由来である。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血又はその画分（例えば、血清又は血漿）であるか、又はそれに由来する。いくつかの実施形態は、サンプルは、血漿であるか、又は血漿由来である。いくつかの実施形態では、サンプル中に存在する無細胞核酸は、完全にレシピエント由来であり得るか、又はレシピエント由来及びドナー由来の核酸の混合物を含み得る。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸は、ドナー由来の無細胞ＤＮＡであり、かつ／又はレシピエント由来の無細胞核酸は、レシピエント由来の無細胞ＤＮＡである。いくつかの実施形態では、ドナー由来の無細胞核酸は、ドナー由来の無細胞ＲＮＡであり、かつ／又はレシピエント由来の無細胞核酸は、レシピエント由来の無細胞ＲＮＡである。いくつかの実施形態では、無細胞ＲＮＡは、組織特異的ＲＮＡ転写物を含む。いくつかの実施形態では、移植レシピエントからの無細胞ＲＮＡを遺伝子発現レベルについて分析して、臓器、組織、又は細胞移植片の状態を検出、予測、診断、及び／又は監視し得る。

【０１０５】

Ａ．抽出

移植レシピエントからのサンプルからの無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡ）は、本開示の方法による分析の前に抽出され得る。無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡなどの無細胞核酸の抽出のための方法は、当技術分野において既知であり、例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ｌａｔｅｓｔ ｅｄｉｔｉｏｎを参照されたい。使用され得る例示的な非限定的な方法としては、トリトン－熱－フェノール（Triton-Heat-Phenol、ＴＨＰ）法（Ｘｕｅ ｅｔ ａｌ．，（２００９）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｉｍ．Ａｃｔａ ４０４，１００－１０４）、フェノール－クロロホルムイソアミルアルコール単離（phenol-chloroform isoamyl alcohol isolation、ＰＣＩ）プロトコル（Ｙｕａｎ ｅｔ ａｌ．，（２０１２）Ｙｏｎｓｅｉ Ｍｅｄ．Ｊ．５３：１３２、Ｓｃｈｍｉｄ ｅｔ ａｌ．，（２００５）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．５１，１５６０－１５６１、及びＨｕｆｎａｇｌ ｅｔ ａｌ．，（２０１３）Ｊ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｉｎｖｅｓｔｉｇ．４，１－３）、及び塩析法（Ｍｉｌｌｅｒ ｅｔ ａｌ．，（１９８８）Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１６：１２１５、Ｊｏｒｇｅｚ ｅｔ ａｌ．，（２００６）Ｇｅｎｅｔ．Ｍｅｄ．８，６１５－６１９）が挙げられる。無細胞核酸を抽出する他の例示的で非限定的な方法は、当技術分野において既知であり例えば、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 Ｐ

lasma 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、及びSwinkels et al．Effects of Blood－Processing Protocols on Cell－free DNA Quantification in Plasma．Clinical Chemistry，２００３，ｖｏｌ．４９，ｎｏ．３，５２５－５２６を参照されたい。無細胞核酸を抽出するための当技術分野で既知の任意の方法が、本開示の方法において使用され得る。いくつかの実施形態では、サンプルからの無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡなどの無細胞核酸の抽出は、Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡａｍｐ Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｋｉｔ、ＢｉｏＣｈａｉｎ ｃｆＰｕｒｅ Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ ＤＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ ＭａｇＭａｘ Ｃｅｌｌ－Ｆｒｅｅ ＤＮＡ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ、Ｒｏｃｈｅ ＭａｇＮａ Ｐｕｒｅ ２４システム、Ｚｙｍｏ Ｑｕｉｃｋ－ｃｆＤＮＡ Ｓｅｒｕｍ ＆ Ｐｌａｓｍａ Ｋｉｔ、又はＭａｃｈｅｒｅｙ－Ｎａｇｅｌ ＮｕｃｌｅｏＳｎａｐ ｃｆＤＮＡキット、ＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｇｅｌ及びＰＣＲ Ｃｌｅａｎ－Ｕｐキット、又はＮｕｃｌｅｏＳｐｉｎ Ｐｌａｓｍａ ＸＳキットなどの市販のキットを使用して実施され得る。いくつかの実施形態では、サンプルからの無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡなどの無細胞核酸の抽出は、Ｑｉａｇｅｎ ＱＩＡａｍｐ Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｋｉｔを使用して実施される。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡなどの無細胞核酸は、例えば、本開示の方法による分析の前に、品質、量（例えば、濃度又は絶対量）、及び／又は断片サイズについて更に評価され得る。無細胞核酸の定量化、品質分析、及び／又は断片サイズ分析は、蛍光定量的ｄｓＤＮＡアッセイなどの当技術分野で既知の任意の方法を使用して（例えば、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ製のＱｕａｎｔ－ｉＴ ＰｉｃｏＧｒｅｅｎ ｄｓＤＮＡ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔを使用して）、Ｑｕｂｉｔアッセイ、リアルタイムＰＣＲ、定量的ＰＣＲ、又はデジタル液滴ＰＣＲを使用するなど蛍光光度計を使用して（例えば、Ｒａｇｏ ｅｔ ａｌ．（２００７）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６７，９３６４－９３７０、Ｔａｋａｉ ｅｔ ａｌ．（２０１５）Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．５：１８４２５、Ｒｏｓｔａｍｉ ｅｔ ａｌ．，（２０２０）Ｃｅｌｌ Ｒｅｐ．３１：１０７８３０、Ｈｅｅｔ ａｌ．（２０１９）Ｓｃｉ．Ｒｅｐ．９：５５９９を参照されたい）、バイオアナライザーを使用して（例えば、Ｈｉｇｈ Ｓｅｎｓｉｔｉｖｉｔｙ ＤＮＡマイクロチップキット（Ａｇｉｌｅｎｔ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）及びＡｇｉｌｅｎｔ ２１００ Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒを使用して）、実施され得る。いくつかの実施形態では、無細胞核酸はまた、メチル化などの改変の存在又は非存在について評価され得る。例えば、Ｑｉａｇｅｎ製のＥｐｉＴｅｃｔ Ｐｌｕｓ ＤＮＡ Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ Ｋｉｔ又はＰｙｒｏＭａｒｋ ＰＣＲ Ｋｉｔなどのキットを使用する、バイサルファイトに基づくメチル化分析などの、当技術分野で既知の核酸の改変を分析するための任意の好適な方法が使用され得る。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、少なくとも約１０ｎｇ、２０ｎｇ、３０ｎｇ、４０ｎｇ、５０ｎｇ、１００ｎｇ、２００ｎｇ、３００ｎｇ、４００ｎｇ、５００ｎｇ、６００ｎｇ、７００ｎｇ、８００ｎｇ、９００ｎｇ、１０００ｎｇ、２０００ｎｇ、３０００ｎｇ、４０００ｎｇ、５０００ｎｇ、又はそれ以上のうちのいずれかの無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）が、例えば、抽出後に移植レシピエントからのサンプルから得られ

得る。いくつかの実施形態では、約５０ｎｇ～約５０００ｎｇ、約１００ｎｇ～約４０００ｎｇ、又は約２００ｎｇ～約４０００ｎｇ（列挙された範囲のそれぞれの範囲内の任意の値を含む）の無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）が、例えば、抽出後に、移植レシピエントからのサンプルから得られ得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法における使用のための無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）は、例えば、抽出後に、少なくとも約０．０１ｎｇ／μＬ、０．１ｎｇ／μＬ、０．５ｎｇ／μＬ、０．７５ｎｇ／μＬ、１ｎｇ／μＬ、５ｎｇ／μＬ、１０ｎｇ／μＬ、１５ｎｇ／μＬ、２０ｎｇ／μＬ、２５ｎｇ／μＬ、３０ｎｇ／μＬ、３５ｎｇ／μＬ、４０ｎｇ／μＬ、４５ｎｇ／μＬ、５０ｎｇ／μＬ、５５ｎｇ／μＬ、６０ｎｇ／μＬ、６５ｎｇ／μＬ、７０ｎｇ／μＬ、又はそれ以上のうちのいずれかの濃度を有し得る。いくつかの実施形態では、本開示の方法で使用するための無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）は、例えば抽出後に、列挙された範囲の各々内の任意の値を含む、約１ｎｇ／μＬ～約１００ｎｇ／μＬ、約１ｎｇ／μＬ～約７０ｎｇ／μＬ、又は約４ｎｇ／μＬ～約７０ｎｇ／μＬの濃度を有し得る。

【０１０８】

Ｂ．増幅

移植レシピエントから得られたサンプルから単離された無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又は無細胞ＲＮＡ）は、例えば、本開示の方法に従って、下流の技術及び分析のために増幅され得る。

【０１０９】

核酸を増幅する方法は、当技術分野で周知である。増幅は、概して、核酸のコピーを生成し得る任意のデバイス、方法、又は技術を指す。無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）の増幅は、例えば、ループ媒介等温増幅（Loop-mediated isothermal amplification、ＬＡＭＰ）などの等温増幅技術、及び線形増幅（米国特許第６，１３２，９９７号を参照）、ローリングサークル増幅などのポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction、ＰＣＲ）技術などを含み得る。無細胞核酸（例えば、無細胞ＤＮＡ又はＲＮＡ）は、例えば、ｑＰＣＲ、ｄＰＣＲ又は配列決定による下流分析における使用のために増幅され得る。無細胞核酸が無細胞ＲＮＡである場合、方法は、例えば、逆転写酵素を使用して、無細胞ＲＮＡからＤＮＡを生成するステップを含み得る。Ｆｌｕｉｄｉｇｍ Ａｃｃｅｓｓ Ａｒｒａｙ（商標）システム、ＲａｉｎＤａｎｃｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ ＲａｉｎＤｒｏｐシステム、又はマルチプレックス増幅のための他の技術は、マルチプレックス又は高度並列シンプレックス核酸増幅のために使用され得る。増幅は、例えば、ＦａｓｔＳｔａｒｔ Ｈｉｇｈ Ｆｉｄｅｌｉｔｙ（Ｒｏｃｈｅ）、Ｅｘｐａｎｄ Ｈｉｇｈ Ｆｉｄｅｌｉｔｙ（Ｒｏｃｈｅ）、Ｐｈｕｓｉｏｎ Ｆｌａｓｈ ＩＩ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、Ｐｈｕｓｉｏｎ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＩＩ（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）、ＫＡＰＡ ＨｉＦｉ（Ｋａｐａ ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓ）、又はＫＡＰＡ２Ｇ（Ｋａｐａ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）などの高忠実度ポリメラーゼの使用を含み得る。

【０１１０】

増幅は、分子インデックス化と称される、各個々の分子に固有の配列を付加する最初のＰＣＲサイクルを含み得る。増幅された核酸はまた、インデックス化（バーコード化又はタグ付けとも称される）などの追加のプロセスに供され得る。核酸をインデックス化する方法は、当技術分野で周知であり、本明細書に記載される。インデックス化は、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ、ＭｉＳｅｑ、並びにＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｉｏｎ ＰＧＭ及びＩｏｎ Ｐｒｏｔｏｎなどの様々な配列決定システムと適合するマルチプレックス配列決定プラットフォームの使用を可能にする。マルチプレックス配列決定は、配列決定された核酸のサンプル供給源を特異的に特定するためのインデックス化の使用を介して、単一の反応における複数のサンプルからの核酸の配列決定を可能にする。

【０１１１】

ＩＩＩ．サンプル

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、無細胞核酸を含む１つ以上のサンプルなどの、移植レシピエントからの１つ以上のサンプル、例えば、１つ以上の生体サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定することを含む。

【０１１２】

概して、本明細書で提供される方法によるサンプルは、全血、血漿、血清、リンパ、末梢血単核細胞尿、口腔スワブ、骨髄、唾液、汗、肺洗浄液、涙、耳流液、痰、骨髄懸濁液からの液体、精液、膣流、脳脊髄液、脳液、腹水、乳、気道の分泌物、腸管液、又は尿生殖路液のサンプルを含む任意の体液であり得る（又はこれら由来であり得る）。いくつかの実施形態、サンプルは、尿であるか、又は尿由来である。いくつかの実施形態では、サンプルは、全血又はその画分（例えば、血清又は血漿）であるか、又はそれに由来する。いくつかの実施形態は、サンプルは、血漿であるか、又は血漿由来である。いくつかの実施形態では、サンプルは、血清であるか、又は血清由来である。いくつかの実施形態では、サンプルが血液、血清、又は血漿である（又はそれら由来である）場合、血液、血清、又は血漿は、移植レシピエントの静脈血又は動脈血由来である。いくつかの実施形態では、血液、血清、又は血漿は、移植レシピエントの静脈血由来である。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、本開示による移植レシピエントからのサンプルは、無細胞核酸を含む。いくつかの実施形態では、サンプル中に存在する無細胞核酸は、完全にレシピエント由来の無細胞核酸であり得るか、又はサンプル中に存在する無細胞核酸は、レシピエント由来の無細胞核酸及びドナー由来の無細胞核酸の混合物を含み得る。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、レシピエントからのサンプルを提供することを含む。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、レシピエントから、例えば、サンプル及び／又は分析物の分解及び／又は汚染を防止する方法で、及びサンプル及び／又は分析物の分解及び／又は汚染を防止する特別に調製された容器中にサンプルを得ることを更に含む。サンプルが得られると、サンプルは、サンプルの（例えば、サンプル中の無細胞核酸などのサンプル中の核酸の）完全性を維持し、サンプルの分解及び／又は汚染を防止する条件で、直接使用されるか、凍結されるか、又は他の方法で保存され得る。特定の時間に採取されるサンプルの量は、変動し得、サンプルの分析を繰り返す任意の必要性などの追加の要因に依存し得る。いくつかの実施形態では、最大５０、４０、３０、２０、１０、９、８、７、６、５、４、３、２、１、０．５、０．１ｍＬのサンプルが得られる。いくつかの実施形態では、０．１～１、１～５０、２～４０、３～３０、又は４～２０ｍＬのサンプルが得られる。いくつかの実施形態では、１、５、１０、１５、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０、５５、６０、６５、７０、７５、８０、８５、９０、９５、又は１００ｍＬ超のサンプルが得られ得る。

【０１１５】

サンプルは、移植レシピエントから１回又は２回以上得られ得る。複数のサンプルが移植レシピエントから得られる場合、サンプリングの頻度は変動し得る。例えば、サンプルは、最初のサンプリング事象の後、約１日に１回、約１日おきに１回、約３日に１回、約１週間に１回、約２週間に１回、約３週間に１回、約１か月に１回、約２か月に１回、約３か月に１回、約４か月に１回、約５か月に１回、約６か月に１回、約１年に１回、又は約２年に１回、又はそれ以上、得られ得る。いくつかの実施形態では、１、２、３、４、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、若しくは５００個、又はそれ以上のサンプルのうちのいずれかが、レシピエントから得られ得る。いくつかの実施形態では、１～５、５～１０、１０～２０、２０～３０、３０～４０、４０～５０、５０～６０、６０～７０、７０～８０、８０～９０、９０～１００、１００～２００、２００～３００、３００～４００、若しくは４００～５００個、又はそれ以上のサンプルのうちのいずれかがレシピエントから得られ得る。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、本開示の方法に従ってレシピエントにおける臓器、細胞、又は組織移植片の状態を決定、すなわち検出、予測、診断、及び／又は監視する際の使用のために、ある時間間隔にわたって移植レシピエントからから得られ得る。移植事象後にサンプルが移植レシピエントから採取される時間間隔は、変動し得る。サンプリングのための例示的な間隔は、例えば、米国出願第１４／６５８，０６１号に記載されており、これは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。例えば、サンプルは、本開示の方法に従ってレシピエントにおける臓器、細胞、又は組織移植片の状態を決定、すなわち検出、予測、診断、及び／又は監視する際の使用のために、様々な時間及び様々な期間にわたって移植レシピエントから採取され得る。いくつかの実施形態は、レシピエントが臓器、細胞、又は組織移植片を受ける前に、移植レシピエントから１つ以上のサンプルが採取され得る。いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植事象後又は最初のサンプルがレシピエントから採取された後（すなわち、最初のサンプリング事象後）、約１日、約２日、約３日、約４日、約５日、約６日、約７日、約１週間、約２週間、約３週間、約４週間、約１か月、約２か月、約３か月、約４か月、約５か月、約６か月、約７か月、約８か月、約９か月、約１０か月、約１１か月、約１２か月、約１年、約２年、約３年、約４年、約５年、約６年、約７年、約８年、約９年、約１０年、約１１年、約１２年、約１３年、約１４年、約１５年、約１６年、約１７年、約１８年、約１９年、約２０年、約２１年、約２２年、約２３年、約２４年、約２５年、約２６年、約２７年、約２８年、約２９年、約３０年、又はそれ以上のうちのいずれか、又はそれらのうちのいずれかの任意の組み合わせで、移植レシピエントから採取され得る。いくつかの実施形態は、サンプルは、移植事象の約３か月後、約６か月後、約９か月後、又は１年未満後以内に移植レシピエントから採取され得る。いくつかの実施形態では、サンプルは、移植事象の１周年前の様々な時間に、移植事象の１周年に、又は移植事象の１周年後の様々な時間に、移植レシピエントから採取され得る。例えば、移植後１周年に、サンプルは、１２か月目（すなわち、移植事象の１周年）に開始して、この後の期間にわたって連続的に、移植レシピエントからを採取され得る。いくつかの実施形態では、移植レシピエントからサンプルを得るための期間は、ドナーからレシピエントへの移植が行われた後の最初の数日以内である。これは、導入療法を監視するために行われ得る。いくつかの実施形態では、移植レシピエントからサンプルを得るための期間は、レシピエントに施される免疫抑制レジメンの漸減中、ドナーからレシピエントへの移植が行われた後の最初の１２か月間に典型的に生じる期間を含む。いくつかの実施形態では、移植レシピエントからサンプルを得るための期間は、ドナーからレシピエントへの移植が行われた後、約１２～１４か月、又はそれより前若しくは後に開始し得る、初期の長期免疫抑制維持期の間を含む。いくつかの実施形態では、移植レシピエントからサンプルを得るための期間は、ドナーからレシピエントへの移植が行われた後、１２か月を超える任意の時間、又はそれより前若しくは後であり得る免疫抑制レジメンの長期維持全体の間を含む。

【０１１７】

いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植後最初の３週間に週２回、移植レシピエントから得られる。いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植後最初の１週間又は２週間、毎日得られる。いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植後最初の３か月間、週１回得られる。いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植後最初の１年間、月に１回得られる。いくつかの実施形態では、１つ以上のサンプルは、移植後最初の１年の後に年に４回得られる。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、サンプルは、移植事象の１周年（すなわち、移植事象の１２か月後）に開始して、１～３か月間連続して移植レシピエントから得られ、３か月の時間間隔にわたって採取された分析用の合計４～６個のサンプルを提供し、サンプルは約２週間ごとに収集される。いくつかの実施形態では、移植片のレシピエントは、移植事象の１周年（すなわち、移植事象の１２か月後）に開始して、１～３か月間連続して週１回採取されたサンプルを有し、３か月の時間間隔にわたって採取された分析用の合計１２個のサ

ンプルを提供する。移植片のレシピエントからサンプルを得る総期間、並びにこのようなサンプルを得る頻度は、変動し得、臨床的進行などの様々な因子に依存する。例えば、移植レシピエントは、生涯の間に得られたサンプルを有し得る。サンプリングの適切なタイミング及び頻度は、所定の移植レシピエントについて当業者によって決定され得る。

【０１１９】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法は、例えば、本開示の方法に従って使用するために、レシピエントから１つ以上のサンプルを提供することを含む。

【０１２０】

ＩＶ．ドナー及びレシピエント

本開示の方法は、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／若しくは監視すること、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応を治療すること、並びに／又はドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植レシピエントにおける免疫抑制療法を調整することを含む。

【０１２１】

いくつかの実施形態では、本開示による臓器、組織、又は細胞移植片は、異種間移植片（すなわち、異種（xenogeneic）移植片又は異種（heterologous）移植片）であり、臓器、組織、又は細胞移植ドナーは、移植レシピエントとは異なる種のものである。したがって、いくつかの実施形態では、本開示の方法は、異種間、異種（xenogeneic）、若しくは異種（heterologous）の臓器、組織、若しくは細胞移植片の状態を検出、予測、診断、及び／若しくは監視すること、異種間、異種（xenogeneic）、若しくは異種（heterologous）の臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応を治療すること、及び／又は異種間、異種（xenogeneic）、若しくは異種（heterologous）の臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植レシピエントにおける免疫抑制療法を調整することを含み、臓器、組織、若しくは細胞移植ドナーは、移植レシピエントとは異なる種のものである。

【０１２２】

いくつかの実施形態では、移植レシピエント及び移植ドナーは、動物である。いくつかの実施形態では、移植レシピエント及び／又は移植ドナーは、脊椎動物である。いくつかの実施形態では、移植レシピエント及び／又は移植ドナーは、哺乳動物である。いくつかの実施形態では、移植レシピエント及び／又は移植ドナーは、非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態では、移植レシピエントは、ヒトであり、移植ドナーは、非ヒト脊椎動物又は非ヒト哺乳動物などの非ヒト動物である。いくつかの実施形態では、移植レシピエントは、非ヒト脊椎動物又は非ヒト哺乳動物などの非ヒト動物であり、移植ドナーは、ヒト化非ヒト臓器である。いくつかの実施形態では、非ヒト動物は、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、げっ歯類、鳥類、爬虫類、又は他の非ヒト動物である。いくつかの実施形態では、非ヒト哺乳動物は、非ヒト霊長類、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、げっ歯類、又は他の非ヒト哺乳動物である。いくつかの実施形態では、げっ歯類は、マウス、ラット、リス、プレーリードッグ、ヤマアラシ、ビーバー、モルモット、ハムスター、又は別のげっ歯類である。いくつかの実施形態では、非ヒト霊長類は、サル又は類人猿である。いくつかの実施形態では、非ヒト霊長類は、チンパンジー、ボノボ、ゴリラ、オランウータン、アカゲザル、カニクイザル、ブタオザル、アフリカミドリザル、マーモセット、オマキザル、クモザル、ベルベットサル、ヒヒ、リスザル、ヨザル、又は別の非ヒト霊長類である。いくつかの実施形態では、移植レシピエントは、ヒトであり、移植ドナーは、ブタである。いくつかの実施形態では、ブタは、Ｓｕｓ ｓｃｒｏｆａ、Ｓｕｓ ｓｃｒｏｆａ ｄｏｍｅｓｔｉｃｕｓ、Ｐｈａｃｏｃｈｏｅｒｕｓ ａｅｔｈｉｏｐｉｃｕｓ、Ｐｏｔａｍｏｃｈｏｅｒｕｓ ｐｏｒｃｕｓ ｐｏｒｃｕｓ、Ｐｏｔａｍｏｃｈｏｅｒｕｓ ｐｏｒｃｕｓ、Ｂａｂｉｒｏｕｓａ ｂａｂｙｒｕｓｓａ種である。いくつかの実施形態では、ブタは、ハンフォードブタ、ミニブタ若しくはマイクロブタ、ユカタンブタ、ユカタンマイクロブタ、シンクレアブタ、ゲッティ

ンゲンブタ、デュロックブタ、ヨークシャーブタ、ランドレースブタ、又はそれらの組み合わせ、雑種、若しくは交雑種である。

【０１２３】

いくつかの実施形態では、ドナー及び／又はレシピエントは、遺伝的に改変されているか、又は遺伝的に改変されている１つ以上の細胞、臓器、若しくは組織を含む。いくつかの実施形態では、臓器、組織、又は細胞移植片は、遺伝子改変される。そのような遺伝子改変としては、例えば、遺伝子不活性化若しくは完全な遺伝子ノックアウト、及び／あるいはレシピエント若しくはドナー、又は非レシピエント若しくは非ドナー、移植ドナーの元のゲノムが保有しなかった遺伝子の遺伝的組込み又は発現が挙げられ得る。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、移植片は、成体（例えば、成人のヒト又は非ヒト動物）由来である。いくつかの実施形態では、移植片は、胎児、胚、胚性幹細胞、人工多能性幹細胞、小児、又は１０代の若者、若年若しくは青年由来である。いくつかの実施形態では、移植片は、男性又は女性由来である。

【０１２５】

Ｖ．臓器、細胞、及び組織移植片

本開示の方法は、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、若しくは細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／若しくは監視することを含む。

【０１２６】

いくつかの実施形態では、本開示による移植片は、１つ以上の臓器の移植片である。いくつかの実施形態では、臓器は、実質臓器又は中空臓器である。いくつかの実施形態では、移植片は、臓器全体又は臓器の一部分である。いくつかの実施形態では、臓器は、腎臓、膵臓、肝臓、心臓、肺、腸、膀胱、副腎、虫垂、脳、耳、食道、眼、胆嚢、膀胱、小腸若しくは大腸、口、筋肉、鼻、副甲状腺、松果体、脳下垂体、脾副甲状腺、胃、胸腺、甲状腺、気管、子宮内、又は虫垂のうちのいずれかであり得る。いくつかの場合では、臓器は、腺臓器である。例えば、臓器は、消化器系又は内分泌系の臓器であり得る。いくつかの場合では、臓器は、内分泌腺及び消化器臓器の両方であり得る。いくつかの場合では、臓器は、内胚葉、外胚葉、原始内胚葉、又は中胚葉由来であり得る。いくつかの実施形態では、移植片は、血管新生複合移植組織である。いくつかの実施形態では、臓器移植片は、無傷な臓器、無傷な臓器の断片、破壊された臓器、又は臓器からの細胞である。

【０１２７】

いくつかの実施形態では、移植片は、腎臓移植片である。腎臓移植片はまた、腎移植片とも称され得る。いくつかの実施形態では、腎臓移植片は、死亡したドナー又は生きているドナー由来である。いくつかの実施形態では、腎臓は、膵臓と一緒に移植される。いくつかの実施形態では、腎臓移植片は、ブタドナー由来である。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、移植片は、心臓移植片である。心臓移植片はまた、心移植片とも称される。いくつかの実施形態では、心臓移植片は、ブタドナー由来である。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、本開示による移植片は、１つ以上の細胞の移植片である。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、レシピエントへの投与のためにドナーから直接採取されるか、１つ以上の細胞は、ドナーから採取され、レシピエントへの投与前に遺伝子操作されるか、１つ以上の細胞は、ドナーから採取され、レシピエントへの投与前に培養されるか、１つ以上の細胞は、ドナーから採取され、レシピエントへの投与前に製造プロセスに供されるか、又はそれらの組み合わせ。１つ以上の細胞はまた、レシピエントへの投与前に保存され得る（例えば、「既製」細胞）。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、血液細胞、幹細胞、心筋細胞、ニューロン、リンパ球、ナチュラルキラー（natural killer、ＮＫ）細胞、ＮＫ Ｔ細胞、Ｔ制御性（T regulatory、Ｔ－ｒｅｇ）細胞、ニューロン、マクロファージ、樹状細胞、膵島細胞、又はそれらの任意の組み合わせである。いくつかの実施形態では、血液細胞は、造血幹細胞（hematopoietic st

em cell）（すなわち、ＨＳＣ）、Ｔ細胞、Ｂ細胞、キメラ抗原受容体（chimeric antigen receptor、ＣＡＲ）Ｔ細胞、ＮＫ細胞、ＮＫ　Ｔ細胞、腫瘍浸潤リンパ球（tumor-infiltrating lymphocyte、ＴＩＬ）、及びそれらの任意の組み合わせを含み得る。ある実施形態では、１以上の細胞は、ＣＡＲ　Ｔ細胞、ユニバーサルＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ＣＡＲは特異的抗原に結合する抗体に結合する）、スプリットＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、二量体化剤はＣＡＲ　Ｔ細胞機能を活性化する）、活性化可能ＣＡＲ　Ｔ細胞、抑制可能ＣＡＲ　Ｔ細胞、多相ＣＡＲ　Ｔ細胞（すなわち、ＣＡＲは複数の特異的抗原及び／又はＴ細胞活性化を誘導する薬剤に結合する必要がある）、腫瘍浸潤リンパ球、制御性Ｔ細胞、遺伝子改変Ｔ細胞、遺伝子改変又は合成Ｔ細胞受容体（T cell receptors、ＴＣＲ）を有するＴ細胞、ウイルス特異的Ｔ細胞（例えば、ＥＢＶ、ＨＰＶ、ＢＫＶ、ＣＭＶなど）、抗原特異的Ｔ細胞、ネオ抗原特異的Ｔ細胞、又はドナーから単離された任意の細胞である。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、骨髄細胞、臍帯血細胞、又は精製された細胞として投与される。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、骨髄細胞である。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、臍帯血細胞である。いくつかの実施形態では、移植片は、幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、骨髄幹細胞、臍帯血幹細胞、又は精製された幹細胞として投与される。いくつかの実施形態では、幹細胞は、ドナー由来である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血細胞移植として投与される。いくつかの実施形態では、血液細胞は、白血球（例えば、単球、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、マクロファージなど）、赤血球（erythrocyte）、及び血小板のうちの１つ以上を含む。いくつかの実施形態では、血液細胞は、輸血（例えば、全血輸血）、血液の個々の構成要素の輸血、又は白血球（例えば、単球、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、又はマクロファージ）、赤血球（erythrocyte）、若しくは血小板などの精製された細胞の輸血として投与される。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、臓器（例えば、本明細書に記載の臓器又は当技術分野で既知の任意の他の臓器）由来である。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、膵臓細胞、肝細胞、心臓細胞、腎細胞、神経系細胞などである。

【０１３０】

本開示の方法のうちのいずれかのいくつかの実施形態では、移植片は、幹細胞を含む。いくつかの実施形態では、幹細胞は、胚性幹細胞、組織特異的幹細胞、人工多能性幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、骨格筋幹細胞、筋原性幹細胞、心臓幹細胞、神経幹細胞、表皮幹細胞、又は腸幹細胞である。いくつかの実施形態では、幹細胞は、造血幹細胞、胚性幹細胞、成体幹細胞、多分化能幹細胞、多能性幹細胞、神経幹細胞、心臓幹細胞、臍帯血由来細胞、又は人工多能性幹細胞である。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、胆嚢細胞、心筋細胞、糸球体細胞（例えば、壁細胞、有足細胞）、腎近位尿細管刷子縁細胞、ヘンレ係蹄薄節細胞、太い上行脚細胞、腎遠位尿細管細胞、腎集合管細胞、間質腎細胞、腸細胞、杯細胞、腸細胞、カベオラ房細胞（caveolated tuft cells）、腸内分泌細胞、ガングリオンニューロン、実質細胞、非実質細胞、肝細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、肝星細胞、筋細胞、膵臓ベータ細胞、内皮細胞、若しくは外分泌細胞、又はそれらの任意の組み合わせである。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞は、遺伝子操作され、かつ／又は製造プロセスに供され、かつ／又はレシピエントへの投与前に培養される。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の移植片は、複数の細胞型を含む。いくつかの実施形態では、移植片は、互いに遺伝的に区別可能である１つ以上の細胞を含む。いくつかの実施形態では、１つ以上の細胞の移植片は、２回以上の独立した投与を含む。例えば、１つの細胞型が第１の投与において投与され得、第２の細胞型が第２の投与において投与され得る。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、本開示による移植片は、組織の移植片である。例示的な組織としては、結合組織、上皮組織、筋肉組織、神経組織、リンパ組織、血液若しくは血液構

成要素、脂肪組織、軟骨、高密度線維組織、骨格筋、心筋、又は平滑筋が挙げられるが、これらに限定されない。筋肉組織は、筋線維又は筋細胞を含み得る。いくつかの実施形態では、組織は、角膜、腱、心臓弁、静脈若しくは動脈、皮膚、骨、出生組織、又はそれらの部分、断片及び／若しくは組み合わせである。いくつかの実施形態では、出生組織は、胎盤組織、羊膜組織、絨毛膜組織、羊水組織、臍帯組織、臍帯静脈、又はウォートンゼリーである。いくつかの場合では、組織は、骨又は腱（両方とも筋骨格移植組織と称される）である。

【０１３４】

ＶＩ．追加の分析

本開示の方法は、移植レシピエント及び／又は移植ドナーからのサンプルの他の分析に加えて、又はそれと併せて実施され得る。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、移植レシピエントにおける感染因子の存在又はレベルが試験される。試験され得る感染因子としては、例えば、ウイルス、Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ ａｅｒｕｇｉｎｏｓａ、Ｅｎｔｅｒｏｂａｃｔｅｒｉａｃｅａｅ、Ｎｏｃａｒｄｉａ、Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ ｐｎｅｕｍｏｎｉａ、Ｓｔａｐｈｙｌｏｃｃｏｕｓ ａｕｒｅｕｓ、及びＬｅｇｉｏｎｅｌｌａなどの細菌、Ｃａｎｄｉｄａ、Ａｓｐｅｒｇｉｌｌｕｓ、Ｃｒｙｐｔｏｃｏｃｃｕｓ、Ｐｎｅｕｍｏｃｙｓｔｉｓ ｃａｒｉｎｉｉなどの真菌、又はＴｏｘｏｐｌａｓｍａ ｇｏｎｄｉｉなどの寄生生物が挙げられる。いくつかの実施形態では、移植レシピエントにおけるウイルス感染因子の存在又はレベルが試験される。ウイルスバイオマーカーは、移植レシピエントにおけるウイルスの存在又はレベルを決定するために、移植レシピエントからのサンプルから得られた核酸において分析され得る。試験され得るウイルスとしては、例えば、サイトメガロウイルス、エプスタイン－バーウイルス、アネロウイルス科、及びＢＫウイルスが挙げられる。ウイルスの存在又はレベルについての試験の結果は、移植レシピエントの免疫状態を分類するため、及び／又は移植レシピエントにおける感染の状態を決定するために使用され得る。いくつかの実施形態では、免疫抑制療法は、臨床的に重大な感染の高いリスクを有すると分類される移植レシピエントにおいて減少し得るか、又は少なくとも増加し得ない。いくつかの実施形態では、免疫抑制療法は、臨床的に重大な感染の低いリスクを有すると分類される移植レシピエントにおいて増加し得るか、又は少なくとも減少し得ない。他の臨床因子が免疫抑制療法を調整する決定の情報を与える場合があるため、移植レシピエントは、ウイルスの存在若しくはレベルについての試験の結果及び／又は臨床的に重大な感染のリスクについての分類にかかわらず、現在施されている免疫抑制療法を増加、減少、又は維持させ得ることに留意する必要がある。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植レシピエントからのサンプルにおいて遺伝子発現分析を実施することを含む。いくつかの実施形態では、遺伝子発現分析は、レシピエントからの末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cells、ＰＢＭＣ）に対して実施される。いくつかの実施形態では、遺伝子発現分析は、レシピエントからの全血サンプル又はその一部分に対して実施される。いくつかの実施形態では、遺伝子発現分析は、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態に関する情報を提供する選択された遺伝子に対して実施される。いくつかの実施形態では、遺伝子発現分析は、ＲＮＡ配列決定、マイクロアレイ法、ナノストリング分析システム、及び定量的リアルタイムＰＣＲなどの当技術分野で既知の任意の好適な方法を使用して実施される。いくつかの実施形態では、遺伝子発現分析は、ＡｌｌｏＭａｐ試験を使用して実施される。ＡｌｌｏＭａｐ試験は、ＰＢＭＣから単離されたＲＮＡを使用して定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（quantitative real-time polymerase chain reaction、ｑＲＴ－ＰＣＲ）アッセイを実施することを含む。選択された数の遺伝子の発現を分析し、この遺伝子発現データを使用して、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態に関する情報を提供する。ＡｌｌｏＭａｐ試験は、当技術分野で既知で

ある。（例えば、ＡｌｌｏＭａｐ試験又は任意の他の好適な方法を使用して得られる）遺伝子発現分析の結果は、移植レシピエントにおける細胞、臓器、若しくは組織移植片の状態を決定するために、及び／又は免疫抑制療法を施すか若しくは移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整する必要性の情報を与えるために、組み合わせた試験から単一のスコアを定義する方法を用いて、又は用いずに、本開示の方法と併せて使用され得る。

【０１３７】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態を伝達するために使用され得る単一スコアを決定することを含む。

【０１３８】

いくつかの実施形態では、本開示の方法は、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態を伝達するために使用され得る組み合わせスコアを決定することを含む。組み合わせスコアは、概して、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態を探査するために使用される複数の（例えば、２つ以上の）アッセイの結果に基づいて計算される。例えば、組み合わせスコアは、移植レシピエントにおけるドナー由来の無細胞核酸、例えば、ＤＮＡの決定されたレベル、及び例えば、上記のような（ＡｌｌｏＭａｐ試験などの）遺伝子発現プロファイリングアッセイの結果に基づいて計算され得る。組み合わせスコアは、移植レシピエントから採取された単一のサンプルに基づいて計算され得るか、又はある時間間隔にわたって移植レシピエントから採取されたサンプルに基づき得る。組み合わせスコアは、移植レシピエントにおける細胞、臓器、又は組織移植片の状態を決定するため、及び／又は免疫抑制療法を施すか、若しくは移植レシピエントに施されている免疫抑制療法を調整するために使用され得る。

【０１３９】

更なるバイオマーカー分析、遺伝子発現アッセイ、並びに移植レシピエントにおける細胞、臓器、若しくは組織移植片の状態を決定する、すなわち、検出、予測、診断、及び／若しくは監視する、並びに／又は免疫抑制療法を施すか若しくは調整する必要性を決定するための他のアッセイもまた、本開示の方法に加えて、又はそれと併せて、組み合わせた試験から単一のスコアを定義する方法を用いて、又は用いずに使用され得、これは当業者に容易に明らかであろう。

【０１４０】

移植レシピエントにおける新たながん、転移性がん、又は再発性がんのマーカーを特定するために、追加の分析が実施され得る。プライマーは、既知の腫瘍関連変異の特定によるがんの早期検出を提供するために、遺伝子変異が起こることが知られている領域を増幅するように設計され得る。これは、少なくとも部分的に、移植レシピエントが免疫抑制に起因してある特定の悪性腫瘍を発症するリスクが高くなり得るため、有利であり得る。

【０１４１】

ＶＩＩ．本開示のキット

本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つにおける使用のためのキットも本明細書で提供される。

【０１４２】

一態様では、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するためのキットであって、ドナー及びレシピエントが異なる種に属する、キットが本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、キットは、本開示の方法による使用のための試薬を含む。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の移植レシピエントから単離された無細胞核酸を分析するための試薬を含む。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、上記のような、ｑＰＣＲ、ｄＰＣＲ、又は配列決定法（ＮＧＳ又はＨＴＳなど）を実施するための試薬を含み得る。そのような試薬は、プライマー（例えば、ｑＰＣＲ又はｄＰＣＲ法における使用のため）、プローブ又は色素（例えば、ｑＰＣＲ又はｄＰＣＲ法における使用のため）、配列決定ライブラリー調製のための試薬、核酸を増幅するための試薬（例えば、ポ

リメラーゼ、緩衝液など）、抽出が必要な場合にサンプルから核酸抽出を実施するための試薬などを含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、例えば、移植レシピエントからの無細胞核酸中のドナー特異的又はレシピエント特異的標的配列にハイブリダイゼーションする１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットを含む。いくつかの実施形態では、キットの１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットは、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又は分析される全無細胞核酸に関して、ドナー由来の無細胞核酸のｑＰＣＲ又はデジタルＰＣＲ定量における使用のためのものである。いくつかの実施形態では、キットの１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットは、サンプル中のドナー由来の無細胞核酸の絶対コピーとして、又はサンプル中のドナー由来の無細胞核酸の全ドナー由来及びレシピエント由来の無細胞核酸に対する比として、ドナー由来の無細胞核酸のｑＰＣＲ又はデジタルＰＣＲ定量における使用のためのものである。いくつかの実施形態では、キットの１つ以上のＰＣＲ反応オリゴヌクレオチドプライマー及びプローブセットは、分析されるサンプルの量に関して、又は分析される全無細胞核酸に関して、ドナー由来の無細胞核酸のデジタルＰＣＲ定量における使用のためのものである。いくつかの実施形態では、キットは、単一のサンプルを分析するのに十分な試薬を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、いくつかのサンプルを分析するのに十分な試薬を含み得る。

【０１４３】

いくつかの実施形態では、キットは、キットに提供される試薬及び説明書と併せて使用され得る目標値及び対照材料を指定するための説明書を含み得る。いくつかの実施形態では、キットは、本開示の方法による使用のための対照を更に含む。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、既知量の核酸（例えば、無細胞核酸）を含む対照サンプルを更に含む。

【０１４４】

いくつかの実施形態では、キットは、本開示の方法による使用のための説明書を更に含む。本明細書に記載の方法のうちのいずれか１つを実施するための説明書が含まれ得る。例えば、いくつかの実施形態では、キットは、キットの使用のため、及びドナー由来の無細胞核酸の量を決定するデータ分析のための説明書を含む。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、キットは、入力材料品質又は入力調製方法のための説明書及び仕様書を更に含む。

【０１４６】

いくつかの実施形態では、キットは、例えば、移植レシピエントからのサンプルから得られた無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定するための配列データ（例えば、配列リード）又はＰＣＲデータ（例えば、ｑＰＣＲ又はｄＰＣＲからのデータ）の分析のためのソフトウェア説明書を含む。いくつかの実施形態では、キットは、移植レシピエントからのサンプルから得られた無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の統計分析を実施するために使用され得るソフトウェアにアクセスするための説明書、例えば、ソフトウェアをダウンロード及び／又はインストールするための説明書を含む。

【０１４７】

ＶＩＩＩ．ソフトウェア、システム、及びデバイス

ドナー及びレシピエントが異なる種に属する、移植レシピエントにおけるドナーからの臓器、組織、又は細胞移植片の移植拒絶反応状態を検出、予測、診断、及び／又は監視するための本明細書に記載の方法のある特定の態様は、コンピュータシステム又はデバイスによって行われ得る。例えば、いくつかの実施形態では、配列データ（例えば、配列リード）又はＰＣＲデータ（例えば、ｑＰＣＲ又はｄＰＣＲからのデータ）を分析して、移植レシピエントからのサンプルから得られた無細胞核酸中のドナー由来の無細胞核酸の量を決定するステップは、コンピュータシステム又はデバイスを使用して実施され得る。本明細書に記載の方法を行うためのソフトウェアも本明細書で提供される。

【０１４８】

本開示の上記の実施形態は、様々な方法で実装され得る。例えば、実施形態のいくつかの態様は、ハードウェア、ソフトウェア、又はそれらの組み合わせを使用して実装され得る。ソフトウェアで実装される場合、ソフトウェアコードは、単一のコンピュータに提供されるか、複数のコンピュータ間に分散されるかにかかわらず、任意の好適なプロセッサ又はプロセッサの集合上で実行され得る。上記の機能を実施する任意の構成要素又は構成要素の集合は、概して、上で論じられた機能を制御する１つ以上のコントローラとみなされ得ることを理解されたい。１つ以上のコントローラは、上記の機能を実施するためにマイクロコード又はソフトウェアを使用してプログラムされた専用ハードウェア又は汎用ハードウェア（例えば、１つ以上のプロセッサ）など、多数の方法で実装され得る。

【０１４９】

この点において、本開示の様々な特徴の実装は、プロセッサ上で実行されたときに上で論じられた機能及び方法を実施するコンピュータプログラム（すなわち、複数の命令）でコード化された少なくとも１つの非一時的コンピュータ可読記憶媒体（例えば、コンピュータメモリ、フロッピー（登録商標）ディスク、コンパクトディスク、テープなどを）使用し得ることに留意されたい。コンピュータ可読記憶媒体は、その上に記憶されたプログラムが任意のコンピュータリソース上にロードされて、本明細書で論じられる本開示のある特定の態様を実装することができるように、搬送可能であり得る。更に、実行されたときに上で論じられた機能を実施するコンピュータプログラムへの言及は、ホストコンピュータ上で実行されるアプリケーションプログラムに限定されないことに留意されたい。むしろ、コンピュータプログラムという用語は、本明細書では、本開示のある特定の態様を実装するようにプロセッサをプログラムするために用いられ得る任意のタイプのコンピュータコード（例えば、ソフトウェア、又はマイクロコード）を指すために一般的な意味で使用される。

【実施例】

【０１５０】

本発明は、以下の実施例を参照することによってより完全に理解されるであろう。しかしながら、それらは本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書中に記載の実施例及び実施形態は、例示のみの目的であり、それらに照らして様々な改変又は変更が当業者に示唆され、本出願の趣旨及び範囲並びに添付の特許請求の範囲内に含まれるべきであることが理解される。

【０１５１】

実施例１：異種間移植における臓器移植片の健康を非侵襲的に監視する方法。

本実施例は、移植レシピエントからの無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）を使用する異種間臓器移植片の非侵襲的監視のためのデジタルポリメラーゼ連鎖反応（ｄＰＣＲ）及び配列決定に基づく方法を記載する。

【０１５２】

異種間移植の監視のための以下に記載される方法において、遺伝的に修飾されたブタは、例示的な臓器ドナーとしての役割を果たし、ヒトは、例示的な臓器レシピエントとしての役割を果たした。ブタは、４つのブタ遺伝子を発現せず、６つのヒト遺伝子を更に発現するように遺伝子改変されていた（Ｒｅｖｉｖｉｃｏｒ、Ｕｎｉｔｅｄ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの子会社）。これらの改変は考慮され、ドナーゲノムサイズに関して無視できる変化を表すことが見出された。したがって、本明細書における全ての計算は、Ｓｕｓ ｓｃｒｏｆａについて公的に入手可能なブタゲノムに基づいた。

【０１５３】

概して、移植片供与動物のゲノムの改変は、遺伝子不活性化若しくは完全な遺伝子ノックアウト、並びに／又は移植片供与動物の元のゲノムが保有しなかった更なるヒト若しくは非ヒト遺伝子の遺伝的組込み及び発現を含み得る。全てではないがほとんどの遺伝子改変は、移植レシピエントの免疫系によって誘発される潜在的に攻撃的な免疫応答を緩和する目的に役立つ。

【０１５４】

異種間臓器移植片の非侵襲的監視のためのｄＰＣＲに基づく方法

一般的アプローチ

表１に概説されるように、単一コピーの標的検出及び複数コピーの標的検出アッセイを、シングルプレックス及びマルチプレックスｄＰＣＲアッセイの両方における使用のために設計した。精度は、Ｑｕｂｉｔによって測定された入力ＤＮＡに基づいて、予測されるコピーに対する測定されたコピーのパーセンテージとして計算した。

【０１５５】

【表１】

表１．シングルプレックス及びマルチプレックスｄＰＣＲアッセイのための標的検出設計の概要。

dPCRタイプ	レシピエント標的タイプ、数（n）	ドナー標的タイプ、数（n）	方法番号
シングルプレックス	単一コピー、n＝1	単一コピー、n＝1	1A
	単一コピー、n＝1	複数コピー、n＝1	1B
	複数コピー、n＝1	単一コピー、n＝1	
	複数コピー、n＝1	複数コピー、n＝1	
マルチプレックス	単一コピー、n＝1又はn＞1	単一コピー、n＝1又はn＞1	2A
	単一コピー、n＝1又はn＞1	複数コピー、n＝1又はn＞1	2B
	複数コピー、n＝1又はn＞1	単一コピー、n＝1又はn＞1	
	複数コピー、n＝1又はn＞1	複数コピー、n＝1又はn＞1	

【０１５６】

プライマー及びプローブの設計

ＰＣＲプライマー及びプローブを、ヒト特異的ゲノムＤＮＡ配列及びブタ特異的ゲノムＤＮＡ配列を定量的に検出するように設計した。例示的なＰＣＲプライマー及びフルオロフォア標識プローブを以下の表２に示す。遺伝子イントロン領域におけるゲノムＤＮＡ配列は、ブタゲノムとヒトゲノムとの間で多様性を示す可能性がより高いため、ＰＣＲプライマー設計のための標的化された領域の少なくとも一部分として好ましく選択された。プライマー及びプローブ設計は、例えば、６０～１１０塩基対のアンプリコンサイズ、６０℃のプライマー融解温度（Ｔｍ）、及び６５～７０℃のプローブＴｍの標的化されたアッセイパラメータを用いて、プライマー３プログラム（プライマー３．ｏｒｇを参照されたい）を使用して選択した。

【０１５７】

表２．ヒト特異的ゲノムＤＮＡ配列及びブタ特異的ゲノムＤＮＡ配列を検出及び定量するための例示的なＰＣＲプライマー及びフルオロフォア標識プローブ。本発明の一実施形態では、本明細書中に示されるように、２コピーのブタ標的アッセイは、半数体ゲノム当たり２コピーのＰＣＲ標的を検出した。本発明の別の実施形態では、本明細書中に示されるように、８コピーのブタ標的アッセイは、半数体ゲノム当たり８コピーの同じＰＣＲ標的を検出した。

【０１５８】

【表２】

アッセイ	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
ヒトアッセイA（1コピーの標的）	AACTACATGGTGAGTGCTACATG（配列番号1）	CTGCCCATCAGCCAGGTG（配列番号2）	FAM－TGAGCCCCAAAGCTGGTGTGG－BHQ（下線の配列は配列番号5に対応する）
ブタアッセイA（2コピーの標的）	ACTGTTGGAAGTGCATGTGC（配列番号3）	TTCTGAGAGACCTCTGCTTGG（配列番号4）	FAM－CTGCTGCTCCTTGCTCTCACTGCAGG－BHQ（下線の配列は配列番号6に対応する）
ヒトアッセイB（1コピー）	CCCCACCGGAGGAGTTTTG（配列番号7）	GCGAAAGCCGAAGTCTAGGG（配列番号8）	56－FAM－CGGTCTGTA／ZEN／GAGAGCTATGCAGGGTGAGGGC－3IABkFQ（下線の配列は配列番号9に対応する）
ブタアッセイB（1コピー）	CCAGCTTCATTTTGCCCTCG（配列番号10）	CCCCTTTTCAGGGAATGCTC（配列番号11）	5Cy5－CCAGCACCC／TAO／CGATGCGGACGAGTCG－3IAbRQSp（下線の配列は配列番号12に対応する）
ブタアッセイC（1コピー）	TAGGTCATTGCTTTCCGGCT（配列番号13）	TTCACAGGGACGGAAAACCG（配列番号14）	5Cy5－CTGGCTGGC／TAO／GCGCGGCGAGAACTT－3IAbRQSp（下線の配列は配列番号15に対応する）
ヒトアッセイC（1コピー）	GGAGAAAAGCCTACCGCACA（配列番号16）	TGACGTCACCCGTTCTGTTG（配列番号17）	5SUN－ACCGGCAGG／ZEN／TGGCCCCACCCTGCAT－3IABkFQ（下線の配列は配列番号18に対応する）
ブタアッセイD（8コピーの標的）	TGTTGCGGCAAGATGCGT（配列番号19）	TTCATTCCCACTGACCAGATG（配列番号20）	56－FAM－TCCCAGAGCTTGCCCAGAGC－3IABkFQ（下線の配列は配列番号21に対応する）
レポーター色素：FAM、Cy5、SUN、FAMN。 消光剤：ZEN、TAO、IABkFQ、3IAbRQSp、BHQ			

【０１５９】

異種間反応の非存在を確実にするために、ＰＣＲプライマーを、インシリコＰＣＲプログラムを使用して、一方のゲノム、例えば、ブタに対して、固有のアンプリコン産物について、及び他方のゲノム、例えば、ヒトに対して、アンプリコン産物の非存在についてチェックした。標的ゲノム、例えば、ブタゲノムを、例えば、８０ｂｐのセグメントなどの塩基対（ｂａｓｅ　ｐａｉｒ、ｂｐ）セグメントにコンピュータで分割し、セグメントを標的ゲノムにマッピングし戻して、多重マッピングセグメントを特定した。多重マッピングセグメントを非標的ゲノムに対してアラインメントさせ、任意のアラインメントを廃棄した。いくつかの場合には、残りの多重マッピングセグメントをフィルタリングして、断片、例えば、高い若しくは低いＧＣ含量を有する断片又は反復マスク領域にアラインメントした断片を除去するか、あるいは例えば、非エキソン領域などの望ましくない領域を除去した。「ＬＯＣ」遺伝子（すなわち、公式記号及び／又はオルソログを有さない機能不明の遺伝子）を廃棄し、重複セグメントをマージした。残りのセグメントをプライマー３設計ソフトウェアに提出し、各セグメントについての０番目のプライマーセット出力をインシリコＰＣＲによって検証して、標的ゲノムにおける複数のヒット及び非標的ゲノムにおけるヒットの非存在を確認した。プライマー３によって作製された設計のうち、セグメント間の最小分離が１キロベースであるもののみを実験評価のために選択した。

【０１６０】

プローブを、シングルプレックスｄＰＣＲアッセイのための同じ蛍光色素、又はマルチプレックスｄＰＣＲアッセイのための異なる蛍光色素のいずれかで標識した（以下に記載するように）。

【０１６１】

複数コピー標的検出アッセイのために、ブタ特異的重複遺伝子群を特定し、ＰＣＲプライマー／プローブを、ブタゲノム中の複数コピーの標的配列を検出するが、ヒトゲノム中

では何も検出しないように設計した。ブタ特異的ＰＣＲアッセイプライマー及びプローブ設計のために、重複遺伝子群（例えば、ｒＲＮＡ、Ｈｏｘ、ヒストン、及びチューブリン遺伝子ファミリー）のゲノム配列を、ブタゲノムとヒトゲノムとの間の高い多様性を有する領域について検索した。単一コピー標的検出アッセイと比較して、複数コピーの標的検出アッセイは、増加した数のブタゲノム陽性区画を有し、これは、ブタｃｆＤＮＡがサンプル中に非常に低いコピーで存在する場合に重要である。例えば、ブタ２コピー標的検出アッセイは、半数体ゲノム当たり２つのブタ標的コピーを検出し、その結果、単一コピー標的検出アッセイと比較して２倍多いブタ特異的区画数を生成する。

【０１６２】

方法１Ａ：単一コピーのヒト特異的標的及び単一コピーのブタ特異的標的を検出するシングルプレックスｄＰＣＲアッセイ。

様々な量、例えば、サンプル当たり最大１２０ｎｇのｃｆＤＮＡ入力を、単一コピーのヒト特異的標的を検出するヒト特異的ｄＰＣＲアッセイ、及び単一コピーのブタ特異的標的を検出するブタ特異的ｄＰＣＲアッセイを用いて別個にアッセイする。アッセイを、Ｃｒｙｓｔａｌ Ｄｒｏｐｌｅｔ ｄＰＣＲ Ｓａｐｐｈｉｒｅ Ｃｈｉｐｓでの２５μｌ反応において、１×マルチプレックスＰＣＲマスターミックス、０．５μＭフォワード及びリバースプライマー、並びに０．３μＭのＦＡＭ標識プローブを使用して、Ｓｔｉｌｌａ Ｎａｉｃａシステムで実施する。ｄＰＣＲの結果を、Ｃｒｙｓｔａｌ Ｄｒｏｐｌｅｔ ｄＰＣＲ Ｒｅａｄｅｒで取得し、Ｃｒｙｓｔａｌ Ｄｒｏｐｌｅｔ ｄＰＣＲ Ｍｉｎｅｒソフトウェアで分析する。ブタ及びヒトゲノムコピー濃度を入力ｃｆＤＮＡ量（ｎｇ）に対して正規化し、ブタゲノムコピーパーセントを、サンプル中のブタ及びヒトゲノムの全コピーに対して計算する。

【０１６３】

方法１Ｂ：単一コピーのヒト特異的標的及び複数コピーのブタ特異的標的を検出するシングルプレックスｄＰＣＲアッセイ。

方法１Ａについての上記のように、単一コピーのヒト特異的標的及び複数コピーのブタ特異的標的を検出する別個のシングルプレックスｄＰＣＲアッセイを実施した。ブタゲノムコピー濃度を決定するために、測定されたブタコピー数を、半数体ゲノム当たりのブタ特異的標的のコピー数で除算した（例えば、ブタアッセイにおいて２コピー標的を使用した場合、測定されたブタコピー数を２で除算した）。１μｌ当たりのブタ及びヒトゲノムコピーを一緒に加え、ブタゲノムコピーパーセントを、サンプル中のブタ及びヒトゲノムの全コピーに対して計算した。複数コピーブタ特異的標的検出アッセイは、定量精度及び感度を改善する。

【０１６４】

方法２Ａ：全ての異なる標的を識別するために、又は２つの種を区別するために、固有の蛍光色素を使用して、１つ以上の単一コピーのヒト特異的標的及び１つ以上の単一コピー及び／又は複数コピーのブタ特異的標的を検出するマルチプレックスｄＰＣＲアッセイ。

個々のヒト標的特異的アッセイ及びブタ標的特異的アッセイ（例えば、方法１Ａ及び１Ｂについての上記のような）を、異なる構成要素アッセイプローブについて異なる蛍光色素標識（例えば、ＦＡＭ、ＨＥＸ、ＡＴＴＯ５５０、ＲＯＸ、Ｃｙ５、Ｃｙ５．５、ＳＵＮ）を用いて単一のマルチプレックスアッセイに選択的に組み合わせた。各構成要素からのゲノムコピー濃度を、複数コピー標的アッセイ（もしあれば）についてゲノムコピー濃度に対して補正し、ヒト及びブタゲノムコピー濃度に対して平均し、ブタゲノムコピーパーセントを、サンプル中のブタ及びヒトゲノムの全コピーに対して計算した。したがって、方法２Ａでは、より多くの標的を使用して、ドナーについての陽性区画の数を増加させ、アッセイ精度及び感度を改善した。

【０１６５】

方法２Ｂ：同じ種内の標的に対する非固有蛍光色素を使用して、１つ以上の単一コピーのヒト特異的標的及び少なくとも１つの複数コピーのブタ特異的標的を検出するマルチプ

レックスｄＰＣＲアッセイ。
マルチプレックスｄＰＣＲアッセイは、異なる蛍光色素で標識されるか、又は同じ蛍光色素で標識されるかのいずれかで、少なくとも１つの複数コピーの標的アッセイを単一ｄＰＣＲアッセイ反応において使用したことを除いて、方法２Ａについての上記のように設計した。したがって、方法２Ｂでは、異なるゲノム標的が互いに離れており、ｄＰＣＲアッセイにおいて異なる液滴中で独立して増幅され得ると仮定して、複数の蛍光チャネル又は単一の蛍光チャネルのいずれかを使用して、複数のブタ特異的標的ＰＣＲアッセイを検出し、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡの決定のための陽性区画の数を増加させ、アッセイ精度及び感度を改善した。

【０１６６】

データ分析

方法１Ａ～１Ｂ及び２Ａ～２Ｂについて、上記のように、ｄＰＣＲ反応からの出力（すなわち、反応物１μＬ当たりのブタ特異的標的配列コピー及び反応物１μＬ当たりのヒト特異的標的配列コピー）を、それらの各々をアッセイ当たりの半数体ゲノム当たりの標的配列コピーの数で割った後、μＬ濃度当たりのゲノムコピーについて計算した。相対濃度については、ブタゲノムコピーの割合又はパーセントを、全ゲノム、例えば、ヒト及びブタゲノムコピーの総数に対して計算した。

【０１６７】

ブタゲノムの数はまた、単位サンプル入力当たりの絶対値として、例えば、ｃｆＤＮＡ１ｎｇ当たり又は血漿１ミリリットル（ｍＬ）当たりのブタゲノムコピー数として決定及び報告し得る。

【０１６８】

絶対濃度については、ｄＰＣＲ機器からのブタ標的配列コピー／μｌを、ゲノム中の標的当たりの標的配列コピーの数によって最初に調整（除算）した。次いで、ｄＰＣＲ反応で使用された体積を使用して、抽出から溶出されたＤＮＡの体積及びＤＮＡ抽出で使用された血漿の体積に加えて、血漿１ｍｌ当たりのブタゲノム相当ｃｆＤＮＡコピーを計算した。絶対濃度を決定するための代替的な方法は、ｄＰＣＲ機器から１μｌ当たりのブタ（標的）コピー（ｃｐ／μｌ）を得ること、ブタｃｐ／μｌを半数体ゲノム当たりの標的コピーの数及びアッセイの数（２つ以上のアッセイが蛍光チャネルにおいて組み合わされる場合）で割ることによってブタゲノムｃｐ／μｌを計算すること、ｄＰＣＲ反応へのブタゲノムコピーを決定すること、ブタゲノムｃｐ／ｍｌ血漿を決定することを含むが、これらに限定されない。ブタ由来配列の絶対数を決定する１つの方法についての特定のステップは、以下のとおりであった：

１．ｄＰＣＲ装置からブタ標的コピー／μｌを得、半数体ゲノム当たりのブタ標的コピーの数で除算し（２つ以上のブタ標的アッセイが蛍光チャネルにおいて組み合わされる場合、蛍光チャネルにおけるブタ標的アッセイの数でも除算する）、反応におけるブタ標的コピー／μｌを得ること、

２．反応におけるブタ標的コピー／μｌに反応の体積を掛けることによって、反応における全ブタゲノムコピーを計算すること、

３．反応における全ブタゲノムコピーを、反応において使用されたＤＮＡサンプルの体積で割り、ＤＮＡサンプルの体積当たりの全ブタゲノムコピーを得ること、

４．サンプルのＤＮＡ体積当たりの全ブタゲノムコピーに、ＤＮＡ抽出から得られたＤＮＡサンプルの全体積を掛けて、ＤＮＡ抽出から得られた全ブタゲノムコピーを得ること、及び

５．ＤＮＡ抽出から得られた全ブタゲノムコピーをＤＮＡ抽出で使用された血漿の体積で割ることによって、レシピエントからの血漿の体積当たりの全ブタゲノムコピーを計算すること。

【０１６９】

異種間臓器移植片の非侵襲的監視のための配列決定に基づく方法

ライブラリーの調製及び配列決定

２５～１００ｎｇのｃｆＤＮＡを使用して、製造業者の指示に従ってＩｌｌｕｍｉｎａのＤＮＡ　Ｐｒｅｐ　Ｋｉｔ（登録商標）を使用してショットガンライブラリーを調製した。

【０１７０】

平均ライブラリー断片サイズをＴａｐｅｓｔａｔｉｏｎ（登録商標）ｃｆＤＮＡキットによって決定し、ライブラリーをＱｕｂｉｔによって定量した。ライブラリーを、ＭｉＳｅｑ（２×６５又は２×５５サイクル、１２ｐＭ）又はＮｅｘｔＳｅｑ（２×６５又は２×３５サイクル、１．３～１．８ｐＭ）で、ペアエンドリードを用いて配列決定した。純粋なヒトゲノムＤＮＡ及び純粋なブタゲノムＤＮＡも、ブタゲノム当量（genome equivalent、ＧＥ）の０．２％～０．４％の間で考案されたサンプルとともに配列決定した。

【０１７１】

バイオインフォマティクス

次世代配列決定（ＮＧＳ）ショットガンパイプラインを使用して、配列決定データを分析し、遺伝子操作されたブタによって提供された心臓移植片のヒトレシピエント及びブタ心臓移植片のヒト死亡モデルレシピエントから得られたサンプル中のブタドナー由来の無細胞ＤＮＡの量を定量した。

【０１７２】

ヒトゲノムと移植片供与動物のゲノム、例えば、遺伝子改変ブタのゲノム）との間のゲノムサイズの差は、以下により詳細に記載されるように、全リードについてのゲノムサイズに基づく正規化、又はゲノムの規定されたビンサイズにわたる平均カバレッジの利用のいずれかによって考慮された。

【０１７３】

ヒトゲノムの２４本の染色体（ＵＣＳＣ　ｈｇ１９；ｇｅｎｏｍｅ．ｕｃｓｃ．ｅｄｕ／）、及びブタゲノムの２０本の染色体（ｂｕｉｌｄ　Ｓｕｓ　ｓｃｒｏｆａ　１１．１）からなる組み合わせた参照ＦＡＳＴＡファイルを作製した。ＦＡＳＴＱファイルからの生の配列リードを、ＢＷＡアライナを使用して、組み合わせた参照に対してアラインメントさせた。リードアラインメントを、９０％の最小アラインメントスコアカットオフ、５％のギャップパーセント設定、スプリットアラインメントなしで行った。

【０１７４】

様々なマッピングフィルタモデルを適用して、アラインメントされたリードをフィルタリングし、推定バイアス及びストリンジェンシを決定した（表３を参照されたい）。表３に列挙される各モデルについて、１メガ塩基（Ｍｂ）領域にわたる平均カバレッジを、ヒト及びブタゲノムの両方について計算した。ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセントを$m_p/(m_p+m_h)*100$として計算し、式中、m_pは、ブタゲノム上の１Ｍｂ領域にわたる平均カバレッジの中央値であり、m_hは、ヒトゲノム上の１Ｍｂ領域にわたる平均カバレッジの中央値である。この方法論は、ブタゲノムがヒトゲノムよりも小さいという事実を考慮する。

【０１７５】

代替的には、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセントは、配列リードを、上記のブタゲノム及びヒトゲノムを包含する組み合わせた参照に対してアラインメントさせ、組み合わせた参照の割合として、ブタゲノムに対してアラインメントする配列リードのパーセントを決定することによって計算された。この方法論は、ヒトゲノムとブタゲノムとの間のサイズの差を考慮しない。

【０１７６】

表３におけるモデルの精度を決定するために、２，５００万の全配列決定リードを用いて、ヒト及びブタゲノムの様々な割合でインシリコサンプルを調製した。

【０１７７】

【表３】

表３．アラインメントされたリードをフィルタリングするためのモデル。

モデル	リードフィルタ
M1	全てのアラインメントされたリード。
M2	複数のマッチを有するリードを除外した後のM1。
M3	メイト欠落、転座リード、及び不適切な配向を有するリードを除外した後のM2。
M4	アラインメントスコア＜95%を有するリードを除外した後のM2。
M5	アラインメントスコア＜98%を有するリードを除外した後のM2。
M6	部分的にアラインメントされたリード（すなわち、ソフトクリップリード）を除外した後のM2。
M7	部分的にアラインメントされたリード（すなわち、ハード及びソフトクリップされたリード、10未満のMAPQを有するアラインメント）を除外した後のM2。

【０１７８】

ブタ由来のｃｆＤＮＡ対ヒト由来のｃｆＤＮＡの平均断片サイズにおいて差が観察された。例えば、表４に示すように、ブタ由来及びヒト由来のｃｆＤＮＡ断片を含有する２つのサンプルの分析は、ヒト由来のｃｆＤＮＡ断片がより長い平均断片サイズを有することを示した。ブタとヒトとの間の平均ｃｆＤＮＡ断片サイズ差（例えば、表４に示されるような）は、例えば、より小さいｃｆＤＮＡ断片がより大きいカバレッジをもたらす場合、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡ画分の過大評価をもたらし得る。したがって、補正因子を適用して、ブタｃｆＤＮＡ対ヒトｃｆＤＮＡの平均断片サイズの差を考慮して、精度を改善し得る。

【０１７９】

【表４】

表４．ブタ及びヒトｃｆＤＮＡ断片サイズ分析。

サンプル	ヒトcfDNA平均断片サイズ（bp）	ブタcfDNA平均断片サイズ（bp）
A	106．3	93．7
B	103．1	98．1

【０１８０】

実施例２：ブタ心臓移植片のヒトレシピエントにおける臓器移植片の健康の非侵襲的監視。

本実施例は、本明細書の実施例１に記載されるｄＰＣＲに基づく方法及び配列決定に基づく方法を使用した、ブタ心臓移植片のヒトレシピエントにおける臓器移植片の健康の非侵襲的監視を記載する。

【０１８１】

サンプル

ヒトレシピエントがＵｎｉｔｅｄ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓの子会社であるＲｅｖｉｖｉｃｏｒによって遺伝的に改変されたブタからの治験用心臓（ＵＨｅａｒｔ）移植片を受けた後、６、１３、１９、２５、３３、４６、４９、５５、及び６０日目に、ヒトレシピエントからの採血を２本の１０ｍＬ　Ｓｔｒｅｃｋチューブに採取した。ＱｉａｇｅｎＱＩＡａｍｐ　Ｃｉｒｃｕｌａｔｉｎｇ　Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｋｉｔを使用して無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）を抽出し、Ｑｕｂｉｔを使用して定量した。

【０１８２】

表５に示すように、ｃｆＤＮＡの収量は、移植後２５日目の２２３ｎｇから移植後４６日目の３３６０ｎｇまで、臓器移植後経時的に変化した。

【０１８３】

【表５】

表５．患者ｃｆＤＮＡの収量。

移植後の日数	Qubit濃度（ng／μL）	総収量（ng）
6	17.3	865
13	8.23	412
19	5.1	255
25	4.46	223
33	20	1000
46	67.2	3360
49	31.5	1575
55	7.73	386.5
60	19.95	997.5

【０１８４】

ｄＰＣＲに基づく分析

既知のパーセンテージの対照ブタ及びヒトゲノムＤＮＡを含有する対照サンプルを作製して、単一コピーのブタ特異的標的又は２コピーのブタ特異的標的を使用したｄＰＣＲアッセイの性能を比較した。表６に示されるように、２コピーのブタ特異的標的を使用するｄＰＣＲアッセイは、単一コピーのブタ特異的標的を使用するｄＰＣＲアッセイと比較して、２倍多くの陽性ｄＰＣＲ区画をもたらした。

【０１８５】

【表６】

表６．単一コピーのブタ特異的標的と比較した２コピーのブタ特異的標的を使用したｄＰＣＲアッセイの結果（ヒト及びブタＤＮＡを有する対照サンプルを使用）。

サンプル（ブタDNAの既知パーセント）	ブタ標的に対する陽性dPCR区画の数		
	1コピーのブタ標的アッセイ	2－コピーのブタ標的アッセイ	加重平均
A（1%ブタ）	8.67	15.8	8.3
B（0.2%ブタ）	1.42	3.65	1.6
C（0.2%ブタ）	2.45	4.01	2.2
D（0.1%ブタ）	0.62	1.71	0.7
E（0%ブタ）	0	0	0.0

【０１８６】

図１Ａ及び図１Ｂに示されるように、２コピーのブタ特異的標的を使用するシングルプレックスｄＰＣＲアッセイ（図１Ａを参照されたい）並びに２つの１コピーのブタ特異的標的を使用するマルチプレックスｄＰＣＲアッセイ（図１Ｂを参照されたい）は、対照ブタＤＮＡの既知又は予測パーセンテージとブタＤＮＡの計算又は測定パーセンテージとの間に線形関係をもたらした。ブタ心臓移植片のヒトレシピエントからの無細胞ＤＮＡ（ｃｆＤＮＡ）サンプルを、移植後の５つの時点で（すなわち、移植後６、１３、１９、２５、３３、４６、４９、５５、及び６０日目に）ｄＰＣＲを使用して分析した。図２に示されるように、ゲノムコピー／ｍＬ血漿サンプル及びブタドナー由来の無細胞ＤＮＡのパーセンテージについて、ブタドナー由来の無細胞ＤＮＡのパーセンテージは、臓器移植後６日目に最も低く、臓器移植後５５日目にピークに達するまで経時的に増加し、その後、臓器移植後６０日目にわずかに減少した。

【０１８７】
配列決定に基づく分析
ブタ心臓移植片のヒトレシピエント由来のｃｆＤＮＡサンプルもまた、本明細書の実施例１に記載されるフィルタリングモデルＭ１～Ｍ７を使用して、ショットガン次世代配列決定（ＮＧＳ）で分析した（表３を参照されたい）。純粋なヒト及びブタゲノムＤＮＡを含有する対照サンプルも、同じ方法を使用して分析した。
【０１８８】
表７に示されるように、フィルタリングモデルＭ７を用いると、純粋なヒトＤＮＡ対照サンプルは、０％のブタＤＮＡパーセントの計算値を有し、ブランク限界（Limit of Blank、ＬＯＢ）が０に非常に近いことを示唆した。
【０１８９】
本明細書の実施例１の表３に記載されるフィルタリングモデルＭ１～Ｍ７は、ブタ心臓移植片のヒトレシピエントから得られたサンプルについて、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡ推定の異なるパーセントをもたらした（表７及び図３を参照されたい）。しかしながら、全てのフィルタリングモデルは、経時的に一貫した傾向を示し、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡのパーセントは、臓器移植後６日目に最も低く、臓器移植後５５日目にピークに達するまで経時的に増加し、その後、臓器移植後６０日目にわずかに減少した（表７及び図３を参照されたい）。
【０１９０】
【表７】
表７．対照サンプル（純粋なヒト又はブタゲノムＤＮＡサンプル）、及び移植後の示された日のブタ心臓移植片のヒトレシピエントからの患者ｃｆＤＮＡサンプルからのショットガンＮＧＳ結果。

サンプル	サイクル	リードの総数	推定ブタDNAパーセント						
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
患者サンプル6日目*	2×65	36, 826, 446	0. 390	0. 320	0. 280	0. 250	0. 200	0. 190	0. 148
患者サンプル6日目+	2×65	300, 503, 918	0. 440	0. 340	0. 200	0. 250	0. 190	0. 190	0. 163
患者サンプル13日目+	2×65	109, 730, 504	0. 410	0. 330	0. 270	0. 280	0. 240	0. 230	0. 228
患者サンプル19日目+	2×65	106, 188, 398	0. 500	0. 410	0. 360	0. 370	0. 330	0. 320	0. 320
患者サンプル25日目*	2×65	52, 460, 056	0. 860	0. 780	0. 720	0. 690	0. 620	0. 600	0. 585
患者サンプル25日目+	2×35	635, 272, 800	0. 860	0. 760	0. 610	0. 650	0. 590	0. 630	0. 594
患者サンプル33日目*	2×65	40, 478, 500	0. 580	0. 520	0. 480	0. 450	0. 400	0. 380	0. 372
患者サンプル46日目*	2×65	58, 470, 038	0. 474	0. 408	0. 371	0. 343	0. 288	0. 266	0. 254
患者サンプル49日目*	2×65	67, 310, 140	0. 682	0. 612	0. 558	0. 532	0. 468	0. 452	0. 443
患者サンプル55日目*	2×65	64, 350, 664	1. 565	1. 496	1. 448	1. 408	1. 312	1. 311	1. 305
患者サンプル60日目*	2×65	65, 701, 052	1. 093	1. 023	0. 970	0. 936	0. 850	0. 841	0. 833
切断されたヒトgDNA*	2×55	49, 445, 340	0. 270	0. 190	0. 100	0. 090	0. 040	0. 010	0. 000
切断されたヒトgDNA*	2×50	18, 730, 820	0. 285	0. 179	0. 113	0. 095	0. 042	0. 010	0. 000
切断されたブタgDNA*	2×55	51, 072, 814	99. 680	99. 750	99. 910	99. 900	99. 960	99. 990	300. 000
ヒトcfDNA*	2×50	15, 329, 378	0. 270	0. 180	0. 100	0. 090	0. 040	0. 010	0. 000
ヒト(非切断)gDNA*	2×50	5, 114, 174	0. 119	0. 088	0. 000	0. 028	0. 000	0. 000	0. 000
0. 2%のブタ(切断された)対照*	2×65	47, 651, 306	0. 506	0. 43. 2	0. 337	0. 300	0. 223	0. 199	0. 178
0. 4%のブタ(切断された)対照*	2×65	63, 487, 952	0. 700	0. 611	0. 525	0. 487	0. 398	0. 388	0. 370

*MiSeqで配列決定した。+NextSeqで配列決定した。

【０１９１】
フィルタリングモデルＭ７を使用してｄＰＣＲ又はショットガンＮＧＳのいずれかを用いたブタ心臓移植片のヒトレシピエントからのサンプル中の計算されたブタドナー由来のｃｆＤＮＡパーセントを比較した。デジタルＰＣＲアッセイの場合、表１に記載されるように、１つの２コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いたシングルプレックスアッセイ、又は２つの単一コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いたマルチプレックスアッセイのいずれかを使用した。
【０１９２】
図４、図５及び表８に示されるように、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡの決定されたパーセンテージは、ｄＰＣＲアプローチとショットガンＮＧＳとの間で概して異なっていたが

、それにもかかわらず、それらの分析は、経時的に一貫した傾向を示した。図４に示すように、ブタドナー由来のｃｆＤＮＡのパーセントは、臓器移植後６日目に最も低く、臓器移植後５５日目にピークに達した後、臓器移植後６０日目にわずかに減少した。１つの２コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いた上記のシングルプレックスｄＰＣＲアッセイによって測定されたブタドナー由来のｃｆＤＮＡのパーセンテージは、上記のショットガンＮＧＳ法によって測定されたブタドナー由来のｃｆＤＮＡのパーセンテージよりも２倍低かった。２つの単一コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いた上記のマルチプレックスｄＰＣＲアッセイによって測定されたブタドナー由来のｃｆＤＮＡのパーセンテージは、ショットガンＮＧＳ法によって測定されたものと同等であった（表８）。

【０１９３】

表８．ブタ心臓移植片のヒトレシピエントにおけるブタドナー由来の無細胞ＤＮＡのパーセント（ｘｃｆＤＮＡ％）の比較。ｘｃｆＤＮＡ％を、ショットガン次世代配列決定（「ＮＧＳ」）、１つの２コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いたシングルプレックスｄＰＣＲアッセイ（「シングルプレックスｄＰＣＲ」）、又は２つの単一コピーのブタ特異的標的及び１つの単一コピーのヒト特異的標的を用いたマルチプレックスｄＰＣＲアッセイ（「マルチプレックスｄＰＣＲ」）によって測定した。

【０１９４】

【表８】

移植後の日数	xcfDNA％（NGS）	xcfDNA％（シングルプレックスdPCR）	xcfDNA％（マルチプレックスdPCR）
33	0.372	0.26	0.52
46	0.254	0.12	0.30
49	0.443	0.24	0.48
60	0.833	0.49	1.35

【０１９５】

実施例３：ブタ心臓移植片のヒト死亡モデルレシピエントにおける臓器移植片の健康の非侵襲的短期監視。

本実施例は、実施例１に記載の配列決定に基づく方法及び／又はマルチプレックスｄＰＣＲに基づく方法を使用して、人工生命支援を短時間続けたブタ心臓移植片の２人のヒト死亡モデルレシピエントにおける臓器移植片の健康の短期非侵襲的監視を記載する。

【０１９６】

サンプル

ブタドナー由来の無細胞ＤＮＡの定量のために、２人のヒト死亡モデルレシピエント（レシピエント１及びレシピエント２）から血液サンプルを得た。レシピエント１については、移植後３０、４８、及び７２時間目に、血液を２本の１０ｍＬのＳｔｒｅｃｋチューブに採取した。レシピエント２については、移植後０、１２、２４、３６、４８、６０、及び６６時間目に、血液を２本の１０ｍＬのＳｔｒｅｃｋチューブに採取した。しかし、３６時間目及び４８時間目のサンプルは、チューブ標識の汚れのために区別できなかったので、それらを更なる分析から除外した。

【０１９７】

ｄＰＣＲに基づく分析

全ての使用可能な時点についてのサンプルを、２つの単一コピーのブタアッセイ及び１つの単一コピーのヒトアッセイ（「マルチプレックスｄＰＣＲ番号１」）、又は１つの複数コピーのブタアッセイ及び１つの単一コピーのヒトアッセイ（「マルチプレックスｄＰＣＲ番号２」）のいずれかを用いるマルチプレックスｄＰＣＲ反応を使用して、二連で試験した。入力ｃｆＤＮＡ量は、マルチプレックスｄＰＣＲ番号１試験については２０ｎｇであり、マルチプレックスｄＰＣＲ番号２試験については１０ｎｇであった。マルチプレ

ックスｄＰＣＲ番号２法を用いて試験された全てのサンプル複製物は、低い標準偏差でほぼ同一のｘｃｆＤＮＡ定量％を示した（表９）。

【０１９８】

【表９】

表９．レシピエント１及びレシピエント２からのサンプルにおけるマルチプレックスｄＰＣＲ番号１及びマルチプレックスｄＰＣＲ番号２、並びにＮＧＳ法による、血漿１ｍＬ当たりのｘｃｆＤＮＡ％、不確実性％、及びブタゲノムコピーの測定。

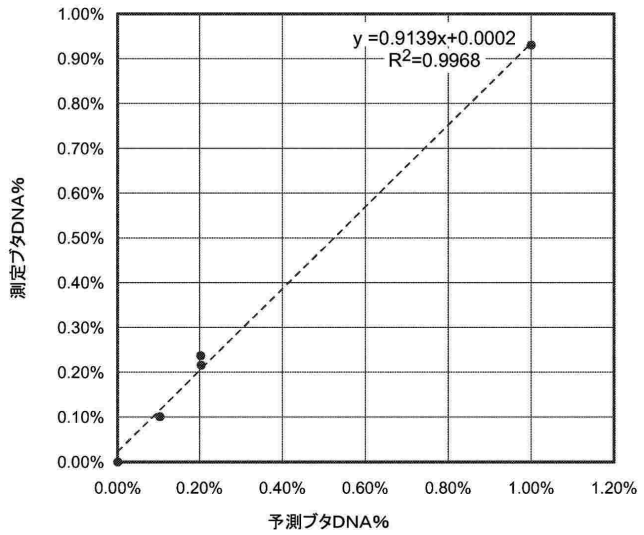
レシピエント	移植後の時間	NGS法によるxcfDNA%	マルチプレックスdPCR番号1			マルチプレックスdPCR番号2		
			xcfDNA%	不確実性%	ブタゲノムコピー／mL血漿	xcfDNA%	不確実性%	ブタゲノムコピー／mL血漿
1	30	2.31	6.56±0.18	6.6±0.1	8772.5±492.0	5.12±0.14	5.0±0.3	6318.2±116.2
	48	0.22	0.44±0.02	21.2±1.0	1361.4±84.5	0.41±0.05	21.8±1.4	1350.1±158.8
	72	0.1	0.29±0.04	33.0±4.0	548.7±124.6	0.24±0.02	32.8±2.5	1475.1±109.8
2	0	0	0±0	n／a	0±0	0±0	n／a	0±0
	12	4.42	7.74±0.47	10.3±0.2	5954.1±364.6	8.89±0.07	7.1±0.2	5527.1±22.4
	24	3.22	7.85±0.27	9.7±0.4	2978.4±142.5	9.93±0.40	6.8±0.1	2814.9±82.2
	60	1.58	4.37±0.13	11.9±0.5	2056.5±150.6	3.03±0.20	9.4±0.1	1834.7±22.5
	66	1.22	3.87±0.22	13.8±1.1	1768.6±202.3	1.70±0.07	13.2±0.6	1029±69.3

【０１９９】

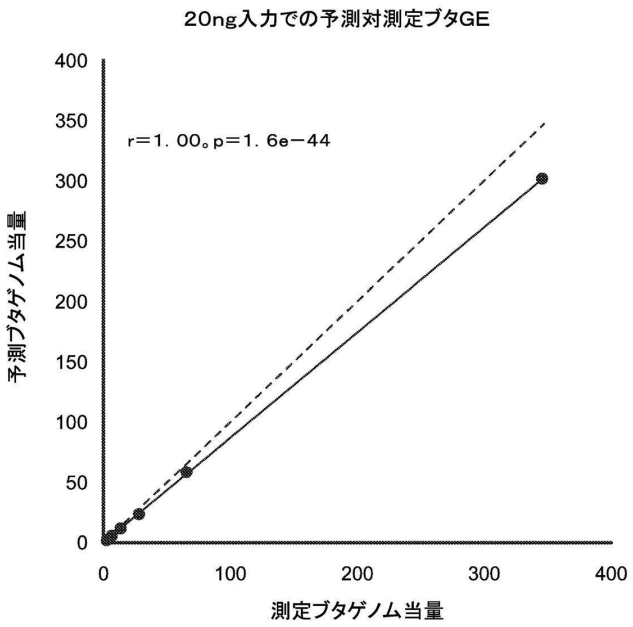
レシピエント１及び２の両方について、マルチプレックスｄＰＣＲ番号１及びマルチプレックスｄＰＣＲ番号２アッセイによるｘｃｆＤＮＡ％測定値は、ＮＧＳによるｘｃｆＤＮＡ％測定値よりも互いに近かった（図６Ａ及び図６Ｂ）。両方のｄＰＣＲ法による血漿１ｍＬ当たりのブタゲノムコピーの測定値はまた、レシピエント１サンプルにおいて互いに同等であり（図６Ｃ）、レシピエント２においてほぼ同一であった（図６Ｄ及び表９）。

【図面】

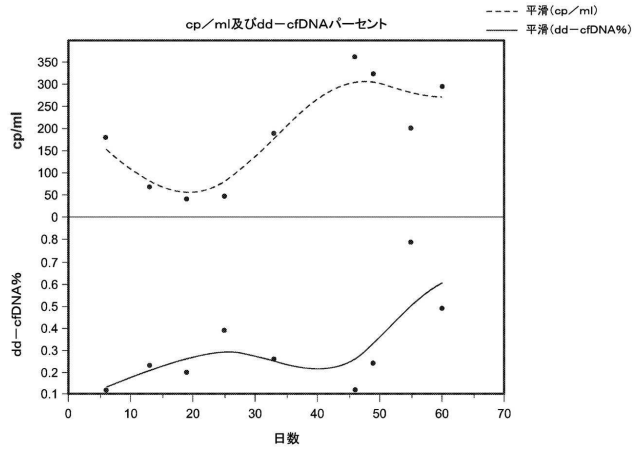
【図１Ａ】



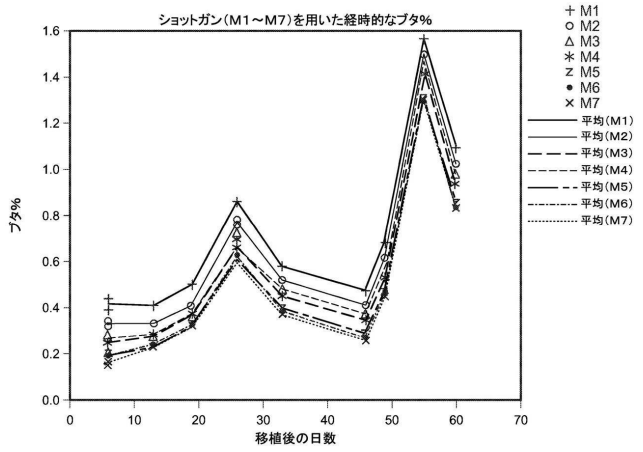
【図１Ｂ】



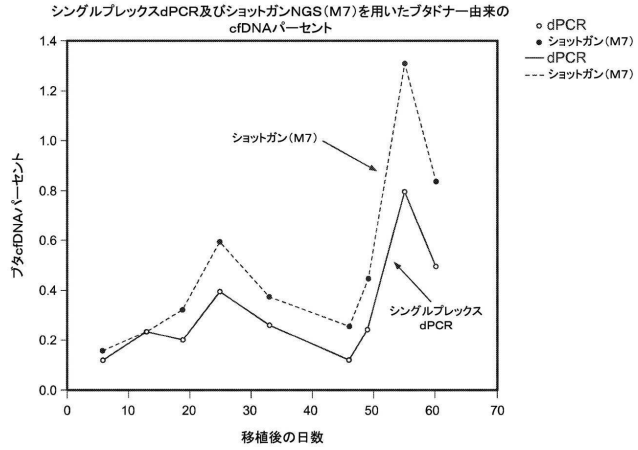
【図２】


cp／ml及びdd－cfDNAパーセント
平滑(cp／ml)
平滑(dd－cfDNA%)
cp/ml
dd－cfDNA%
日数

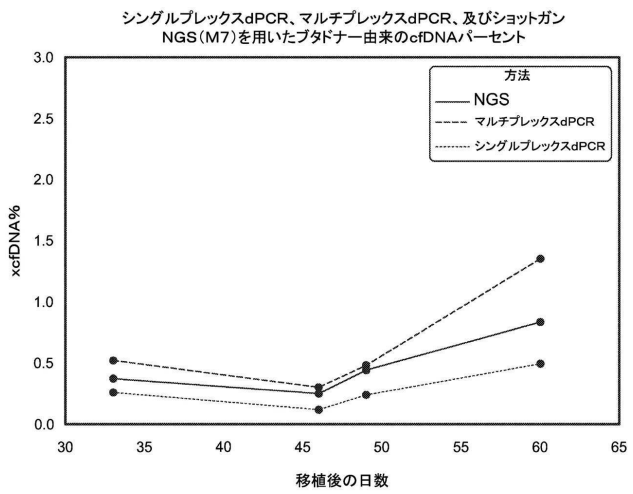
【図３】


ショットガン(M1～M7)を用いた経時的なブタ%
M1
M2
M3
M4
M5
M6
M7
平均(M1)
平均(M2)
平均(M3)
平均(M4)
平均(M5)
平均(M6)
平均(M7)
ブタ%
移植後の日数

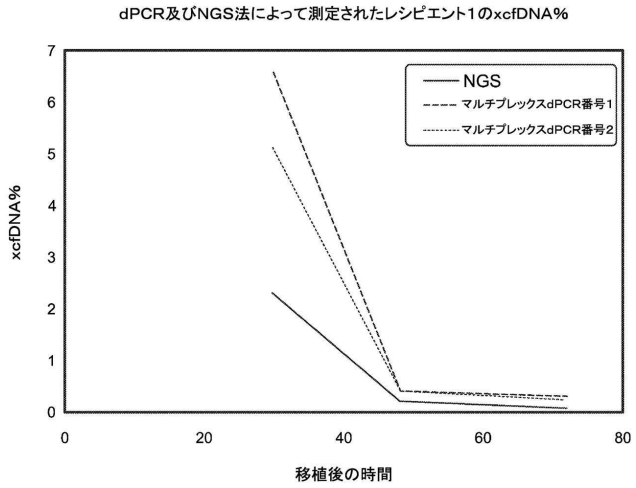
【図４】


シングルプレックスdPCR及びショットガンNGS(M7)を用いたブタドナー由来のcfDNAパーセント
dPCR
ショットガン(M7)
dPCR
ショットガン(M7)
ブタcfDNAパーセント
ショットガン(M7)
シングルプレックス dPCR
移植後の日数

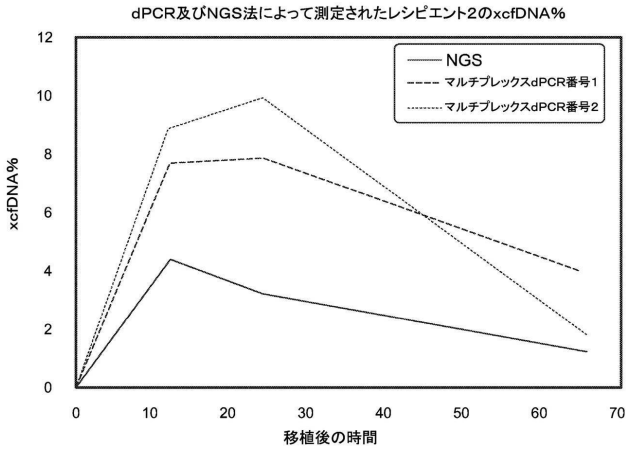
【図５】


シングルプレックスdPCR、マルチプレックスdPCR、及びショットガンNGS(M7)を用いたブタドナー由来のcfDNAパーセント
方法
NGS
マルチプレックスdPCR
シングルプレックスdPCR
xcfDNA%
移植後の日数

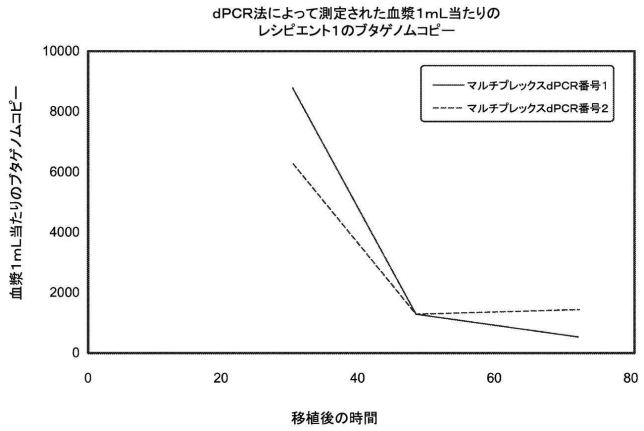
【図６Ａ】



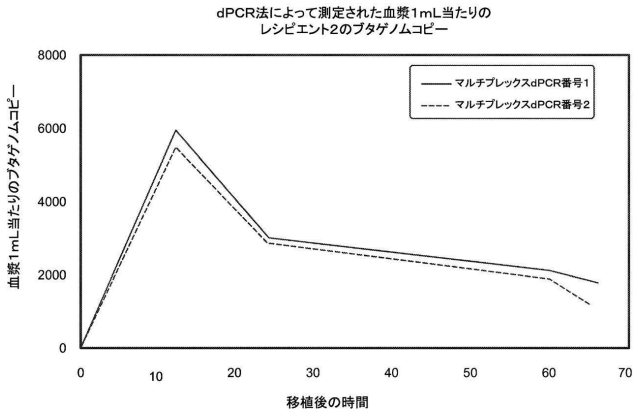
【図６Ｂ】



【図６Ｃ】



【図６Ｄ】



【配列表】

2025509966000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/064790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12Q1/6883
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2015/069933 A1 (UNIV LELAND STANFORD JUNIOR [US]) 14 May 2015 (2015-05-14) the whole document	1-82
X	WO 2018/000031 A1 (OLIVIA NEWTON-JOHN CANCER RES INSTITUTE [AU]) 4 January 2018 (2018-01-04) the whole document	23-66, 78-82

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
6 July 2023	19/07/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Bradbrook, Derek

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/064790

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AGBOR-ENOH SEAN ET AL: "Circulating cell-free DNA as a biomarker of tissue injury: Assessment in a cardiac xenotransplantation model", JOURNAL OF HEART AND LUNG TRANSPLANTATION, vol. 37, no. 8, 26 April 2018 (2018-04-26), pages 967-975, XP093058285, AMSTERDAM, NL ISSN: 1053-2498, DOI: 10.1016/j.healun.2018.04.009 the whole document	1-22, 50-54, 67-77
Y	ZHOU MING ET AL: "Circulating pig-specific DNA as a novel biomarker for monitoring xenograft rejection", XENOTRANSPLANTATION, vol. 26, no. 4, 10 July 2019 (2019-07-10), XP093058213, US ISSN: 0908-665X, DOI: 10.1111/xen.12522 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1111/xen.12522> the whole document	1-82
Y	DENG YANGYANG ET AL: "Quantification of Circulating Pig-Specific DNA in the Blood of a Xenotransplantation Model", JOURNAL OF VISUALIZED EXPERIMENTS, no. 163, 22 September 2020 (2020-09-22), XP093058201, DOI: 10.3791/61579 Retrieved from the Internet: URL:http://dx.doi.org/10.3791/61579> the whole document	1-82
Y	WO 2015/138997 A1 (CAREDX INC [US]) 17 September 2015 (2015-09-17) the whole document	1-82
A	BESZTERI BÁNK ET AL: "Average genome size: a potential source of bias in comparative metagenomics", THE ISME JOURNAL, vol. 4, no. 8, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 1075-1077, XP093060214, London ISSN: 1751-7362, DOI: 10.1038/ismej.2010.29 Retrieved from the Internet: URL:https://www.nature.com/articles/ismej201029.pdf> the whole document	1-82

-/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/064790

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MARIANA BUONGERMINO PEREIRA ET AL: "Comparison of normalization methods for the analysis of metagenomic gene abundance data", BMC GENOMICS, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 19, no. 1, 20 April 2018 (2018-04-20), pages 1-17, XP021255583, DOI: 10.1186/S12864-018-4637-6 the whole document -----	1-82

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/064790

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

   a. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/064790

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2015069933 A1	14-05-2015	NONE	
WO 2018000031 A1	04-01-2018	NONE	
WO 2015138997 A1	17-09-2015	AU 2015229083 A1	08-09-2016
		AU 2021204489 A1	29-07-2021
		CA 2970916 A1	17-09-2015
		CN 106536752 A	22-03-2017
		CN 113528645 A	22-10-2021
		DK 3117012 T3	13-05-2019
		EP 3117012 A1	18-01-2017
		ES 2726650 T3	08-10-2019
		HR P20190759 T1	14-06-2019
		HU E043288 T2	28-08-2019
		PL 3117012 T3	30-08-2019
		PT 3117012 T	30-05-2019
		SI 3117012 T1	31-07-2019
		TR 201907106 T4	21-06-2019
		US 2016145682 A1	26-05-2016
		WO 2015138997 A1	17-09-2015

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

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

弁護士　山本 健策

(72)発明者　クラーク－ランゴーン， キム
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００５， ブリズベン， ベイショア ブールバード ３２６０， ケアディーエックス， インコーポレイテッド 気付

(72)発明者　グルバチェ， ナタリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００５， ブリズベン， ベイショア ブールバード ３２６０， ケアディーエックス， インコーポレイテッド 気付

(72)発明者　フー， ロンディアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００５， ブリズベン， ベイショア ブールバード ３２６０， ケアディーエックス， インコーポレイテッド 気付

(72)発明者　シー， シェリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９４００５， ブリズベン， ベイショア ブールバード ３２６０， ケアディーエックス， インコーポレイテッド 気付

Ｆターム（参考）　4B063　QA01 QA13 QA18 QA19 QQ03 QQ08 QQ10 QQ42 QQ52 QQ53
QR62 QS25 QS39 QX01 QX10
4C084　AA17 NA05 ZB09