

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-541368  
(P2023-541368A)

(43)公表日 令和5年10月2日(2023.10.2)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	C 1 2 Q	1/68	1 0 0 Z	2 G 0 4 5
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	4 B 0 2 9
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 B 0 6 3
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	P	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全36頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-512375(P2023-512375)	(71)出願人	523057482 デルフィ ダイアグノスティックス イン コーポレイテッド アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーラン ド州 ボルチモア ウェスト トウェンテ イナインス ストリート 3 0 1
(86)(22)出願日	令和3年8月17日(2021.8.17)	(74)代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85)翻訳文提出日	令和5年3月28日(2023.3.28)	(74)代理人	100160923 弁理士 山口 裕孝
(86)国際出願番号	PCT/US2021/046272	(74)代理人	100119507 弁理士 刑部 俊
(87)国際公開番号	WO2022/040163	(74)代理人	100142929 弁理士 井上 隆一
(87)国際公開日	令和4年2月24日(2022.2.24)	(74)代理人	100148699
(31)優先権主張番号	63/067,244		
(32)優先日	令和2年8月18日(2020.8.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(31)優先権主張番号	63/163,434		
(32)優先日	令和3年3月19日(2021.3.19)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんを評価するための無細胞DNA断片サイズ密度のための方法及びシステム

(57)【要約】

本開示は、患者から得られた試料における無細胞DNA (C F DNA) 断片サイズ密度の分析を利用して、がんの状態を診断及び予測する方法及びシステムを提供する。また、試料についての低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーを備えるシステムも提供される。

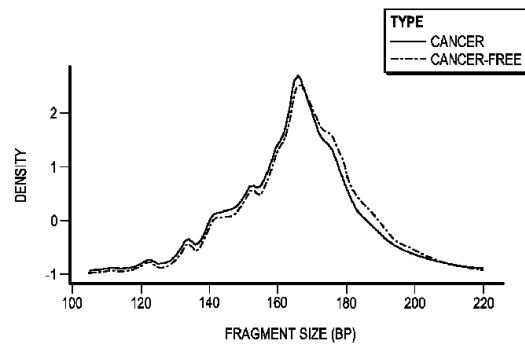
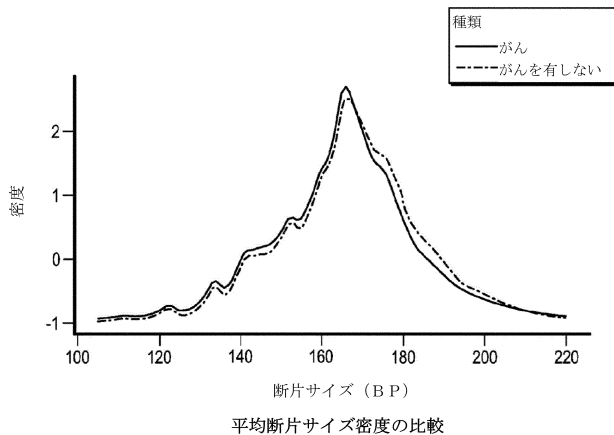


FIGURE 1: Comparison of average fragment size densities.

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

以下の工程を含む、対象のがんの状態を判定する方法：

( a ) 対象からの試料における無細胞 DNA ( c f DNA ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程であって、前記対象からの前記 c f DNA 曲線の前記形状と、健常な対象の参照試料からの曲線の形状との差が、前記対象におけるがんを示す、工程、および

( b ) 任意選択的に、がん治療を前記対象に施す工程。

## 【請求項 2】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

## 【請求項 3】

前記分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることが、前記試料の成分を定量することを含む、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記試料の成分を定量することが、複数の c f DNA 断片サイズ密度曲線を定量することを含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記試料が、1 2 個の成分を含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記分布が、切断正規分布を含む、請求項 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記方法が、統計パラメータと混合全体への寄与とによって前記成分を特性評価する工程を更に含み、前記統計パラメータが、平均、分散又は形状を含む、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記統計パラメータが 1 . 1 以下の多変量潜在的スケール縮小を有することを判定することによって収束を評価する工程を更に含む、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 1 0、5 0、1 0 0 又は 1 0 5 b p より小さい断片サイズおよび約 2 2 0、2 5 0、3 0 0、3 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 2 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 0】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、所与の長さの断片のカウント数に適合する多項式回帰の係数を使用して前記曲線の前記形状を定量することを含む、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 1 1】

前記断片のカウント数を、平均が 0 及び分散が 1 となるように標準化する工程を更に含む、請求項 1 0 に記載の方法。

## 【請求項 1 2】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、1 0 5 b p より小さい断片サイズ及び 1 7 0 b p より大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 1 0 に記載の方法。

40

## 【請求項 1 3】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、

( i ) c f DNA 断片を含む前記対象からの試料を配列決定ライブラリへと処理することと、

( i i ) 前記配列決定ライブラリを低カバレッジの全ゲノム配列決定に供して、配列決定された断片を得ることと、

( i i i ) 前記配列決定された断片をゲノムにマッピングして、マッピングされた配列のウィンドウを得ることと、

50

( i v ) 前記マッピングされた配列のウィンドウを分析して、c f D N A 断片長を決定することと

を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記マッピングされた配列が、数十～数千のウィンドウを含む、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

前記ウィンドウが、非重複ウィンドウである、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 6】

前記ウィンドウが、各々、約 5 0 0 万の塩基対を含む、請求項 1 3 に記載の方法。

10

【請求項 1 7】

各ウィンドウ内で c f D N A 断片化プロファイルが決定される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 8】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、最も頻度が高い断片サイズを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、様々な頻度の断片サイズを有する断片サイズ分布を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記マッピングされた配列のウィンドウ内の小型 c f D N A 断片と大型 c f D N A 断片との比を含む、請求項 1 7 に記載の方法。

20

【請求項 2 1】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の小型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の大型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の小型及び大型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 1 7 に記載の方法。

30

【請求項 2 4】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、全ゲノムにわたる、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、サブゲノム区間にわたる、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 6】

対象における D N A - ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを判定する方法であって、対象における無細胞 D N A ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を、請求項 1 ~ 2 5 のいずれか一項に記載の方法を使用して分析する工程を含み、前記曲線の前記形状が、前記 D N A - ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを示す、方法。

40

【請求項 2 7】

以下の工程を含む、対象のがんの状態を予測する方法：

( a ) 前記対象から得られた試料における無細胞 D N A ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程、

( b ) 前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較する工程、および

( c ) 前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出する工程であって、それにより前記対象の前記がんの状態を予測する、工程。

50

## 【請求項 28】

前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることを含む、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記混合が、切断正規分布を含む、請求項 28 に記載の方法。

## 【請求項 30】

前記切断正規分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることが、前記試料の成分を定量することを含む、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記試料の成分を定量することが、複数の cfDNA 断片サイズ密度曲線の形状のパラメータを定量することを含む、請求項 30 に記載の方法。 10

## 【請求項 32】

前記試料が、12個の成分を含む、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 33】

統計パラメータと混合全体への寄与とによって前記成分を特性評価する工程を更に含む、請求項 30 に記載の方法。

## 【請求項 34】

前記統計パラメータが 1.1 以下の多変量潜在的スケール縮小を有することを判定することによって収束を評価する工程を更に含む、請求項 33 に記載の方法。

## 【請求項 35】

前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 10、50、100 又は 105 bp より小さい断片サイズ及び約 220、250、300、350 bp より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 28 に記載の方法。 20

## 【請求項 36】

前記参照曲線形状が、健常な対象から得られた試料中で測定された cfDNA 断片サイズ密度曲線の形状である、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 37】

前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、胃がん、膵臓がん、胆管がん、及び卵巣がんからなる群より選択される、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 38】

前記比較する工程が、全ゲノムにわたって、前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 27 に記載の方法。 30

## 【請求項 39】

前記比較する工程が、サブゲノム区間にわたって、前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 27 に記載の方法。

## 【請求項 40】

対象におけるがんを治療する方法であって、

(a) 前記対象におけるがんを検出する工程であって、前記対象から得られた試料における無細胞 DNA (cfDNA) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程と、前記試料の前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較する工程と、前記試料の前記 cfDNA 断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出する工程と、を含む、工程、および 40

(b) 前記対象にがん治療を施す工程

を含み、それにより前記対象におけるがんを治療する、方法。

## 【請求項 41】

前記対象が、ヒトである、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 42】

前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、胃がん、膵臓がん、胆管がん、及び卵巣がんからなる群より選択される、請求項 40 に記載の方法。

## 【請求項 43】

前記がん治療が、手術、アジュバント化学療法、ネオアジュバント化学療法、放射線療法、ホルモン療法、細胞毒性療法、免疫療法、養子T細胞療法、標的療法、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項40に記載の方法。

【請求項44】

前記参照曲線形状が、健常な対象から得られた試料中で測定されたcfDNA断片サイズ密度曲線の形状のものである、請求項40に記載の方法。

【請求項45】

前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項46】

前記混合が、切断正規分布を含む、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

前記切断正規分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることが、前記試料の成分を定量することを含む、請求項46に記載の方法。

【請求項48】

前記試料の成分を定量することが、複数のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状のパラメータを定量することを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

前記試料が、12個の成分を含む、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

統計パラメータと混合全体への寄与とによって前記成分を特性評価する工程を更に含む、請求項47に記載の方法。

【請求項51】

前記統計パラメータが1.1以下の多変量潜在的スケール縮小を有することを判定することによって収束を評価する工程を更に含む、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、105bpより小さい断片サイズ及び220bpより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項53】

前記比較する工程が、全ゲノムにわたって、前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項54】

前記比較する工程が、サブゲノム区間にわたって、前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項40に記載の方法。

【請求項55】

対象におけるがんをモニタリングする方法であって、

(a) 前記対象におけるがんの状態を判定する工程であって、前記対象から得られた第1の試料における無細胞DNA(cfDNA)断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、前記第1の試料の前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較することと、前記第1の試料の前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出することと、によって前記がんの状態が判定される、工程と、

(b) 前記対象にがん治療を施す工程と、

(c) 前記対象から得られた第2の試料のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を決定する工程と、

(d) 前記第2の試料の前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状を、前記第1の試料の前記cfDNA断片サイズ密度曲線の前記形状及び/又は前記参照曲線形状と比較する工程と

を含み、それにより前記対象におけるがんをモニタリングする、方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 56】

(a) 試料についての低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーと、

(b) コンピュータシステムであって、

(i) 前記低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを処理して、前記試料の断片サイズ密度曲線を生成する、

(ii) 前記試料の前記断片サイズ密度曲線を、少なくとも2つの異なる確立された統計パラメータセットに適合させて、少なくとも2つの推奨曲線適合を生成する、

(iii) 前記少なくとも2つの推奨曲線適合を表示して、更なる処理のために前記少なくとも2つの推奨曲線適合のうちの少なくとも1つをユーザが選択することを可能にする、及び

(iv) (iii)の選択された推奨曲線適合に対応する推奨曲線適合線を参照曲線適合線とともに表示して、前記選択された推奨曲線適合線と前記参照曲線適合線との比較を可能にする

ための命令を含む非一時的コンピュータ可読媒体を有する、コンピュータシステムとを備える、システム。

## 【請求項 57】

前記コンピュータシステムが、

曲線適合分析に好適な成分を選択するように動作可能な、抽出ユニットと、

ユーザ定義の式の使用により、正規分布の有限混合適合を実行するか、又は多項式回帰適合を実行するように動作可能な、曲線適合ユニットと、

前記曲線適合ユニットによって生成された適合品質の指標を提供するように動作可能な、曲線適合度分析ユニットと、

基準値と比較して曲線適合パラメータを分類するように動作可能な、曲線適合パラメータ特性評価ユニットと、

適合係数及びそれらの特性評価を記憶するための、特性評価データベースとを更に含む、請求項56に記載のシステム。

## 【請求項 58】

前記断片サイズ密度曲線が、試料の無細胞DNA(cfdna)断片サイズ密度曲線である、請求項56に記載のシステム。

## 【請求項 59】

前記断片サイズ密度曲線を適合させることが、前記曲線の前記形状を定量することを含む、請求項56に記載のシステム。

## 【請求項 60】

前記曲線適合線、前記参照曲線適合線、及び両方の比較を表示するように動作可能な視覚表示装置を更に備える、請求項56に記載のシステム。

## 【請求項 61】

前記曲線適合線、前記参照曲線適合線、及び両方の比較を表示するレポートを印刷するために前記コンピュータシステムに接続されたプリンタを更に備える、請求項56に記載のシステム。

## 【請求項 62】

コンピュータプログラムで符号化された非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、前記プログラムが命令を含み、前記命令が、1つ以上のプロセッサによって実行されると、請求項1～55のいずれか一項に記載の方法を実行する動作を前記1つ以上のプロセッサに実行させる、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

## 【請求項 63】

メモリと、前記メモリに接続された1つ以上のプロセッサと、を備える、コンピューティングシステムであって、前記1つ以上のプロセッサが、請求項1～55のいずれか一項に記載の方法を実行する動作を実行するように構成されている、コンピューティングシステム。

10

20

30

40

50

## 【請求項 6 4】

以下の工程を含む、対象のがんの状態を判定する方法：

( a ) 対象からの試料におけるジヌクレオソーム DNA 断片の無細胞 DNA ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程であって、前記対象からの前記 c f D N A 曲線の前記形状と、健全な対象の参照試料からの曲線の形状との差が、前記対象におけるがんを示す、工程、および

( b ) 任意選択的に、がん治療を前記対象に施す工程。

## 【請求項 6 5】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 3 0 、 2 4 0 、 2 5 0 、 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 2 0 、 4 3 0 、 4 4 0 、 4 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 6 4 に記載の方法。 10

## 【請求項 6 6】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 4 0 b p より大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 7】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、染色体アームについて、約 2 6 0 b p ~ 4 4 0 b p の長さの断片の数を決定することと、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出することと、を含む、請求項 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

各染色体アームにおけるジヌクレオソーム断片の数を算出することを更に含む、請求項 6 7 に記載の方法。 20

## 【請求項 6 9】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、

( i ) c f D N A 断片を含む前記対象からの試料を配列決定ライブラリへと処理することと、

( i i ) 前記配列決定ライブラリを低カバレッジの全ゲノム配列決定に供して、配列決定された断片を得ることと、

( i i i ) 前記配列決定された断片をゲノムにマッピングして、マッピングされた配列のウィンドウを得ることと、 30

( i v ) 前記マッピングされた配列のウィンドウを分析して、c f D N A 断片長を決定することと

を更に含む、請求項 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 7 0】

前記マッピングされた配列が、数十～数千のウィンドウを含む、請求項 6 9 に記載の方法。

## 【請求項 7 1】

前記ウィンドウが、非重複ウィンドウである、請求項 6 9 に記載の方法。

## 【請求項 7 2】

前記ウィンドウが、各々、約 5 0 0 万の塩基対を含む、請求項 6 9 に記載の方法。 40

## 【請求項 7 3】

各ウィンドウ内で c f D N A 断片化プロファイルが決定される、請求項 6 9 に記載の方法。

## 【請求項 7 4】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、最も頻度が高い断片サイズを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

## 【請求項 7 5】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、様々な頻度の断片サイズを有する断片サイズ分布を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

## 【請求項 7 6】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記マッピングされた配列のウィンドウ内の小型 c f D N A 断片と大型 c f D N A 断片との比を含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の小型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の大型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、前記ゲノムにわたるウィンドウ内の小型及び大型 c f D N A 断片の配列カバレッジを含む、請求項 7 3 に記載の方法。 10

【請求項 8 0】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、全ゲノムにわたる、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 1】

前記 c f D N A 断片化プロファイルが、サブゲノム区間にわたる、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 2】

対象における D N A - ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを判定する方法であって、対象における無細胞 D N A ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を、請求項 6 4 ~ 8 1 のいずれか一項に記載の方法を使用して分析することを含み、前記曲線の前記形状が、前記 D N A - ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを示す、方法。 20

【請求項 8 3】

対象のがんの状態を予測する方法であって、

( a ) 前記対象から得られた試料におけるジヌクレオソーム D N A 断片の無細胞 D N A ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程と、

( b ) 前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較する工程と、

( c ) 前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出する工程であって、それにより前記対象の前記がんの状態を予測する、工程と 30

を含む、方法。

【請求項 8 4】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 3 0 、 2 4 0 、 2 5 0 、 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 2 0 、 4 3 0 、 4 4 0 、 4 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 8 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び 4 4 0 b p より大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 6】 40

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、染色体アームについて、約 2 6 0 b p ~ 4 4 0 b p の長さの断片の数を決定することと、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出することと、を含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 7】

各染色体アームにおけるジヌクレオソーム断片の数を算出することを更に含む、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 8】

前記参照曲線形状が、健常な対象から得られた試料中で測定された c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状である、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 8 9】 50



前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、胃がん、膵臓がん、胆管がん、及び卵巣がんからなる群より選択される、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記比較する工程が、全ゲノムにわたって、前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記比較する工程が、サブゲノム区間にわたって、前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 8 4 に記載の方法。

【請求項 9 2】

対象におけるがんを治療する方法であって、

10

( a ) 前記対象におけるがんを検出する工程であって、前記対象から得られた試料におけるジヌクレオソーム D N A 断片の無細胞 D N A ( c f D N A ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程と、前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較する工程と、前記試料の前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出する工程と、を含む、工程、および、

( b ) 前記対象にがん治療を施す工程を含み、それにより前記対象におけるがんを治療する、方法。

【請求項 9 3】

前記対象が、ヒトである、請求項 9 2 に記載の方法。

20

【請求項 9 4】

前記がんが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、胃がん、膵臓がん、胆管がん、及び卵巣がんからなる群より選択される、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 5】

前記がん治療が、手術、アジュバント化学療法、ネオアジュバント化学療法、放射線療法、ホルモン療法、細胞毒性療法、免疫療法、養子 T 細胞療法、標的療法、及びそれらの組み合わせからなる群より選択される、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 6】

前記参照曲線形状が、健常な対象から得られた試料中で測定された c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状のものである、請求項 9 2 に記載の方法。

30

【請求項 9 7】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 3 0 、 2 4 0 、 2 5 0 、 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 2 0 、 4 3 0 、 4 4 0 、 4 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 9 8】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、約 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び 4 4 0 b p より大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 9 7 に記載の方法。

【請求項 9 9】

前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析する工程が、染色体アームについて、約 2 6 0 b p ~ 4 4 0 b p の長さの断片の数を決定することと、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出することと、を含む、請求項 9 7 に記載の方法。

40

【請求項 1 0 0】

各染色体アームにおけるジヌクレオソーム断片の数を算出することを更に含む、請求項 9 9 に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

前記比較する工程が、全ゲノムにわたって、前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 2】

前記比較する工程が、サブゲノム区間にわたって、前記 c f D N A 断片サイズ密度曲線

50

の前記形状を参照曲線形状と比較することを含む、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

対象におけるがんをモニタリングする方法であって、

( a ) 前記対象におけるがんの状態を判定する工程であって、前記対象から得られた第 1 の試料におけるジヌクレオソーム DNA 断片の無細胞 DNA ( c f DNA ) 断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、前記第 1 の試料の前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を参照曲線形状と比較することと、前記第 1 の試料の前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状が前記参照曲線形状と異なる場合に前記対象におけるがんを検出することと、によって前記がんの状態が判定される、工程、

( b ) 前記対象にがん治療を施す工程、

( c ) 前記対象から得られた第 2 の試料におけるジヌクレオソーム DNA 断片の c f DNA 断片サイズ密度曲線の形状を決定する工程、ならびに

( d ) 前記第 2 の試料の前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を、前記第 1 の試料の前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状及び / 又は前記参照曲線形状と比較する工程

を含み、それにより前記対象におけるがんをモニタリングする、方法。

【請求項 1 0 4】

前記第 1 の試料及び前記第 2 の試料における前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析することが、約 2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 2 0、4 3 0、4 4 0、4 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記 c f DNA 断片サイズ密度曲線の前記形状を分析することが、約 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び 4 4 0 b p より大きい断片サイズを除外することを含む、請求項 1 0 3 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

コンピュータプログラムで符号化された非一時的コンピュータ可読記憶媒体であって、前記プログラムが命令を含み、前記命令が、1 つ以上のプロセッサによって実行されると、請求項 6 4 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法を実行する動作を前記 1 つ以上のプロセッサに実行させる、非一時的コンピュータ可読記憶媒体。

【請求項 1 0 7】

メモリと、前記メモリに接続された 1 つ以上のプロセッサと、を備える、コンピューティングシステムであって、前記 1 つ以上のプロセッサが、請求項 6 4 ~ 1 0 4 のいずれか一項に記載の方法を実行する動作を実行するように構成されている、コンピューティングシステム。

【請求項 1 0 8】

( a ) 試料についての低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーと、

( b ) 請求項 1 0 5 に記載の非一時的コンピュータ可読記憶媒体、又は請求項 1 0 6 に記載のコンピュータシステムと

を備える、システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 0 年 8 月 1 8 日に提出された米国仮出願第 6 3 / 0 6 7 , 2 4 4 号、及び 2 0 2 1 年 3 月 1 9 日に提出された米国仮出願第 6 3 / 1 6 3 , 4 3 4 号の米国特許法第 1 1 9 条 ( e ) に基づく優先権の利益を主張する。先行出願の開示は、その全体が本出願の開示の一部と見なされ、参照により本明細書に組み込まれる。

【0 0 0 2】

10

20

30

40

50

## 発明の分野

本発明は、概して、遺伝子分析に関し、より具体的には、対象におけるがんを検出及び／又は評価するための無細胞DNA断片サイズ密度の分析のための方法及びシステムに関する。

### 【背景技術】

#### 【0003】

## 背景情報

世界中のヒトのがんの罹患率及び死亡率の多くは、これらの疾患の診断が遅れた結果であり、治療効果は低い。残念ながら、早期がんを有する患者を広く診断及び治療するために使用できる臨床的に証明されたバイオマーカーは、広く利用できるものではない。

#### 【0004】

無細胞DNA (cfDNA) の分析は、そのようなアプローチが早期診断のための新たな道を提供する可能性があることを示唆している。循環腫瘍DNA (ctDNA) 断片は、非腫瘍細胞由来の他のcfDNAよりも平均して短いことが示されている。これまでの研究では、ヒストンコア若しくはリンカータンパク質に結合することによって引き起こされる異なるサイズ (例えば、短いものと長いもの、又は相互に排他的なサイズのセット) の断片をグループに分けること、これら断片のカウント数を使用してctDNAを定量すること、及び／又は個々の試料を腫瘍が存在するもの／存在しないものに分類することが探索されてきた。しかしながら、これまでの研究は、断片サイズ密度曲線の形状の重要性を無視している。

#### 【0005】

したがって、断片サイズ密度曲線の形状の分析を利用するがんの検出及び／又は評価方法は、対象におけるがんのより堅牢かつ信頼性の高い検出を可能にするために望ましい。

### 【発明の概要】

#### 【0006】

本開示は、患者から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状の分析を利用する方法及びシステムを提供する。曲線の形状は、がんの状態の強力な予測となることが本明細書で実証される。

#### 【0007】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象のがんの状態を判定する方法を提供する。本方法は、(a) 対象からの試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程であって、対象からのcfDNA断片サイズ密度曲線の形状と、健常な対象の参照試料からの曲線の形状との差が、対象におけるがんを示す、工程と、(b) 任意選択的に、対象にがん治療を施す工程と、を含む。

#### 【0008】

別の実施形態では、本発明は、対象におけるDNA-ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを判定する方法であって、本発明の方法を使用して、対象におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することを含む、方法を提供する。ある特定の態様では、曲線の形状は、DNA-ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを示している。

#### 【0009】

更に別の実施形態では、本発明は、対象のがんの状態を予測する方法を提供する。本方法は、(a) 対象から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、(b) 試料のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、(c) 試料のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがんを検出し、それにより、対象のがんの状態を予測することと、を含む。

#### 【0010】

別の実施形態では、本発明は、対象におけるがんを診断及び治療する方法を提供する。本方法は、(a) 対象におけるがんを検出する工程であって、対象から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、試料のcfDNA断片サイ

10

20

30

40

50

ズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがんを検出することと、を含む、検出する工程と、( b ) がん治療を対象に施す工程とを含み、それにより対象におけるがんを治療する。

【 0 0 1 1 】

更に別の実施形態では、本発明は、対象におけるがんをモニタリングする方法を提供する。本方法は、( a ) 対象におけるがんの状態を判定する工程であって、対象から得られた第 1 の試料における c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがん 10 を検出することと、によってがんの状態が判定される、判定する工程と、( b ) 対象にがん治療を施す工程と、( c ) 対象から得られた第 2 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を決定する工程と、( d ) 第 2 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状及び / 又は参照曲線形状と比較する工程とを含み、それにより対象におけるがんをモニタリングする。

【 0 0 1 2 】

別の実施形態では、本発明は、遺伝子分析及びがんの評価のためのシステムを提供する。本システムは、( a ) 試料についての低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーと、( b ) コンピュータシステムと、を備える。様々な態様において、コンピュータシステムは、以下のうちの 1 つ以上を実行するた 20 めの命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体を有する：( i ) 低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを処理して、試料の断片サイズ密度曲線を生成すること、( i i ) 試料の断片サイズ密度曲線を、少なくとも 2 つの異なる確立された統計パラメータセットに適合させて、少なくとも 2 つの推奨 ( s u g g e s t e d ) 曲線適合を生成すること、( i i i ) 少なくとも 2 つの推奨曲線適合を表示して、更なる処理のために少なくとも 2 つの推奨曲線適合のうち少なくとも 1 つをユーザが選択することを可能にすること、及び ( i v ) ( i i i ) の選択された推奨曲線適合に対応する推奨曲線適合線を参照曲線適合線とともに表示して、選択された推奨曲線適合線と参照曲線適合線との比較を可能にすること。

【 0 0 1 3 】

本発明の様々な態様において、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、様々な断片サイズの分析を含む。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することにより、約 1 0、5 0、1 0 0 又は 1 0 5 b p より小さい断片サイズ、及び約 2 2 0、2 5 0、3 0 0、3 5 0 b p より大きい又はより大きい断片サイズが除外される。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することにより、約 1 0 5 b p より小さい断片サイズ及び約 1 7 0 b p より大きい断片サイズが除外される。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、ジヌクレオソーム D N A 断片のものである。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することでは、約 2 3 0、2 4 0、2 5 0、2 6 0 b p より小さい断片サイズ、及び約 4 2 0、4 3 0、4 4 0、4 5 0 b p より大きい又はより大きい断 40 片サイズが除外される。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することでは、約 2 6 0 b p より小さい断片サイズ及び約 4 4 0 b p より大きい断片サイズが除外される。

【 0 0 1 4 】

更に別の実施形態では、本発明は、コンピュータプログラムで符号化された非一時的コンピュータ可読記憶媒体を提供する。コンピュータプログラムは命令を含み、命令は、1 つ以上のプロセッサによって実行されると、本発明の方法を実行する動作を 1 つ以上のプロセッサに実行させる。

【 0 0 1 5 】

更に別の実施形態では、本発明は、コンピューティングシステムを提供する。本システ 50

ムは、メモリと、メモリに接続された1つ以上のプロセッサと、を備え、1つ以上のプロセッサは、本発明の方法を実装する動作を実行するように構成されている。

【0016】

更に別の実施形態では、本発明は、遺伝子分析及びがんの評価のためのシステムであって、(a)試料についての全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーと、(b)本発明の非一時的コンピュータ可読記憶媒体及び/又はコンピュータシステムと、を備える、システムを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。 10

【図2】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。

【図3】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。

【図4】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。

【図5】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。

【図6】ジヌクレオソームのRSCスライド化によって生成される、様々な状態を示す画像である。Montel et al. (2011, "RSC remodeling of oligo-nucleosomes: an atomic force microscopy study." *Nucleic Acids Research* 39(7): 2571 - 2579.) 20

【図7】様々な断片サイズをもたらす潜在的なエンドヌクレアーゼ切断部位の例を示す画像である。状態ごとに2つの部位のみが示されているが、切断は、リンカーDNA内の複数の異なる位置で生じ得る。Montel et al. (2011)。

【図8】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。

【図9】本発明の一実施形態において本開示の方法論を使用して生成されたデータを示すグラフプロットである。 30

【発明を実施するための形態】

【0018】

発明の詳細な説明

本発明は、患者由来の試料中のcfDNAからのcfDNA断片サイズ密度曲線の形状の分析を利用する革新的な方法及びシステムに基づいている。本明細書で考察されるように、本発明は、1)多項式回帰、及び2)ベイズ有限混合モデルを使用する2つのアプローチにおいて、曲線の形状を定量する。本発明の方法及びシステムは、対象のがんの状態に関連するDNA-ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを要約するための新規アプローチとなる。 40

【0019】

本発明の組成物及び方法を説明する前に、本発明は、記載された特定の方法及びシステムに限定されるものではなく、そのような方法及びシステムは様々であり得ることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態のみを説明するためのものであり、限定することを意図するものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲のみに限定されることも理解されたい。

【0020】

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、文脈から明らかにそうではない限り、複数の参照を含む。したがって、例えば、「方法(the method)」への言及は、本明細書に記載される種類の1つ 50

以上の方法及び／又は工程を含み、本開示などを読めば当業者には明白になるであろう。

【0021】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書に記載される方法及び材料と類似するか、又は同等のあらゆる方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、好ましい方法及び材料を以下に記載する。

【0022】

本開示は、がんを検出するか、又はそうでなければ評価するための分析cfDNA断片サイズ密度のための革新的な方法及びシステムを提供する。

【0023】

一態様では、断片サイズ密度曲線の形状を定量するための本発明の方法論を開発するために使用されるデータは、浅い全ゲノム配列データ（1～2倍のカバレッジ）に基づいている。図1は、平均断片サイズ密度の比較を示す。図1において、DNAリード量によって正規化されたがん個体及びがんを有しない個体による平均断片サイズ密度をプロットする。

【0024】

以前の研究において概して示されるように、がんを有しない個体のcfDNA断片はより長く（平均サイズ：167.09bp）、一方、がんを有する個体のcfDNA断片はより短い（平均サイズ：164.88bp）。しかしながら、図1は、短い断片の増加を越える、これら密度の全体形状の差を示す。更に、これらの差は、以前の取り組みで利用されたような特定ピークの周期性によって捉えられるものではない。代わりに、これらの断片サイズ密度の差は、DNA-ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスの差を表し得、正確にモデリングするための、ピン又は周期性のカウントを越える代替アプローチを必要とする。本明細書に記載の方法は、血漿ドナーのがんの状態に関連するDNA-ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを要約するための新規アプローチとなる。

【0025】

様々な態様において、本開示は、断片サイズ密度が分布の混合としてモデリングされ得、そのパラメータががんの状態を予測するものであり得ることを実証する。いくつかの態様では、本開示は、単一のヌクレオソームのサイズ（260bp未満のサイズ）に密接に対応する断片サイズの使用を例示する。これらは典型的には、H1ヒストン及びリンカーDNA（20bp）とともに147bpのDNAが巻き付いたヒストンオクトマーを含み、167bpサイズの主要なピークが観察される。本開示はまた、中央値が334bpのピークをもたらす2つのヌクレオソームを含む可能性が高い260bpを超えるcfDNA断片の使用を例示する。

【0026】

したがって、一実施形態では、本発明は、対象のがんの状態を判定する方法を提供する。本方法は、（a）対象からの試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析する工程であって、対象からのcfDNA断片サイズ密度曲線の形状と、健常な対象の参照試料からの当該曲線の形状との差が、対象におけるがんを示す、分析する工程と、（b）任意選択的に、対象にがん治療を施す工程と、を含む。

【0027】

別の実施形態では、本発明は、対象のがんの状態を予測する方法を提供する。本方法は、（a）対象から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、（b）試料のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、（c）試料のcfDNA断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがんを検出し、それにより、対象のがんの状態を予測することと、を含む。

【0028】

更に別の実施形態では、本発明は、対象におけるがんを治療する方法を提供する。本方法は、（a）対象におけるがんを検出する工程であって、対象から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、試料のcfDNA断片サイズ密

10

20

30

40

50

度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがんを検出することと、を含む、検出する工程と、( b ) がん治療を対象に施す工程とを含み、それにより対象におけるがんを治療する。

【 0 0 2 9 】

別の実施形態では、本発明は、対象におけるがんをモニタリングする方法を提供する。本方法は、( a ) 対象におけるがんの状態を判定する工程であって、対象から得られた第 1 の試料における c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することと、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を参照曲線形状と比較することと、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状が参照曲線形状と異なる場合に対象におけるがんを検出することと、によってがんの状態が判定される、判定する工程と、( b ) 対象にがん治療を施す工程と、( c ) 対象から得られた第 2 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を決定する工程と、( d ) 第 2 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を、第 1 の試料の c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状及び / 又は参照曲線形状と比較する工程とを含み、それにより対象におけるがんをモニタリングする。

10

【 0 0 3 0 】

様々な態様において、本発明の方法は、分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることによって、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することを含む。特定の態様では、分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させることは、試料の成分を定量することを含み、これは、複数の c f D N A 断片サイズ密度曲線を定量することを含み得る。いくつかの態様では、試料は、約 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個、8 個、9 個、10 個、11 個、12 個、13 個、14 個、15 個、又はより多くの成分を含む。1 つの例示的な態様では、実施例 1 で考察されるように、試料は、12 個の成分を含む。

20

【 0 0 3 1 】

様々な態様において、分布は、切断正規分布を含む。

【 0 0 3 2 】

様々な態様において、本方法は、統計パラメータと混合全体への寄与とによって、試料の成分を特性評価することを含む。このような統計パラメータとしては、限定されないが、平均、分散及び / 又は形状、並びに重みが挙げられ得る。

30

【 0 0 3 3 】

本発明の方法は、統計パラメータが 1 . 5、1 . 4、1 . 3、1 . 2、1 . 1 若しくは 1 . 0 以下、又は約 1 . 5、1 . 4、1 . 3、1 . 2、1 . 1 若しくは 1 . 0 の多変量潜在的スケール縮小係数 ( m u l t i v a r i a t e p o t e n t i a l s c a l e r e d u c t i o n f a c t o r ) を有することを判定することによって収束を評価することを更に含み得る。

【 0 0 3 4 】

様々な態様において、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、約 10、50、100 又は 105 b p より小さい連続した断片サイズ範囲、及び約 220、250、300、350 b p より大きい又はより大きい連続した断片サイズ範囲を除外することを含む。一態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、105 b p より小さい断片サイズ及び 170 b p より大きい断片サイズを除外することを含む。

40

【 0 0 3 5 】

特定の態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、ジヌクレオソーム D N A 断片のものである。いくつかの態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することにより、約 230、240、250、260 b p より小さい断片サイズ、及び約 420、430、440、450 b p より大きい又はより大きい断片サイズが除外される。一態様では、c f D N A 断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、260 b p より小さい断片サイズ及び 440 b p より大きい断片サイズを除外することを含む。

50

## 【0036】

加えて、cfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、所与の長さの断片のカウント数に適合する多項式回帰の係数を使用して曲線の形状を定量することを含む。実施例1において示されるように、本方法は、断片のカウント数を、平均が0及び分散が1となるように標準化することを更に含み得る。

## 【0037】

様々な態様において、cfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することは、(i) cfDNA断片を含む対象からの試料を配列決定ライブラリへと処理すること、(ii) 配列決定ライブラリを低カバレッジの全ゲノム配列決定に供して、配列決定された断片を得ること、(iii) 配列決定された断片をゲノムにマッピングして、マッピングされた配列のウィンドウを得ること、及び(iv) マッピングされた配列のウィンドウを分析して、cfDNA断片長を決定すること、のうちの1つ以上を含み得る。

10

## 【0038】

ある特定の態様では、マッピングされた配列は、数十～数千のゲノムウィンドウ、例えば、10個、50個、100個～1,000個、5,000個、10,000個、またはより多くのウィンドウを含む。そのようなウィンドウは、非重複又は重複であり得、約100万、200万、300万、400万、500万、600万、700万、800万、900万又は1000万塩基対を含む。

## 【0039】

様々な態様において、cfDNA断片化プロファイルは、各ウィンドウ内で決定される。したがって、本発明は、対象における(例えば、対象から得られた試料における)cfDNA断片化プロファイルを決定するための方法を提供する。本明細書で使用される場合、「断片化プロファイル」、「断片化パターンにおける位置依存性の差」、及び「ゲノムにわたる位置依存的な断片サイズ及びカバレッジの差」という用語は等価であり、互換的に使用され得る。

20

## 【0040】

いくつかの態様では、対象におけるcfDNA断片化プロファイルを決定することは、cfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することによって、がんを有する対象を特定するのに使用することができる。例えば、対象から(例えば、対象から得られた試料から)得られたcfDNA断片を低カバレッジの全ゲノム配列決定に供することができ、配列決定された断片を参照ヒトゲノムに(例えば、非重複ウィンドウ内で)マッピングし、評価して、分析されたcfDNA断片化プロファイル及びcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を決定することができる。本明細書に記載されるように、がんを有する対象のcfDNA断片化プロファイルは、健全な対象(例えば、がんを有しない対象)のcfDNA断片化プロファイルよりも(例えば、断片長が)不均一である。

30

## 【0041】

いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、cfDNA断片サイズ密度曲線のピークを画定する最も頻度が高い断片サイズを含む。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、様々な頻度の断片サイズを有する断片サイズ分布を含む。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、マッピングされた配列の当該ウィンドウにおける、小型cfDNA断片と大型cfDNA断片との比を含む。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、ゲノムにわたるウィンドウ内の小型cfDNA断片の配列カバレッジを含む。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、ゲノムにわたるウィンドウ内の大型cfDNA断片の配列カバレッジを含む。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、全ゲノムにわたる。いくつかの態様では、cfDNA断片化プロファイルは、サブゲノム区間にわたる。

40

## 【0042】

cfDNA断片化プロファイルは、1つ以上のcfDNA断片化パターンを含むことが

50



できる。c f D N A 断片化パターンは、任意の適切なc f D N A 断片化パターンを含むことができる。c f D N A 断片化パターンの例としては、限定されないが、断片サイズ中央値、断片サイズ分布、小型c f D N A 断片と大型c f D N A 断片との比、及びc f D N A 断片のカバレッジが挙げられる。いくつかの態様では、c f D N A 断片化パターンは、断片サイズ中央値、断片サイズ分布、小型c f D N A 断片と大型c f D N A 断片との比、及びc f D N A 断片のカバレッジのうち2つ以上（例えば、2つ、3つ、又は4つ）を含む。いくつかの態様では、c f D N A 断片化プロファイルは、ゲノム全体のc f D N A プロファイル（例えば、ゲノムにわたるウィンドウ内のゲノム全体のc f D N A プロファイル）であり得る。いくつかの態様では、c f D N A 断片化プロファイルは、標的領域プロファイルであり得る。標的領域は、ゲノムの任意の適切な部分（例えば、染色体領域）であり得る。本明細書に記載されるように、c f D N A 断片化プロファイルが決定され得る染色体領域の例としては、限定されないが、染色体の一部（例えば、2 q、4 p、5 p、6 q、7 p、8 q、9 q、10 q、11 q、12 q 及び/若しくは14 qの一部）並びに染色体アーム（例えば、8 q、13 q、11 q 及び/若しくは3 pの染色体アーム）が挙げられる。いくつかの態様では、c f D N A 断片化プロファイルは、2つ以上の標的領域プロファイルを含むことができる。

10

#### 【0043】

いくつかの態様では、c f D N A 断片化プロファイルを使用して、c f D N A 断片長の変化（例えば、改変）を特定することができる。改変は、ゲノム全体の改変又は1つ以上の標的領域/遺伝子座の改変であり得る。標的領域は、1つ以上のがん特異的改変を含む任意の領域であり得る。いくつかの態様では、c f D N A 断片化プロファイルを使用して、約10の改変～約500の改変（例えば、約25～約500、約50～約500、約100～約500、約200～約500、約300～約500、約10～約400、約10～約300、約10～約200、約10～約100、約10～約50、約20～約400、約30～約300、約40～約200、約50～約100、約20～約100、約25～約75、約50～約250、又は約100～約200の改変）を特定（例えば、同時に特定）することができる。

20

#### 【0044】

様々な態様において、c f D N A 断片化プロファイルは、c f D N A 断片サイズパターンを含み得る。c f D N A 断片は、任意の適切なサイズであり得る。例えば、いくつかの態様では、c f D N A 断片は、約50塩基対（bp）～約400bpの長さであり得る。本明細書に記載されるように、がんを有する対象は、健常な対象におけるc f D N A 断片サイズ中央値よりも短いc f D N A 断片サイズ中央値を含むc f D N A 断片サイズパターンを有することができる。健常な対象（例えば、がんを有しない対象）は、約166.6bp～約167.2bp（例えば、約166.9bp）のc f D N A 断片サイズ中央値を有するc f D N A 断片サイズを有することができる。ある態様では、がんを有する対象は、健常な対象におけるc f D N A 断片サイズよりも平均して約1.28bp～約2.49bp（例えば、約1.88bp）短いc f D N A 断片サイズを有することができる。例えば、がんを有する対象は、約164.11bp～約165.92bp（例えば、約165.02bp）のc f D N A 断片サイズ中央値を有するc f D N A 断片サイズを有することができる。

30

40

#### 【0045】

いくつかの態様では、ジヌクレオソームc f D N A 断片は、約230塩基対（bp）～約450bpの長さとしてすることができる。本明細書に記載されるように、がんを有する対象は、健常な対象におけるジヌクレオソームc f D N A 断片サイズ中央値よりも短いジヌクレオソームc f D N A 断片サイズ中央値を含むジヌクレオソームc f D N A 断片サイズパターンを有することができる。図5に見られるようないくつかの態様では、平均して、がんを有しない対象は、ジヌクレオソーム範囲内でより長いc f D N A 断片（平均サイズ：334.75bp）を有するのに対し、がんを有する対象は、より短いジヌクレオソームc f D N A 断片（平均サイズ：329.6bp）を有することが明らかである。したが

50

って、健常な対象（例えば、がんを有しない対象）は、約 334.75 bp の cfDNA 断片サイズ中央値を有するジヌクレオソーム cfDNA 断片サイズを有することができる。いくつかの態様では、がんを有する対象は、健常な対象におけるジヌクレオソーム cfDNA 断片サイズよりも短いジヌクレオソーム cfDNA 断片サイズを有することができる。例えば、がんを有する対象は、約 329.6 bp の cfDNA 断片サイズ中央値を有するジヌクレオソーム cfDNA 断片サイズを有することができる。

#### 【0046】

cfDNA 断片化プロファイルは、cfDNA 断片サイズ分布を含み得る。本明細書に記載されるように、がんを有する対象は、健常な対象における cfDNA 断片サイズ分布よりも可変性が高い cfDNA サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、サイズ分布は、標的領域内にあることができる。健常な対象（例えば、がんを有しない対象）は、約 1 又は約 1 未満の標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、がんを有する対象は、健常な対象における標的領域 cfDNA 断片サイズ分布よりも長い（例えば、10、15、20、25、30、35、40、45、50、若しくはより大きい bp、又はこれらの数の間の任意の数の塩基対分だけ長い）標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、がんを有する対象は、健常な対象における標的領域 cfDNA 断片サイズ分布よりも短い（例えば、10、15、20、25、30、35、40、45、50 若しくはより大きい bp、又はこれらの数の間の任意の数の塩基対分だけ短い）標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、がんを有する対象は、健常な対象における標的領域 cfDNA 断片サイズ分布よりも約 47 bp 小さい～約 30 bp 長い標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、がんを有する対象は、平均して、10、11、12、13、14、15、15、17、18、19、20 又はより大きい bp の cfDNA 断片長差がある標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。例えば、がんを有する対象は、平均して約 13 bp の cfDNA 断片長差がある標的領域 cfDNA 断片サイズ分布を有することができる。いくつかの態様では、サイズ分布は、ゲノム全体のサイズ分布であり得る。

#### 【0047】

cfDNA 断片化プロファイルは、小型 cfDNA 断片と大型 cfDNA 断片との比、及び断片比と参照断片比との相関を含み得る。本明細書で使用される場合、小型 cfDNA 断片と大型 cfDNA 断片との比に関して、小型 cfDNA 断片は、約 100 bp 長～約 150 bp 長であり得る。本明細書で使用される場合、小型 cfDNA 断片と大型 cfDNA 断片との比に関して、大型 cfDNA 断片は、約 151 bp～220 bp 長であり得る。本明細書に記載されるように、がんを有する対象は、断片比の相関（例えば、cfDNA 断片比と参照 DNA 断片比（例えば、1 以上の健常な対象からの DNA 断片比）との相関）が、健常な対象のものよりも低い（例えば、2 倍低い、3 倍低い、4 倍低い、5 倍低い、6 倍低い、7 倍低い、8 倍低い、9 倍低い、10 倍低い、又はより低い）ものであり得る。健常な対象（例えば、がんを有しない対象）は、断片比の相関（例えば、cfDNA 断片比と参照 DNA 断片比（例えば、1 以上の健常な対象からの DNA 断片比）との相関）が、約 1（例えば、約 0.96）であり得る。いくつかの態様では、がんを有する対象は、断片比の相関（例えば、cfDNA 断片比と参照 DNA 断片比（例えば、1 以上の健常な対象からの DNA 断片比）との相関）が、健常な対象の断片比の相関（例えば、cfDNA 断片比と参照 DNA 断片比（例えば、1 以上の健常な対象からの DNA 断片比）との相関）よりも平均して約 0.19～約 0.30（例えば、約 0.25）低いものであり得る。

#### 【0048】

本明細書に記載の方法及びシステムは、対象におけるがんの状態を検出、予測、治療及び/又はモニタリングするために有用である。哺乳動物などの任意の適切な対象は、本明細書に記載されるように、評価、モニタリング、及び/又は治療することができる。本明細書に記載されるように評価、モニタリング、及び/又は治療することができるいくつか

10

20

30

40

50

の哺乳動物の例としては、限定されないが、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、マウス、及びラットなどの霊長類が挙げられる。例えば、がんを有する、又はがんを有する疑いのあるヒトは、本明細書に記載の方法を使用して評価することができ、任意選択的に、本明細書に記載の1つ以上のがん治療で治療することができる。

#### 【0049】

任意の適切な種類のがんを有するか、又は有する疑いのある対象は、本明細書に記載の方法及びシステムを使用して、（例えば、対象に1つ以上のがん治療を施すことによって）評価及び/又は治療することができる。がんは、任意のステージのがんであり得る。いくつかの態様では、がんは、早期がんであり得る。いくつかの態様では、がんは、無症候性がんであり得る。いくつかの態様では、がんは、残存疾患及び/又は再発（例えば、外科的切除後及び/又はがん療法後）であり得る。がんは、任意の種類のがんであり得る。本明細書に記載されるように評価、モニタリング、及び/又は治療することができる種類のがんの例としては、限定されないが、結腸直腸がん、肺がん、乳がん、胃がん、膵臓がん、胆管がん、頭頸部がん、腎臓がん、骨がん、脳がん、造血がん及び卵巣がんが挙げられる。

10

#### 【0050】

本明細書に記載のがんを有する対象、又はがんを有する疑いのある対象を治療する場合、対象に1つ以上のがん治療を施すことができる。がん治療は、任意の適切ながん治療であり得る。本明細書に記載される1つ以上のがん治療は、任意の適切な頻度で対象に（例えば、数日～数週間の期間にわたって1回又は複数回）施すことができる。がん治療の例としては、限定されないが、アジュバント化学療法、ネオアジュバント化学療法、放射線療法、ホルモン療法、細胞傷害療法、免疫療法、養子T細胞療法（例えば、キメラ抗原受容体及び/又は野生型若しくは修飾T細胞受容体を有するT細胞）、キナーゼ阻害剤（例えば、転座若しくは変異などの特定の遺伝性病変を標的とするキナーゼ阻害剤）（例えば、キナーゼ阻害剤、抗体、二重特異性抗体）の投与などの標的療法、シグナル導入阻害剤、二重特異性抗体若しくは抗体断片（例えば、BiTE）、モノクローナル抗体、免疫チェックポイント阻害剤、手術（例えば、外科的切除）、又は上記の任意の組み合わせが挙げられる。いくつかの態様では、がん治療は、がんの重症度を低減させ、がんの症状を低減させ、及び/又は対象内に存在するがん細胞の数を低減させることができる。

20

#### 【0051】

いくつかの態様では、がん治療は、化学療法剤であり得る。化学療法剤の非限定的な例としては、アムサクリン、アザシチジン、アキサチオプリン、ペバシズマブ（又はその抗原結合断片）、プレオマイシン、プスルファン、カルボプラチン、カペシタビン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、シタラビン、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキシフルリジン、ドキシソルピシン、エピルピシン、エルロチニブ塩酸化物、エトポシド、フィウダラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、フルオロウシル、ゲムシタビン、ヒドロキシ尿素、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルファラン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、プロカルバジン、オールトランスレチノイン酸、ストレプトゾシン、タフルポシド、テモゾロミド、テニポシド、チオグアニン、トポテカン、ウラムスチン、バルルピシン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ピノレルピン、及びそれらの組み合わせが挙げられる。抗がん療法の更なる例は、当該技術分野において知られており、例えば、米国臨床腫瘍学会（American Society of Clinical Oncology、ASCO）、欧州臨床腫瘍学会（European Society for Medical Oncology、ESMO）、又は全米総合がん情報ネットワーク（National Comprehensive Cancer Network、NCCN）からの療法のためのガイドラインを参照されたい。

30

40

#### 【0052】

本明細書に記載されるように、がんを有する対象、又はがんを有する疑いのある対象を

50

モニタリングする際、モニタリングすることは、がん治療の過程の前、中、及び／又は後であり得る。本明細書に提供されるモニタリングする方法を使用して、1つ以上のがん治療の有効性を判定すること、及び／又はモニタリングの増強のために対象を選択することができる。いくつかの態様では、モニタリングすることは、対象から得られた試料におけるcfDNA断片サイズ密度曲線の形状を分析することを含むことができる。例えば、がんを有する、又はがんの疑いのある若しくはがんを有する対象に、1つ以上のがん治療を施す前に、cfDNA断片サイズ密度曲線の形状を得ることができ、1つ以上のがん治療を対象に施すことができ、がん治療の過程に、1つ以上のcfDNA断片サイズ密度曲線を得ることができる。いくつかの態様では、cfDNA断片サイズ密度曲線の形状は、がん治療（例えば、本明細書に記載のがん治療のいずれか）の過程に変化し得る。例えば、対象ががんを有することを示しているcfDNA断片サイズ密度曲線の形状は、対象ががんを有しないことを示しているcfDNA断片サイズ密度曲線の形状に変化し得る。

10

【0053】

いくつかの態様では、モニタリングすることは、1つ以上のがん治療（例えば、1つ以上のがん治療の有効性）をモニタリングすることができる従来の技術を含むことができる。いくつかの態様では、モニタリングの増強のために選択された対象には、モニタリングの増強のために選択されていない対象と比較して増加した頻度で、診断テスト（例えば、本明細書に開示された診断テストのいずれか）を投与することができる。例えば、モニタリングの増強のために選択された対象には、1日2回、毎日、隔週、毎週、隔月、毎月、四半期ごと、半年ごと、毎年、又はそのいずれかの頻度で、診断テストを投与することができる。

20

【0054】

様々な態様において、DNAは、対象から採取し、本発明の方法論で使用する生物学的試料中に存在する。生物学的試料は、DNAを含む実質的に任意の種類生物学的試料であり得る。生物学的試料は、典型的に、循環cfDNAを含む全血又はその一部などの流体である。実施形態では、試料としては、腫瘍又は液体生検、例えば、限定されないが、羊水、房水、硝子体液、血液、全血、分画された血液、血漿、血清、母乳、脳脊髄液（CSF）、耳垢（cerumen）（耳垢（earwax））、乳糜、チャイム（chime）、内リンパ、外リンパ、糞便、呼吸、胃酸、胃液、リンパ、粘液（鼻漏及び痰（phlegm）を含む）、心膜液、腹腔液、胸膜液、膿、カタル性分泌物、唾液、呼気凝縮液、皮脂、精液、痰（sputum）、汗（sweat）、滑液、涙、嘔吐物、前立腺液、乳頭吸引液、涙液、汗（perspiration）、口腔粘膜スワブ、細胞溶解液、胃腸液、生検組織、並びに尿又は他の生体液からのDNAが挙げられる。一態様では、試料は、循環腫瘍細胞からのDNAを含む。

30

【0055】

上に開示されるように、生物学的試料は、血液試料であり得る。血液試料は、当該技術分野で知られている方法、例えば、指先採取（finger prick）又は静脈切開術（phlebotomy）を使用して得ることができる。好適には、血液試料は、約0.1~20ml、又は代替的に約1~15mlであり、血液量は約10mlである。少量を使用してもよく、また血液中で遊離DNAを循環させてもよい。針生検、カテーテル、排泄、又はDNAを含有する体液の産生によるマイクロサンプリング及びサンプリングもまた、潜在的な生物学的試料源である。

40

【0056】

本開示の方法及びシステムは、核酸配列情報を利用し、したがって、核酸増幅、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、ナノポア配列決定、454配列決定、挿入タグ付け配列決定（insertion tagged sequencing）を含む核酸配列決定を実行するためのあらゆる方法又は配列決定装置を含むことができる。いくつかの態様では、本開示の方法論又はシステムは、Illumina, Inc（HiSeq（商標）X10、HiSeq（商標）1000、HiSeq（商標）2000、HiSeq（商標）2500、Genome Analyzers（商標）、MiSeq（商標）、NextSe

50

q、NovaSeq6000システムを含むがこれらに限定されない)、Applied Biosystems Life Technologies (SOLiD (商標) System、Ion PGM (商標) Sequencer、ion Proton (商標) Sequencer)、又はGenapsys、又はBGI MGIによって提供されるシステム及び他のシステムなどのシステムを利用する。核酸分析は、Oxford Nanopore Technologies (GridION (商標)、MiniON (商標))又はPacific Biosciences (Pacbio (商標) RS II 若しくはSequel II又はII)によって提供されるシステムによって実施できる。

【0057】

本発明は、開示される方法の工程を実行するためのシステムを含み、部分的には、機能的成分及び様々な処理工程の観点から説明される。そのような機能的成分及び処理工程は、指定された機能を実行し、様々な結果を達成するように構成された任意の数の成分、動作及び技術によって実現され得る。例えば、本発明は、様々な生物学的試料、バイオマーカー、要素、材料、コンピュータ、データソース、記憶システム及び媒体、情報収集技術及びプロセス、データ処理基準、統計分析、回帰分析などを用いてもよく、これらは様々な機能を実施し得る。

【0058】

したがって、本発明は、がんを検出、分析、及び/又は評価するためのシステムを更に提供する。様々な態様において、本システムは、(a)試料についての低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを生成するように構成されているシーケンサーと、(b)本発明の方法を実行するための機能を有するコンピュータシステム及び/又はプロセッサと、を備える。

【0059】

特定の態様では、コンピュータシステムは、以下のうちの1つ以上を実行するための命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体を有する。(i)低カバレッジの全ゲノム配列決定データセットを処理して、試料の断片サイズ密度曲線を生成すること、(ii)試料の断片サイズ密度曲線を、少なくとも2つの異なる確立された統計パラメータセットに適合させて、少なくとも2つの推奨曲線適合を生成すること、(iii)少なくとも2つの推奨曲線適合を表示して、更なる処理のために少なくとも2つの推奨曲線適合のうち少なくとも1つをユーザが選択することを可能にすること、及び(iv)(iii)の選択された推奨曲線適合に対応する推奨曲線適合線を参照曲線適合線とともに表示して、選択された推奨曲線適合線と参照曲線適合線との比較を可能にすること。

【0060】

いくつかの態様では、コンピュータシステムは、ゲノムの1つ以上の染色体アームについて、長さが約260bp~440bpの断片の数を決定し、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出するための命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体を有する。いくつかの態様では、コンピュータシステムは、ゲノムの1つ以上の染色体アームについて、長さが約260bp~440bpの断片の数を決定し、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出し、各染色体アーム中のジヌクレオソーム断片の数を算出するための命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体を有する。いくつかの態様では、コンピュータシステムは、ゲノムの1つ以上の染色体アームについて、長さが約260bp~440bpの断片の数を決定し、アーム当たりのジヌクレオソーム断片の割合を算出し、各染色体アームにおけるジヌクレオソーム断片の数を算出し、断片サイズ密度曲線を生成するための命令を含む、非一時的コンピュータ可読媒体を有する。

【0061】

いくつかの態様では、コンピュータシステムは、1つ以上の追加のモジュールを更に備える。例えば、本システムは、曲線適合分析に好適な成分を選択するように動作可能な抽出ユニット、正規分布の有限混合の適合を実行するか又は多項式回帰適合を実行する(ユーザ定義の式の使用による)ように動作可能な曲線適合ユニット、曲線適合ユニットによって生成された適合品質の指標を提供するように動作可能な曲線適合度(fitting

10

20

30

40

50

goodness)分析ユニット、基準値と比較して曲線適合パラメータを分類するように動作可能な曲線適合パラメータ特性評価ユニット、適合係数及びそれらの特性評価を記憶するための特性評価データベース、又はそれらの任意の組み合わせのうちの一つ以上を備え得る。

【0062】

いくつかの態様では、コンピュータシステムは、視覚表示装置を更に備える。視覚表示装置は、曲線適合線、参照曲線適合線、及び/又は両方の比較を表示するように動作可能であり得る。

【0063】

本発明の様々な態様による検出及び分析のための方法は、例えば、コンピュータシステム上で動作するコンピュータプログラムを使用して、任意の好適な方法で実施され得る。本明細書で考察されるように、本発明の様々な態様による例示的なシステムは、コンピュータシステム、例えば、プロセッサと、ランダムアクセスメモリと、を備える従来のコンピュータシステム(リモートアクセス可能なアプリケーションサーバ、ネットワークサーバ、パーソナルコンピュータ又はワークステーションなど)と併せて実装され得る。コンピュータシステムはまた、好適には、追加のメモリ装置又は情報記憶システム(大容量記憶システムなど)及びユーザインターフェース(例えば、従来のモニタ、キーボード及び追跡装置)を備える。しかしながら、コンピュータシステムは、任意の好適なコンピュータシステム及び関連する装置を備え得、任意の好適な様式で構成され得る。一実施形態では、コンピュータシステムは、スタンドアロンシステムを備える。別の実施形態では、コンピュータシステムは、サーバと、データベースと、を備えるコンピュータのネットワークの一部である。

10

20

【0064】

情報の受信、処理、及び分析に必要なソフトウェアは、単一の装置に実装され得るか、又は複数の装置に実装され得る。ソフトウェアは、情報の記憶及び処理がユーザに関してリモートで行われるように、ネットワークを介してアクセスされ得る。本発明の様々な態様によるシステム及びその様々な要素は、データの収集、処理、分析、報告及び/又は診断などの検出及び/又は分析を容易にする機能及び動作を提供する。例えば、本態様では、コンピュータシステムは、ヒトゲノム又はその領域に関連する情報を受信、記憶、検索、分析、及び報告し得るコンピュータプログラムを実行する。コンピュータプログラムは、生データを処理し、補足データを生成するための処理モジュール、並びに生データ及び補足データを分析して、疾患状態モデル及び/又は診断情報の定量的評価を生成するための分析モジュールなど、様々な機能又は操作を実行する複数のモジュールを備え得る。

30

【0065】

システムによって実行される手順は、分析及び/又はがん診断を容易にするための任意の好適なプロセスを含み得る。一実施形態では、本システムは、疾患状態モデルを確立する、及び/又は患者における疾患状態を判定するように構成される。疾患状態の判定又は特定は、診断の実行、診断に役立つ情報の提供、疾患の病期若しくは進行の評価、疾患の感受性を示す可能性のある状態の特定、更なる試験を推奨してもよいかどうかの特定、一つ以上の治療プログラムの有効性の予測及び/若しくは評価、又はそうでなければ患者の疾患状態、疾患の可能性、若しくは他の健康面の評価など、疾患に対する患者の状態に関する任意の有用な情報を生成することを含み得る。

40

【0066】

以下の実施例は、本発明の利点及び特徴を更に例示するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。この実施例は、使用してもよい実施例の典型であるが、当業者に既知の他の手順、方法又は技術を代替的に使用してもよい。

【実施例】

【0067】

実施例 1

がんの検出

50

この実施例では、本開示の方法論を、がんを検出するために利用した。以下では、がんの検出に使用される方法論及びプロセスについて詳細に考察する。207名のがんを有する個体及び214名のがんを有しない個体からなるドナーから収集された421個の血漿試料からの全ゲノムデータを使用して、ヌクレオソーム再配置に関連する方法で断片サイズ密度の形状がどのように算出されるかを実証する。更に、単独で及び他の開発されたアプローチと併せてがんの状態を予測するためにどのように結果を使用するかを示す。

#### 【0068】

断片サイズ密度の形状を要約するために使用される2つの方法論が、本明細書で先に説明され、以下のようにより詳細に説明される。

#### 【0069】

第1の方法(多項式回帰法)では、試料によって別々に適合する所与の長さの断片のカウント数に適合する多項式回帰の係数を使用した。サイズが105bpより小さい断片及び170bpより大きい断片は、断片のカウント数が少なく、かつ、モードがあまり顕著ではなく、多項式回帰では容易には捉えられないために除外した。詳細には、サイズNの断片のカウント数を、平均が0及び分散が1となるように、試料によって標準化した。この回帰への入力として、断片サイズの1~12次の直交多項式があった。したがって、各回帰モデルについて、入力はサイズ66×12の行列であり、出力はスケールされたカウント数である。各多項式回帰モデルから係数を抽出する。多項式回帰モデルは、断片サイズ密度の形状を明示的に捉え、ヌクレオソームの摺動及びDNAループの寄与を暗黙的にモデリングする。

#### 【0070】

第2の方法(ベイズ有限混合モデル)では、切断正規分布の有限混合を断片サイズのカウント数に適合させた。105bpより小さい断片サイズ及び220bpより大きい断片サイズは、その範囲外のDNA断片のカウント数が少ないために除外した。分布の上昇側には、モードに対応する7つの成分が見られる。成分のうち3つは、下降側に見られる成分に対応する。1つの成分は、塩基全体を特徴付け、試料の98.33%中の混合物の50%超を構成する。最後の成分は、断片サイズ密度の下降側に見られるスキューを捉える。各成分は、平均がより大きい成分の分散の過小評価を防ぐために、220bpで切断されている。これらの成分の各々は、平均、分散及び混合全体への寄与によって特性評価される。交換不可能で適度に有益な事前分布は、混合の平均及び分散に関するものとし、あまり有益でないディリクレ事前分布は、混合割合に関するものとした。このモデルは、2,000個の試料(1,000個のウォームアップ試料)を用いて、No-U-Turn-Sampler(Hoffman, Matthew D., and Andrew Gelman. 2014. "The No-U-Turn Sampler: Adaptively Setting Path Lengths in Hamiltonian Monte Carlo." *J. Mach. Learn. Res.* 15(1): 1593-1623.)を使用して、試料ごとに適合させる。収束は、全てのパラメータの多変量潜在的スケール縮小係数が1.1以下であることを確認することによって評価する(Gelman, Andrew, and Donald B. Rubin. 1992. "Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences." *Statistical Science* 7(4): 457-72. <https://doi.org/10.1214/ss/1177011136>).モデルはまた、変分推論(Variational Inference)を使用して適合させてもよい。

#### 【0071】

結果

図2に見られるように、多項式モデルは断片サイズ密度の形状のニュアンスのうちの一部を捉えるが、混合モデルは断片サイズ密度の形状にほぼ正確に適合する。重要なことに、図3は、混合モデルの解釈可能性を示し、根底にあるDNA-ヌクレオソーム相互作用との関係をより明確にする。

10

20

30

40

50

## 【0072】

断片サイズ密度の形状は、DNA - ヌクレオソーム相互作用ダイナミクスを反映し得ると考えられる。Lequieu et al. (Lequieu, Joshua, David C. Schwartz, and Juan J. de Pablo. 2017. "In Silico Evidence for Sequence-Dependent Nucleosome Sliding." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (44): E9197 - E9205. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705685114>) は、ヌクレオソームがゲノム内で再配置される様々な方法を説明している。特に、Lequieuらは、「ヌクレオソームの一方の側に導入され、その後、シャクトリムシのように (in an inchworm-like manner) ヒストンコアに沿って移動する」DNAループを説明するための分子モデルを開発する。Lequieuらは、これらのDNAループの位置が「DNA配列に感受性がない」ことを見出し、それらの分子モデルに基づいて、ヒストン上の位置によるDNAループの密度プロットを図6で実証する。この密度プロットは、図2に示される我々の密度の形状の多くを反映する。注目すべきことに、両方の密度は、同様の小さなモードのパターンを示す。これらループの導入により、エンドヌクレアーゼ酵素がリンカーヒストン内部のヌクレオソームDNAを切断する機会が得られる場合がある。例えば、ヌクレオソームDNAの末端にあるDNAループは、167bpよりわずかに短い断片の作製を可能にし得る。ヒストンに沿ってループが「少しずつ動く (inches)」ほど、得られる切断断片は短くなる。更に、DNAループによって再配置されているヌクレオソームは、リンカーヒストンで切断され得、167bpよりも長いcfDNA断片として現れ得る。

10

20

## 【0073】

Lequieu et al. に記載されている説明に基づいて、混合モデル内の成分の多くは、DNAループの位置及び安定性によって駆動され得る。この理解では、周期性及び断片サイズのカウント数が、DNAループのこれらの特徴を捉えることはできない。DNAループは、所与の試料におけるヒストン上の特定の位置でより頻度が高くなり得る。これは、混合割合に反映されるであろう。加えて、ループの安定性は、成分の分散を反映している可能性がある。

## 【0074】

ドナーのがんの状態を予測する混合モデルパラメータの能力を評価するために、係数を、Cristiano et al., (Cristiano, Stephen, Alessandro Leal, Jillian Phallen, Jacob Fiksel, Vilmos Adleff, Daniel C. Bruhm, Sarah Ostrop Jensen, et al. 2019. "Genome-Wide Cell-Free DNA Fragmentation in Patients with Cancer." *Nature* 570 (7761): 385 - 89. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>.) で説明されているのと同じアプローチで、機械学習モデルの特徴として使用した。要するに、ハイパーパラメータチューニングを行わない勾配ブースティングマシン (Gradient Boosting Machine) (Friedman, Jerome H. 2000. "Greedy Function Approximation: A Gradient Boosting Machine." *Annals of Statistics* 29: 1189 - 1232) の10分割10回反復交差検証を使用した。以下の特徴を使用した。

30

40

## 【0075】

1) 混合モデル係数: 12の平均、12の分散、及び12の混合割合で、混合モデルは十分に説明される。モデリングでは、他の11の割合の線形結合であるため、12番目の割合を除外する。35の特徴は、未変換であった。

## 【0076】

50



2) 短/長比: Cristiano et al.と同様に、ゲノムにわたる504個の相互に排他的な5MBピンにおけるGC含有量補正短(100~150bp)及び長(151~220bp)断片の数を算出し、試料によって中心化された、短断片のカウント数を長断片のカウント数で割った。

【0077】

3) 短/総カバレッジ: この比と同様に、短断片(100~150bp)及び総断片(100~220bp)のカバレッジを特徴として使用した。これらのカバレッジは、試料及び種類(短断片、総断片)によって、平均が0及び標準偏差が1になるように標準化する。

【0078】

これら3つの特徴セットを、GBMへの入力として個別に使用し、また、混合モデル係数と(2)及び(3)との組み合わせも使用した。表1に、95%及び98%の特異度でのROC曲線下面積(AUC)及び感度として、結果を報告する。

【0079】

(表1) がん検出の交差検証結果

特徴セット	AUC	感度(95%特異度)	感度(98%特異度)
短/長比	0.8902	0.5898	0.5146
短/総カバレッジ	0.9307	0.7670	0.6650
混合	0.9466	0.7330	0.6990
混合、比	0.9547	0.7621	0.7039
混合、カバレッジ	0.9737	0.8301	0.7573

10

20

【0080】

表1に示されるように、混合モデル係数のAUCは、がんの状態の強い予測因子を示す。高い特異度での感度が、早期がん検出のための有用性をより示している。混合モデル係数は、カバレッジパラメータよりも感度がわずかに低いが、2つを組み合わせると、AUC及び感度の両方の改善が示される。特徴の組み合わせの結果は、この断片サイズ密度の新規な要約が、がんの状態を判定するために他のゲノム特徴をどのように補完することができるかを実証する。

30

【0081】

図4には、これら5つのモデルのROC曲線をプロットした。これらの曲線は、特徴としての混合係数の特異度が高くても、また混合特徴とカバレッジ特徴とを組み合わせても感度が高いことを実証する。参照線は、95%及び98%の特異度を示す。

40

【0082】

実施例2

ジヌクレオソーム断片サイズ密度を用いたがんの検出

この実施例では、本開示の方法論を、がんを検出するために利用した。本明細書で考察されるように、ctDNA断片は、非腫瘍細胞由来の他のcfDNAよりも平均して短いことが示されている。これまでの研究では、異なるサイズ(例えば、短いもの及び長いもの、又は相互に排他的なサイズのセット)の断片をグループに分けること、これらのピンのカウント数を使用してctDNAを定量すること、及び/又は個々の試料を腫瘍が存在するもの/存在しないものに分類することが探索されてきた。

【0083】

50

本明細書で実証されるように、断片サイズ密度を分布の混合としてモデリングし得、そのパラメータはがんの状態を予測するものであり得る。これらのアプローチは全て、単一のヌクレオソームのサイズ（サイズが260bp未満）に密接に対応する断片サイズに焦点を当てている。これらは典型的には、147bpのDNAが巻き付いたヒストンオクターを含み）、H1ヒストン及びリンカーDNA（20bp）とともに、167bpサイズの主要なピークが観察される。

【0084】

本実施例に記載される研究は、334bpの中央値でピークをもたらす2つのヌクレオソームを含む可能性が高い低カバレッジの全ゲノム配列決定（1～2倍のカバレッジ）からの260bp未満のcfDNA断片の分析に焦点を当てている。

10

【0085】

方法

各試料について、断片の数は、各染色体アーム（末端動原体型染色体アームを除く）について260bp～440bpの塩基対によって決定する。アーム当たりのジヌクレオソーム断片の幅当たりの割合を算出した。所与のアームにおける全181個の断片サイズにわたるこれらの比は、合計で1である。この181個の割合のセットは、ジヌクレオソーム断片サイズ密度として定義される。各試料は、非末端動原体型染色体アームによって算出された39セットのジヌクレオソーム断片サイズ密度を有する。

【0086】

購入された排他的にがんを含まない48個の試料のセットにおいて、これらの断片サイズ密度を各アームについて算出し、39個の参照断片サイズ密度を表すように全ての試料にわたって集計した。

20

【0087】

データセット内の各試料について、所与の試料/アームと参照との類似性を、経験的試料/アームと参照/アームとの間のカルバック・ライブラー情報量を算出することによって決定した。更に、各染色体アームにおけるジヌクレオソーム断片の数を算出した。

【0088】

ドナーのがんの状態を予測するこれらジヌクレオソームパラメータの能力を評価するために、本発明者らは、Cristiano et al. (Cristiano et al. 2019. "Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer." Nature 570 (7761): 385-389)に記載されているのと同じアプローチを使用して、パラメータを機械学習モデルの特徴として使用する。要するに、ハイパーパラメータチューニングを行わない勾配ブースティングマシン (Gradient Boosting Machine) (Friedman, Jerome H. 2000. "Greedy Function Approximation: A Gradient Boosting Machine." Annals of Statistics 29: 1189-1232) の10分割10回反復交差検証を使用する。以下の特徴セットを使用した。

30

【0089】

1) ジヌクレオソーム: 本発明者らは、各試料/アームのサイズ割合と参照との間のカルバック・ライブラー情報量を算出した。アーム当たりのジヌクレオソームリード (260bp～440bp) の数も決定した。

40

【0090】

2) 短/総カバレッジ: Cristiano et al. (2019)と同様に、本発明者らは、ゲノムにわたる504個の相互に排他的な5MBピン中のGC含有量補正短 (100～150bp) 及び総 (100～220bp) 断片の数を算出した。これらのカバレッジは、試料及び種類 (短断片、総断片) によって、平均が0及び標準偏差が1になるように標準化する。

【0091】

これら2つの特徴セットを、GBMへの入力として個別に使用し、これら2つの特徴の

50

組み合わせも使用した。以下の表 2 に、95% 及び 98% の特異度での ROC 曲線下面積 (AUC) 及び感度として、結果を報告する。

【0092】

結果

図 5 において、DNA リード量によって正規化されたがんを有する個体及びがんを有しない個体による平均断片サイズ密度を 260 bp ~ 440 bp の間でプロットする。

【0093】

図 5 に見られるように、平均して、がんを含まない個体は、ジヌクレオソーム範囲でより長い cfDNA 断片 (平均サイズ: 334.75 bp) を有するのに対し、がん患者は、より短い cfDNA 断片 (平均サイズ: 329.6 bp) を有することが明らかである。いくつかの研究は、単ヌクレオソーム cfDNA に焦点を当てており、がんを有する個体における平均 260 bp 未満の cfDNA 断片が、がんを有しない個体よりも短いことを示している。しかしながら、これらの取り組みでは、がん患者又は健常な個体におけるジヌクレオソーム cfDNA のサイズ分布 (260 bp 未満のサイズ) は評価されなかった。

10

【0094】

本発明者らは、334 bp のピークが、ジヌクレオソーム、すなわち H1 とリンカー DNA とが結合した 2 つの隣接するヌクレオソームを表し、各々が 167 bp の DNA を包含すると予想する。典型的には、ヌクレオソーム間に追加のリンカー DNA が存在することを考えると、この仮説を支持するためには、一方又は両方のヌクレオソームの再配置が必要となる。1 つの研究は、原子間力顕微鏡 (ATM) を使用して、ヌクレオソームが、図 6 に示されるように、RSC (クロマチン構造リモデリング) 複合体によってそのような方法で再配置され得ることを実証した。特定された 5 つの状態のうち、最も安定な状態 (#4) のうちの 1 つは、裸の DNA の末端に直接隣接するヌクレオソームを表し、切断は、この構成の 5' 及び 3' 末端で生じ得る。リモデリングは、DNA の長さとは無関係である。

20

【0095】

ATM を用いて観察されたヌクレオソーム構成に基づいて、データ内でより低い頻度 (260 bp ~ 334 bp の間) で観察されたより小型の ctDNA 断片は、ヌクレオソームの片側での切断、及び隣接するヌクレオソームまでの異なる位置での介在リンカー DNA の更なるエンドヌクレアーゼ消化を表し得る (図 7; 状態 2 又は 5)。より大型の断片 (334 bp ~ 440 bp) は、2 つの隣接するモノヌクレオソームの外側のリンカー DNA に作用するエンドヌクレアーゼから生じ得る (図 7; 状態 1、3 又は 4)。

30

【0096】

この複合体は、高度に発現された遺伝子で濃縮されるため、ジヌクレオソーム形成は、RSC とのそれらの結合に基づいてプロモーター領域に連結され得る。酵母モデルを使用するデータはまた、RSC によるヌクレオソームのスライド化、DNA の解明、及び経路に沿ったヒストンオクタマーの排出のモデルに適合するプロモーター活性化時に、ヌクレオソームのうちの一つを除く全てが除去され、プロセスの終了時に RSC に結合した単一ヌクレオソームのみが残ることを実証した。RSC レベルが欠失した酵母モデルにおいて ChIP-Seq を使用した追加のデータは、転写開始部位 (TSS) の上流及び下流のヒストンが増加したことを示した。まとめると、これらのデータは、NDR (ヌクレオソーム欠失領域) 内でのヌクレオソーム除去及び転写調節時の RSC 介在性再配置を含む。

40

【0097】

図 8 において、各試料についての染色体アーム 1 p におけるジヌクレオソーム断片サイズ密度を青色で、各試料種類についての断片サイズ密度中央値を黒色で、及び参照をオレンジ色でプロットする。図 8 から、ステージ 4 のがんからの試料は、ステージ 1 ~ 3 の試料よりも参照との類似性が低いことが明らかである。特に、ステージ 4 ではステージ 1 ~ 3 のがんと比較して、かつ、ステージ 1 ~ 3 のがんではがんを有しない場合と比較して、ジヌクレオソーム断片サイズ密度がより歪み、断片全体がより短くなることが明らかである。

50

る。

【0098】

表2は、無細胞DNAから抽出されたこの新規なゲノム特徴を使用して、がんを有する個体をがんを有しない個体から区別する機械学習モデルの能力を例示する。ジヌクレオソーム係数を用いた機械学習モデルのAUCは、がんの状態の強い予測因子を示す。高い特異度での感度が、早期がん検出のための有用性をより示している。2つの特徴を組み合わせると、最良の特徴と同等か、それよりも良好なAUC及び感度が示される。特徴の組み合わせの結果は、この断片サイズ密度の新規な要約が、がんの状態を判定するために他のゲノム特徴をどのように補完することができるかを実証する。

【0099】

(表2) アーム当たりのジヌクレオソーム参照からのダイバージェンスを使用したがん検出の交差検証結果

特徴セット	AUC	感度(95%特異度)	感度(98%特異度)
短/総カバレッジ	0.7963	0.5342	0.5205
ジヌクレオソーム	0.8493	0.6164	0.4931
ジヌクレオソーム、カバレッジ	0.8847	0.6164	0.5890

10

【0100】

図9は、これら3つのモデルのROC曲線を示す。これらの曲線は、特徴としてのジヌクレオソーム係数の特異度が高くても、またジヌクレオソーム特徴とカバレッジ特徴とを組み合わせても感度が高いことを実証する。参照線は、90%、95%及び98%の特異度を示す。

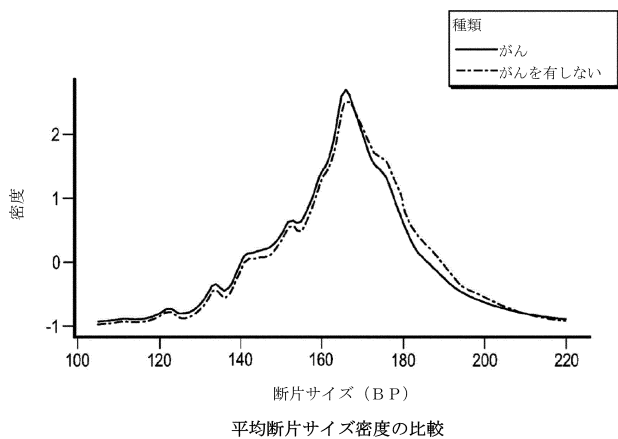
20

【0101】

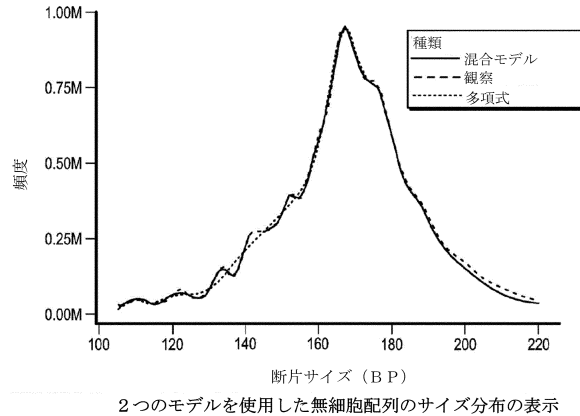
本発明は、上記の実施例を参照して説明されているが、変更及び変形は、本発明の趣旨及び範囲内に包含されることが理解されよう。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

【図面】

【図1】



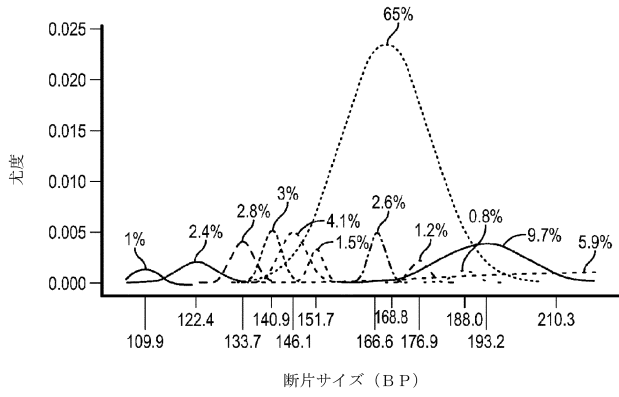
【図2】



30

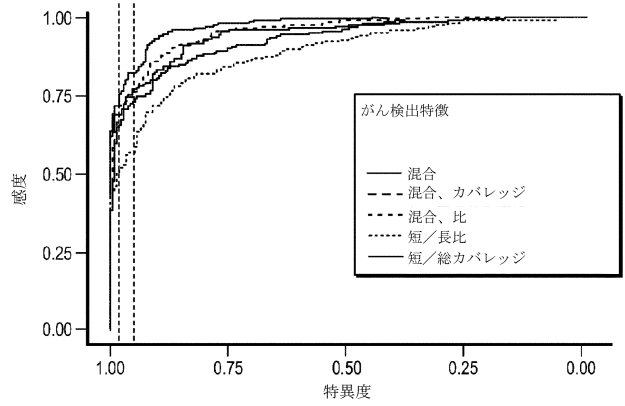
40

【 図 3 】



1つの試料からの混合モデル成分

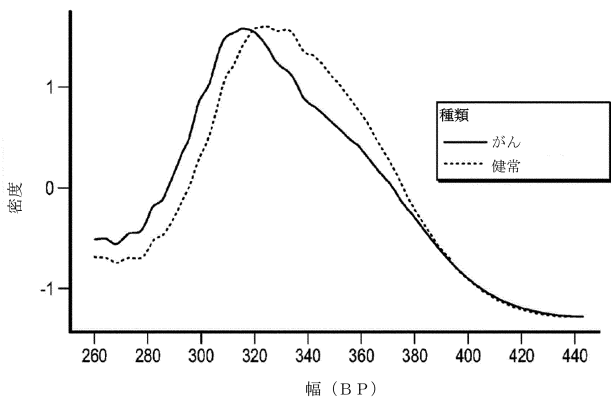
【 図 4 】



平均断片サイズ密度の比較

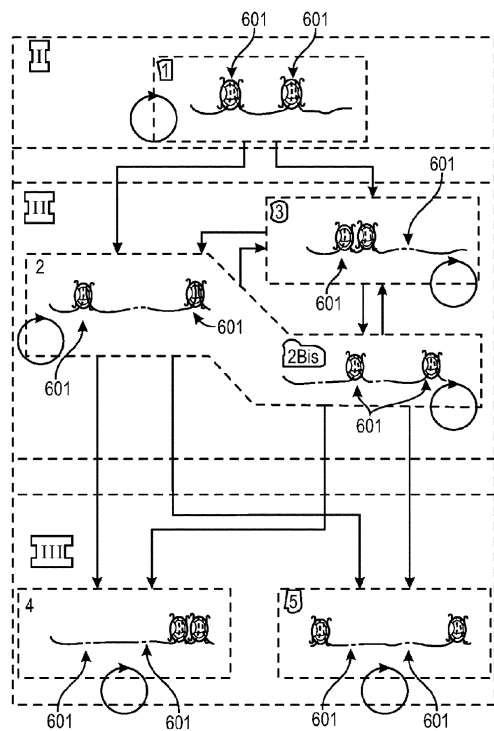
10

【 図 5 】



健常な個体及びがん患者における > 260 bp サイズの cfDNA の平均断片サイズ密度の比較

【 図 6 】



ジヌクレオソームのRSCスライド化によって生成される様々な状態を示す動態スキーム

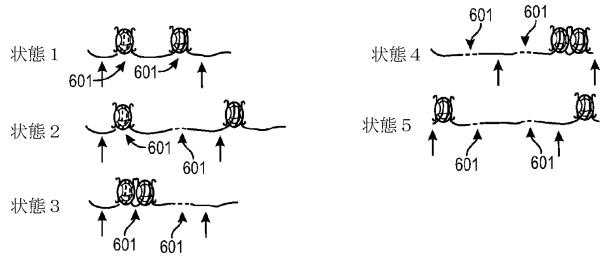
20

30

40

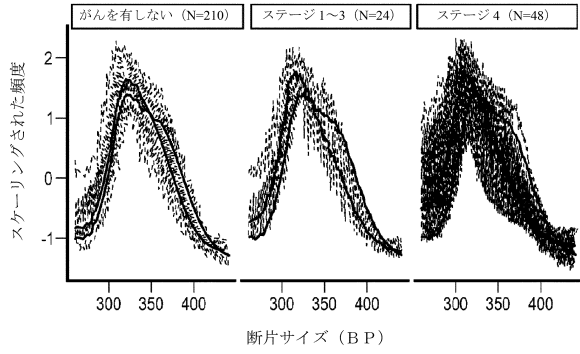
50

【 図 7 】



様々な断片サイズをもたらす潜在的なエンドヌクレアーゼ切断部位の例。  
 状態ごとに2つの部位のみが示されているが、切断は、リンカーDNAにおける複数の異なる位置で生じ得る。

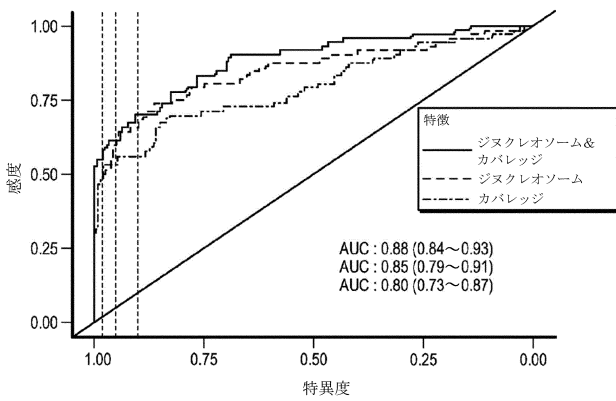
【 図 8 】



10

染色体アーム1pにおいて上記で実証した、進行がんの非がん参照との類似性が低くなることを示す図。

【 図 9 】



異なる特徴を使用したモデルのROC曲線

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/046272

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC(B) - C12Q 1/68; G16B 20/00; G16B 20/10; G16B 40/00; G16B 40/20 (2021.01)  
CPC - C12Q 1/6886; G16B 20/00; G16B 40/00; G16B 40/20 (2021.08)

10

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)

see Search History document

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

see Search History document

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

see Search History document

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

20

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CRISTIANO et al. "Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer," Nature, 29 May 2019 (29.05.2019), Vol. 570, No. 7761, Pgs. 1-35, entire document	1-5
X	US 2018/0208999 A1 (THE CHINESE UNIVERSITY OF HONG KONG OFFICE OF RESEARCH AND KNOWLEDGE TRANSFER SERVICES et al) 26 July 2018 (26.07.2018) entire document	1, 2, 6, 9, 10, 12
X	US 2019/0287645 A1 (GUARDANT HEALTH INC.) 19 September 2019 (19.09.2019) entire document	64-67
A	US 2017/0002072 A1 (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 05 January 2017 (05.01.2017) entire document	1-6, 9, 10, 12, 64-67
A	WO 2019/169042 A1 (CORNELL UNIVERSITY et al) 06 September 2019 (06.09.2019) entire document	1-6, 9, 10, 12, 64-67

30

Further documents are listed in the continuation of Box C.  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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

40

Date of the actual completion of the international search 21 December 2021	Date of mailing of the international search report <b>JAN 28 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer <b>Hany Kim</b> Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/048272

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3.  Claims Nos.: 62, 63, 106-108  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
See extra sheet(s).

- 1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-6, 9, 10, 12, 64-67.

30

40

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/046272

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-61, and 64-105 are drawn to methods and systems that utilize analysis of cell-free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from a patient to diagnose and predict cancer status.

10

The first invention of Group I+ is restricted to a method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject. It is believed that claims 1-6, 9, 10, 12, and 64-67 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on the method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject.

Applicant is invited to elect additional methods and/or systems to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be a method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject; and (b) administering a cancer treatment to the subject, and further comprising characterizing the components by statistical parameters and contribution to the overall mixture, the statistical parameters comprising mean, variance or shape. Additional methods and/or systems will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

20

The inventions listed in Groups I+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for diagnosing and predicting cancer status requiring the selection of alternative methods where "A method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject," and "A method of predicting cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from the subject; (b) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and (c) detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape, thereby predicting the cancer status of the subject," and "A method of treating cancer in a subject comprising: (a) detecting cancer in the subject, wherein said detecting cancer comprises analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape; and (b) administering to the subject a cancer treatment, thereby treating cancer in the subject," and "A method of monitoring cancer in a subject comprising: (a) determining cancer status in the subject, wherein the cancer status is determined by analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a first sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample is different from the reference curve shape; (b) administering a cancer treatment to the subject; (c) determining a shape of a curve of cfDNA fragment size density of a second sample obtained from the subject; and (d) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the second sample to the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample and/or to the reference curve shape, thereby monitoring cancer in the subject," and "A system comprising: (a) a sequencer configured to generate a low-coverage whole genome sequencing data set for a sample; and (b) a computer system having a non-transitory computer readable medium with instructions to: (i) process the low-coverage whole genome sequencing data set to produce a curve of fragment size density of the sample; (ii) fit the curve of fragment size density of the sample to at least two different sets of established statistical parameters to produce at least two suggested curve fits; (iii) display the at least two suggested curve fits, enabling a user to select at least one of said at least two suggested curve fits for further processing; and (iv) display a suggested curve fit line corresponding to a selected suggested curve fit of (iii) together with a reference curve fit line, enabling a comparison between the selected suggested curve fit line and the reference curve fit line," and "A method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject," and "A method of predicting cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample obtained from the subject; (b) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and (c) detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape, thereby predicting the cancer status of the subject," and "A method of treating cancer in a subject comprising: (a) detecting cancer in the subject, wherein said detecting cancer comprises analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape; and (b) administering to the subject a cancer treatment, thereby treating cancer in the subject," and "A method of monitoring cancer in a subject comprising: (a) determining cancer status in the subject, wherein the cancer status is determined by analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a first sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample is different from the reference curve shape; (b) administering a cancer treatment to the subject; (c) determining a shape of a curve of cfDNA fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a second sample obtained from the subject; and (d) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the second sample to the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample and/or to the

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/046272

reference curve shape, thereby monitoring cancer in the subject."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject," and "A method of predicting cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from the subject; (b) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and (c) detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape, thereby predicting the cancer status of the subject, and a method of treating cancer in a subject comprising: (a) detecting cancer in the subject, wherein said detecting cancer comprises analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape; and (b) administering to the subject a cancer treatment, thereby treating cancer in the subject, and a method of monitoring cancer in a subject comprising: (a) determining cancer status in the subject, wherein the cancer status is determined by analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a first sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample is different from the reference curve shape; (b) administering a cancer treatment to the subject; (c) determining a shape of a curve of cfDNA fragment size density of a second sample obtained from the subject; and (d) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the second sample to the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample and/or to the reference curve shape, thereby monitoring cancer in the subject, and a system comprising: (a) a sequencer configured to generate a low-coverage whole genome sequencing data set for a sample; and (b) a computer system having a non-transitory computer readable medium with instructions to: (i) process the low-coverage whole genome sequencing data set to produce a curve of fragment size density of the sample; (ii) fit the curve of fragment size density of the sample to at least two different sets of established statistical parameters to produce at least two suggested curve fits; (iii) display the at least two suggested curve fits, enabling a user to select at least one of said at least two suggested curve fits for further processing; and (iv) display a suggested curve fit line corresponding to a selected suggested curve fit of (iii) together with a reference curve fit line, enabling a comparison between the selected suggested curve fit line and the reference curve fit line, and a method of determining the cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample from a subject, wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject, and a method of predicting cancer status of a subject comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample obtained from the subject; (b) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and (c) detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape, thereby predicting the cancer status of the subject, and a method of treating cancer in a subject comprising: (a) detecting cancer in the subject, wherein said detecting cancer comprises analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from the reference curve shape; and (b) administering to the subject a cancer treatment, thereby treating cancer in the subject, and a method of monitoring cancer in a subject comprising: (a) determining cancer status in the subject, wherein the cancer status is determined by analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a first sample obtained from the subject; comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample to a reference curve shape; and detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample is different from the reference curve shape; (b) administering a cancer treatment to the subject; (c) determining a shape of a curve of cfDNA fragment size density of dinucleosomal DNA fragments in a second sample obtained from the subject; and (d) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the second sample to the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample and/or to the reference curve shape, thereby monitoring cancer in the subject. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

10

20

30

Specifically, US 2018/0208999 A1 to The Chinese University Of Hong Kong Office Of Research And Knowledge Transfer Services et al. discloses a method of determining the cancer status of a subject (a method of present disclosure can determine if a subject has cancer ... a method of the present disclosure may be used to determine a stage of cancer in a subject, or the progression of cancer in a subject over time (e.g., using samples obtained from a subject at different times), Para. [0003]) comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample from a subject (analysis of the count, the fragmentation patterns, and size of cell-free nucleic acids, e.g., plasma DNA and serum DNA, Para. [0003]; provided at least one of the three parameters (e.g., sensitivity, specificity, and the threshold setting), and ROC curve may determine the value or expected value for any unknown parameter, Para. [0097]; a method of present disclosure can determine if a subject has cancer ... a method of the present disclosure may be used to determine a stage of cancer in a subject, or the progression of cancer in a subject over time (e.g., using samples obtained from a subject at different times), Para. [0003]), wherein a difference in the shape of the curve of cfDNA from the subject and that from a reference sample of a healthy subject, is indicative of cancer in the subject (the difference in range of abundance of plasma HPV DNA sequences in a sample can be reflective of the stage of the HPV-related cancer. Additionally, the difference in the order of magnitude of the plasma HPV DNA sequences can be reflective of cancers of different tissue origin, Para. [0179]; [t]he increased probability can be compared between the pathological state and a non-pathological state, for example in patients with and without a cancer and quantified as likelihood ratio or relative probability. The likelihood ratio can be determined based on the probability of detecting at least a threshold number of preferred ends in the tested sample or based on the probability of detecting the preferred ends in patients with such a condition than patients without such a condition, Para. [0087]); a method of predicting cancer status of a subject (a method of present disclosure can determine if a subject has cancer, Para. [0003]; the achieved accuracy in discriminating between samples of a set can include: a positive predictive value (PPV) of the determining the level of pathology is at least 6 percent, 7 percent, or 8 percent, wherein a sensitivity of the determining the level of pathology, Para. [0265]) comprising: (a) analyzing a shape of a curve of cell free DNA (cfDNA) fragment size density in a sample obtained from the subject (analysis of the count, the fragmentation patterns, and size of cell-free nucleic acids, e.g., plasma DNA and serum DNA, Para. [0003]; provided at least one of the three parameters (e.g., sensitivity, specificity, and the threshold setting), and ROC curve may determine the value or expected value for any unknown parameter, Para. [0097]; a method of present disclosure can determine if a subject has cancer ... a method of the present disclosure may be used to determine a stage of cancer in a subject, or the progression of cancer in a subject over time (e.g., using samples obtained from a subject at different times), Para. [0003]) (b) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample to a reference curve shape; and (c) detecting cancer in the subject when the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the sample is different from

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2021/046272

the reference curve shape, thereby predicting the cancer status of the subject (the difference in range of abundance of plasma HPV DNA sequences in a sample can be reflective of the stage of the HPV-related cancer. Additionally, the difference in the order of magnitude of the plasma HPV DNA sequences can be reflective of cancers of different tissue origin, Para. [0179]; [t]he increased probability can be compared between the pathological state and a non-pathological state, for example in patients with and without a cancer and quantified as likelihood ratio or relative probability. The likelihood ratio can be determined based on the probability of detecting at least a threshold number of preferred ends in the tested sample or based on the probability of detecting the preferred ends in patients with such a condition than patients without such a condition, Para. [0087]); a method of monitoring cancer in a subject (screening can check if cancer is present in someone who is not known previously to have cancer. Assessment can investigate someone who has been diagnosed with cancer to monitor the progress of cancer over time, study the effectiveness of therapies or to determine the prognosis, Para. [0077]) comprising: (c) determining a shape of a curve of cfDNA fragment size density of a second sample obtained from the subject (first sample that end on the position normalized against a number of nucleic acid molecules from a second sample (e.g., a reference sample) that end on the position. As yet another example, the rate may be based on a number of nucleic acid molecules from a first sample that end on a first set of positions (e.g., genomic positions within one or more first windows) normalized against a number of nucleic acid molecules from a second sample (e.g., a reference sample) that end on a second set of positions, Para. [0089]); and (d) comparing the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the second sample to the shape of the curve of cfDNA fragment size density of the first sample and/or to the reference curve shape, thereby monitoring cancer in the subject (analysis of the count, the fragmentation patterns, and size of cell-free nucleic acids, e.g., plasma DNA and serum DNA, Para. [0003]; provided at least one of the three parameters (e.g., sensitivity, specificity, and the threshold setting), and ROC curve may determine the value or expected value for any unknown parameter, Para. 0097); a method of present disclosure can determine if a subject has cancer ... a method of the present disclosure may be used to determine a stage of cancer in a subject, or the progression of cancer in a subject over time (e.g., using samples obtained from a subject at different times), Para. [0003]; first sample that end on the position normalized against a number of nucleic acid molecules from a second sample, Para. [0089]).

10

Further, US 2017/0002072 A1 to The Trustees Of The University Of Pennsylvania teaches a method of treating cancer in a subject (a method for treating ovarian cancer in a subject, Para. [0028]); (b) administering to the subject a cancer treatment, thereby treating cancer in the subject (administering to the subject an effective amount of a genetically modified T cell ... thereby treating the ovarian cancer in the subject, Para. [0028]).

20

Further, WO 2019/169042 A1 to Cornell University et al. teaches a system (a system for genetic screening a subject for cancer is provided, Para. [0017]) comprising: (a) a sequencer configured to generate a low-coverage whole genome sequencing data set for a sample (sequencing processing, Para. [0017]; he features comprising a median depth coverage per window and a representative fragment size per window ... arranged to normalize the compendium of reads to produce a filtered read set for the genome-wide compendium of reads, Para. [0018]); and (b) a computer system having a non-transitory computer readable medium with instructions (computer readable medium comprising computer-executable instructions, which, when executed by a processor, cause the processor to carry out a method or a set of steps, Para. [0038]; non-transitory computer-readable medium can be provided in which a first program is stored for causing a computer to perform the disclosed methods, Para. [00272]) to: (i) process the low-coverage whole genome sequencing data set to produce a curve of fragment size density of the sample (a system of components integrated to perform the methods described. For example, the workflow of FIG. 1A can be provided as a system of components or stations for identifying high-quality low-abundance, tumor-specific markers present in cfDNA of cancer patients, Para. [00273]; whole genome-sequencing data from lung patients with variable fraction of tumor reads, Para. [0013]; he artefactual noise-removing engine is configured to implement an optimal receiver operating characteristic (ROC) curve which comprises a probabilistic classification of the reads in the compendium based on base-quality (BQ) score of the read; mapping-quality (MQ) score of the read; fragment size of the read; or variable allele frequency (VAF) of the read, Para. [0044]); (ii) fit the curve of fragment size density of the sample to at least two different sets of established statistical parameters to produce at least two suggested curve fits ([o]ther parameters such as (5) position in the read (RP); (6) sequence context (SC); (7) abundance; (8) sequencing depth and/or (9) sequencing error may also be used. The noise removal step 120 can comprise implementing an optimal receiver operating characteristic (ROC) curve which comprises a probabilistic classification of the genetic markers in the compendium based on a joint base-quality (BQ) and mapping-quality (MQ) score. Typically, the joint BQMQ score is provided as a matrix (x, y), wherein x is the BQ score and y is the MQ score. In exemplary embodiments, a joint BQMQ score between 10 and 50 (for each parameter) is typically employed, Para. [00144]); (iii) display the at least two suggested curve fits, enabling a user to select at least one of said at least two suggested curve fits for further processing ([o]ther parameters such as (5) position in the read (RP); (6) sequence context (SC); (7) abundance; (8) sequencing depth and/or (9) sequencing error may also be used. The noise removal step 120 can comprise implementing an optimal receiver operating characteristic (ROC) curve which comprises a probabilistic classification of the genetic markers in the compendium based on a joint base-quality (BQ) and mapping-quality (MQ) score. Typically, the joint BQMQ score is provided as a matrix (x, y), wherein x is the BQ score and y is the MQ score. In exemplary embodiments, a joint BQMQ score between 10 and 50 (for each parameter) is typically employed, Para. [00144]); and (iv) display a suggested curve fit line corresponding to a selected suggested curve fit of (iii) together with a reference curve fit line, enabling a comparison between the selected suggested curve fit line and the reference curve fit line ([o]ther parameters such as (5) position in the read (RP); (6) sequence context (SC); (7) abundance; (8) sequencing depth and/or (9) sequencing error may also be used. The noise removal step 120 can comprise implementing an optimal receiver operating characteristic (ROC) curve which comprises a probabilistic classification of the genetic markers in the compendium based on a joint base-quality (BQ) and mapping-quality (MQ) score. Typically, the joint BQMQ score is provided as a matrix (x, y), wherein x is the BQ score and y is the MQ score. In exemplary embodiments, a joint BQMQ score between 10 and 50 (for each parameter) is typically employed, Para. [00144]).

30

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

40

## フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 Q 1/6869(2018.01) C 1 2 Q 1/6869 Z

,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,D  
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O  
 A(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,B  
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD  
 ,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,  
 LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,  
 RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,Z  
 W

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 キャリー ジェイコブ

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド州 ボルチモア ウエスト トウェンティナインス スト  
 リート 3 0 1 デルフィ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ドラコポリ ニコラス シー .

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド州 ボルチモア ウエスト トウェンティナインス スト  
 リート 3 0 1 デルフィ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ジョーンズ シアン

アメリカ合衆国 2 1 2 1 1 メリーランド州 ボルチモア ウエスト トウェンティナインス スト  
 リート 3 0 1 デルフィ ダイアグノスティックス インコーポレイテッド内

F ターム (参考) 2G045 AA26 CB02 DA13 FB02

4B029 AA07 BB20 FA12

4B063 QA13 QA19 QQ42

4C084 AA17 NA20 ZB26