



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110945136 A

(43)申请公布日 2020.03.31

(21)申请号 201880048495.1

(22)申请日 2018.06.20

(30)优先权数据

62/522,533 2017.06.20 US

62/572,556 2017.10.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2020.01.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/038598 2018.06.20

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/237075 EN 2018.12.27

(71)申请人 威斯康星州立大学医学院

地址 美国威斯康星州

(72)发明人 青·富田·米切尔

迈克尔·米切尔

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 尹玉峰

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68(2018.01)

C12Q 1/6809(2018.01)

C12Q 1/6883(2018.01)

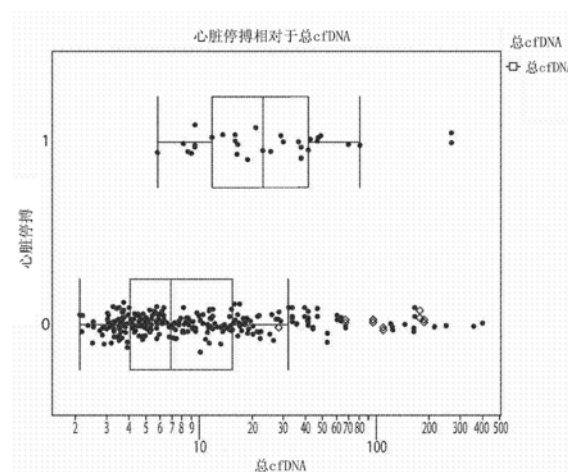
权利要求书3页 说明书17页 附图19页

(54)发明名称

使用总无细胞DNA评估移植并发症风险

(57)摘要

本发明涉及用于评价例如来自移植对象的总无细胞DNA的量的方法和组合物。本文中提供的方法和组合物可用于确定经移植后的对象中并发症的风险,所述并发症包括感染、心脏停搏和死亡。



1. 评价来自移植对象的样品的方法,所述方法包括:
  - (a) 确定来自所述对象的样品中总cf-DNA的量,其中所述对象患有、怀疑患有、曾经患有移植并发症或处在患有移植并发症之风险中;以及
  - (b) 报告和/或记录总cf-DNA的量。
2. 权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括:
  - (c) 将所述总cf-DNA的量与阈值总cf-DNA值或至少一个先前的总cf-DNA量进行比较。
3. 权利要求1或2所述的方法,其中所述方法还包括:
  - (d) 基于与阈值总cf-DNA值和/或至少一个先前的总cf-DNA量相比较的所确定的总cf-DNA的量,确定对象患有移植并发症或处在患有移植并发症之提高的风险中。
4. 评价移植对象的方法,所述方法包括:
  - (a) 获得来自所述对象的样品中总cf-DNA的量,其中所述对象患有、怀疑患有、曾经患有移植并发症或处在患有移植并发症之风险中;
  - (b) 将所述总cf-DNA的量与阈值总cf-DNA值和/或至少一个先前的总cf-DNA量进行比较;以及
  - (c) 基于与阈值总cf-DNA值和/或至少一个先前的总cf-DNA量相比较的所确定的总cf-DNA的量,确定针对所述对象的治疗或监测方案。
5. 权利要求4所述的方法,其中所述方法还包括基于与阈值总cf-DNA值和/或至少一个先前的总cf-DNA量相比较的所确定的总cf-DNA的量,将所述对象分类为患有移植并发症或处于患有移植并发症之提高的风险中。
6. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述对象需要机械支持。
7. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述对象已被确定为患有移植并发症。
8. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中借助于先前被施加至所述对象的一种或更多种额外测试,所述对象被确定为患有所述移植并发症,或者所述方法还包括对所述对象进行一种或更多种额外测试。
9. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述评价或确定在不确定或比较供体特异性cf-DNA的量的情况下进行。
10. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述移植并发症是心脏停搏、感染或死亡。
11. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述总cf-DNA量在报告中提供。
12. 权利要求11所述的方法,其中所述量在报告中提供,所述报告还包含至少一个来自所述对象的样品中的先前总cf-DNA的量。
13. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述总cf-DNA量被记录在数据库中。
14. 权利要求13所述的方法,其中所述数据库还包含至少一个来自所述对象的样品中的先前总cf-DNA的量。
15. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过以下步骤确定或获得所述总cf-DNA的量:
  - (a) 对于多种单核苷酸变体 (SNV) 靶标,使用至少两种引物对对样品或其部分进行基于扩增的定量测定,例如聚合酶链式反应 (PCR) 定量测定,其中每种引物对包含正向引物和反向引物,其中所述至少两种引物对中的一种在引物中包含相对于所述SNV靶标之一等位

基因的3' 倒数第二位错配,但包含相对于所述SNV靶标之另一个等位基因的3' 双错配,并且特异性地扩增所述SNV靶标之所述一个等位基因,并且所述至少两种引物对中的另一种特异性地扩增所述SNV靶标之另一个等位基因,以及(b) 基于所述结果评价总cf-DNA的量。

16. 权利要求15所述的方法,其中所述供体的基因型是已知的。

17. 权利要求15所述的方法,其中所述供体的基因型是未知的。

18. 权利要求1至14中任一项所述的方法,其中使用基于扩增的定量测定确定或获得总cf-DNA的量。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述基于扩增的定量测定是定量实时PCR(qRT-PCR)。

20. 权利要求1至14中任一项所述的方法,其中使用测序来确定或获得总cf-DNA的量,所述测序是例如高通量测序或下一代测序。

21. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中8或9ng/mL或更大的量表示心脏停搏或死亡的风险。

22. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中20ng/mL或更大的量表示感染的存在或感染的风险提高。

23. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中在器官移植后的4、5、6、7或8天内,在取自所述对象的样品中确定至少一个量。

24. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中总cf-DNA的量大于所述阈值和/或相对于来自较早的时间点的量提高,则表示风险提高或正在提高。

25. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中总cf-DNA的量低于所述阈值和/或相对于来自较早的时间点的量降低,则表示风险降低或正在降低。

26. 权利要求4至25中任一项所述的方法,其中确定监测方案包括适时地确定所述对象体内随时间推移的或在随后的时间点处的总cf-DNA的量,或向所述对象建议这样的监测。

27. 权利要求26所述的方法,其中所述对象每月或每两个月评价一次。

28. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中对所述对象评价长达6个月,长达8个月,长达10个月或长达一年。

29. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中如果总cf-DNA的量相对于所述阈值或来自较早的时间点的量提高,则减少取样之间的时间。

30. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中记录或报告了总cf-DNA的附加量。

31. 权利要求30所述的方法,其中所述附加量在报告中提供。

32. 权利要求30所述的方法,其中所述附加量被记录在数据库中。

33. 权利要求4至32中任一项所述的方法,其中确定监测方案包括使用或建议使用一种或更多种额外测试来评价所述对象。

34. 权利要求4至33中任一项所述的方法,其中确定治疗方案包括选择或建议针对所述对象的治疗。

35. 权利要求4至34中任一项所述的方法,其中确定治疗方案包括治疗所述对象。

36. 权利要求4至35中任一项所述的方法,其中所述治疗包括本文中提供的任一种治疗。

37. 权利要求4至36中任一项所述的方法,其中确定治疗方案包括向所述对象提供关于治疗的信息。

38. 权利要求4至37中任一项所述的方法,其中所述治疗是抗感染的治疗。
39. 权利要求4至37中任一项所述的方法,其中所述治疗是抗排斥治疗。
40. 权利要求4至37中任一项所述的方法,其中所述治疗是心脏停搏治疗。
41. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品是血液、血浆或血清样品。
42. 权利要求41所述的方法,其中所述血液样品是血浆样品。
43. 前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述移植对象是心脏移植对象。

## 使用总无细胞DNA评估移植并发症风险

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119要求于2017年6月20日提交的美国临时申请No. 62/522,533和2017年10月15日提交的美国临时申请No. 62/572,556的优先权,其各自的全部内容均通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及用于评价来自移植对象的样品中的总无细胞核酸的量的方法和组合物。这样的量可以用于确定与移植相关的一种或更多种并发症的风险。本发明还涉及使用例如多路复用优化的错配扩增(multiplexed optimized mismatch amplification, MOMA)的测定和/或测序技术来评价总无细胞脱氧核糖核酸(cell-free deoxyribonucleic acid, cf-DNA)量的方法和组合物,以评价移植并发症的风险。

### 发明内容

[0004] 本公开内容至少部分基于以下出乎意料的发现,即移植(例如器官移植)后并发症的风险与总无细胞DNA的量相关。使用多种方法中的任一种来量化样品中的总无细胞DNA,可确定移植并发症的风险以及随时间推移对其进行监测,所述并发症包括感染、心脏停搏(cardiac arrest)和死亡。

[0005] 本文中提供了与这种确定相关的方法、组合物和试剂盒。所述方法、组合物或试剂盒可以分别是本文中提供的方法、组合物或试剂盒中的任一种,包括实施例或附图中的那些中的任一种。

[0006] 在所提供的任一种方法的一个实施方案中,该方法还包括从对象获得样品。

[0007] 在一个实施方案中,本文中提供的方法的任一个实施方案可以是所提供的组合物、试剂盒或报告中的任一种的实施方案。在一个实施方案中,本文中提供的组合物、试剂盒或报告的任一个实施方案可以是本文中提供的任一种方法的实施方案。

[0008] 在一个方面中,提供了包含本文中提供的一个或多个量的报告或数据库。

[0009] 在一个方面中,提供了本文中提供的任一种方法。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,指示特定风险或并发症的量是本文中所述的截止点或其范围中的任一种。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,获得样品的时间是本文描述的任一种时间。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,所述对象是本文中所述的任一个对象。

[0010] 在一个方面中,提供了基于总无细胞DNA的量或本文中提供的任一种分析方法来治疗对象、确定针对对象的治疗方案或向对象提供有关治疗的信息的方法。在任一种这样的方法的一个实施方案中,该方法包括治疗对象或向对象提供有关治疗的信息的步骤。在任一种治疗方法的一个实施方案中,所述治疗可以是本文中提供的任一种治疗。在任一种治疗方法的一个实施方案中,所述治疗针对本文中提供的任一种病症。本文中提供了其一些实例,或者在其他情况下本领域普通技术人员已知晓其一些实例。

[0011] 在一个方面中,本文中提供的任一种方法可以是治疗移植对象(例如心脏移植对象)的方法。

#### 附图说明

[0012] 附图不旨在按比例绘制。附图仅是举例说明性的,而不是实现本公开内容所必需的。

[0013] 图1提供了MOMA引物的示例性的非限制性图。在聚合酶链式反应(PCR)测定中,预期发生包含SNV A的序列的延伸,导致检出SNV A,其可随后被量化。然而,由于双错配而预期不发生SNV B的延伸。

[0014] 图2示出了可借助于其操作一些实施方案的计算机系统的实例。

[0015] 图3是描述不同样品的总无细胞DNA(cf-DNA)以及在取样时对象是否接受感染的治疗的图。

[0016] 图4是描述不同样品的总无细胞DNA(cf-DNA)以及每个对象是否进入心脏停搏(1)或没有进入心脏停搏(0)的图。

[0017] 图5是描述不同样品的总无细胞DNA(cf-DNA)以及每个对象死亡(1)还是存活(0)的图。

[0018] 图6是示出使用来自每个对象的最终样品对感染的截止点(cutpoint)(阈值)进行实验确定的图(N=88)。

[0019] 图7是示出使用总cf-DNA并排除那些借助机械支持的对象对感染的截止点(阈值)进行实验确定的图(N=292)。

[0020] 图8是示出使用来自298个样品的总cf-DNA对心脏停搏的截止点(阈值)进行实验确定的图。

[0021] 图9是示出使用来自292个样品的总cf-DNA对心脏停搏的截止点(阈值)进行实验确定的图。从分析中排除了来自借助机械支持的对象样品。

[0022] 图10是示出使用来自298个样品的总cf-DNA对死亡的截止点(阈值)进行实验确定的图。

[0023] 图11是示出使用总cf-DNA对死亡的截止点(阈值)进行实验确定的图。从分析中排除了来自借助机械支持的对象样品。

[0024] 图12是示出使用来自每个对象的最终样品的总cf-DNA对死亡的截止点(阈值)进行实验确定的图(N=88)。

[0025] 图13是示出使用来自298个样品的总cf-DNA对感染的截止点(阈值)进行实验确定的图。

[0026] 图14是示出使用来自每个对象的最终样品的总cf-DNA对心脏停搏的截止点(阈值)进行实验确定的图(N=88)。

[0027] 图15是示出使用来自85个样品的总cf-DNA对死亡的截止点(阈值)进行实验确定的表。

[0028] 图16是图15的结果的图形表示,其示出了使用来自85个样品的总cf-DNA对死亡的截止点(阈值)进行实验确定。

[0029] 图17是示出了使用来自85个样品的总cf-DNA对心脏停搏的截止点(阈值)进行实

验确定的表。

[0030] 图18是图17的结果的图形表示,其示出了使用来自85个样品的总cf-DNA对心脏停搏的截止点(阈值)进行实验确定。

[0031] 图19是示出使用来自292个样品的总cf-DNA对感染的截止点(阈值)(即,对象在取样时是否正在接受感染的治疗)进行实验确定的表。

[0032] 图20是图19的结果的图形表示,示出了使用来自292个样品的总cf-DNA对感染的截止点(阈值)(即,对象在取样时是否正在接受感染的治疗)进行实验确定。

### 具体实施方式

[0033] 已经发现总无细胞DNA(总cf-DNA)与移植并发症相关,并且因此可用于评价和/或监测对象。并发症包括但不限于感染、心脏停搏和/或死亡。因此,本公开内容的一些方面至少部分涉及量化样品中的总cf-DNA以评价或确定与其相关的移植并发症或风险的方法。在一些实施方案中,对象可借助机械支持(例如呼吸机),并且可用本文中提供的任一种方法进行监测。

[0034] 如本文所用,“无细胞DNA”(或“cf-DNA”)是存在于对象的细胞外部,例如在血液、血浆、血清、尿液等中的DNA。不希望受任何特定理论或机制的束缚,认为cf-DNA例如通过细胞的凋亡而从细胞释放。“总无细胞DNA”(或“总cf-DNA”)是样品中存在的cf-DNA的量,并且在评价来自移植接受者的样品时,可包含供体和接受者cf-DNA。如本文所用,本文中提供的组合物和方法可用于确定总无细胞DNA的量以及对象与移植相关的并发症的风险。

[0035] 本文中提供了可用于测量总cf-DNA的方法和组合物,然后可用于评价对象与移植相关的并发症的风险。如本文所用,“移植”是指器官或组织从供体向接受者的移动,以替换接受者的受损或缺失的器官或组织。本文中提供的任一种方法或组合物可用于来自已经接受器官或组织移植的对象的样品上。在一些实施方案中,移植是心脏移植。

[0036] 重要的是,总cf-DNA的量可用于评价或确定移植并发症的风险。移植并发症包括心脏停搏、感染和死亡。如本文中所提供的,任一种方法均可用于评价患有或怀疑患有移植并发症的对象。如本文所用,“怀疑患有”是指临床医生认为该对象存在患有特定病症(例如移植并发症)的可能性。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,对象可以是患有移植并发症或临床医生认为存在患有移植并发症之可能性的对象。在一些实施方案中,任一种方法均可用于评价患有或处于患有移植并发症之风险中的对象。基于症状(和/或缺乏症状),对象可被怀疑患有、确定患有或确定具有患有移植并发症之可能性或风险。然而,在一些实施方案中,基于一种或更多种其他测试,对象被怀疑患有、确定患有或确定具有患有移植并发症之可能性或风险。在这样的实施方案中,本文中提供的方法可用于确认这样的发现或监测这样的对象的病情恶化或改善。

[0037] 可通过确定或获得总cf-DNA的一个或更多个量来评价对象。总cf-DNA的量可以用实验技术确定,例如本文中其他地方提供的那些。如本文中使用的,“获得”是指可通过其获取相应的信息或材料的任一种方法。因此,可以通过实验方法来获取相应的信息。在一些实施方案中,可使用多种实验方法或实验室方法来对相应的材料进行创建、设计等。相应信息或材料还可通过给予或提供信息(例如在报告中)或材料来获取。在一些实施方案中,可以通过商业手段(即通过购买)来给予或提供材料。

[0038] 由于能够确定核酸(例如cf-DNA)的量,以及与移植并发症的相关性,本文中提供的方法和组合物可用于评价对象。因此,可确定在这样的对象中的病症改善或恶化的风险。如本文中所提供的“风险”是指对象中任何不期望病症的存在或不存在或进展,或者这种病症的存在或不存在或进展的可能性增加。如本文中所提供的,“提高的风险”是指对象中任何不期望的病症的存在或进展,或者这样的病症的存在或进展的可能性提高。如本文中所提供的,“降低的风险”是指在对象中不存在任何不期望的病症或进展,或这种病症的存在或进展的可能性降低(或不存在或不进展的可能性提高)。

[0039] 如本文中所提供的,早期发现或监测移植并发症可促进治疗并改善临床结局。如上所提及的,可对患有或怀疑患有移植并发症的对象进行所提供的任一种方法。这样的方法可用于随时间推移而监测对象,无论是否进行治疗。此外,这样的方法可以有助于选择、施用和/或监测治疗或治疗。因此,本文中提供的方法可用于确定治疗或监测方案。对象可以是本文中提供的任一个对象。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,对象是借助机械支持或需要机械支持的对象。

[0040] 如本文所用,“确定治疗方案”是指确定用于治疗对象的行动过程。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,确定治疗方案包括确定向对象提供的适当的治疗或关于适当治疗的信息。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,所述确定包括向对象提供适当治疗或关于适当治疗的信息。如本文所用,可以书面形式或电子形式提供关于治疗或治疗或监测的信息。在一些实施方案中,可将信息作为计算机可读指令来提供。在一些实施方案中,可口头提供信息。

[0041] 治疗包括基于所确定的并发症风险所指示的任一种治疗。在一个实施方案中,所述治疗是心脏停搏治疗。心脏停搏治疗包括,例如,血压药物、非自愿神经系统阻滞剂和抗心律不齐药剂。此外,可使用冠状动脉导管插入术治疗对象和/或可植入心律转复除颤器(cardioverter-defibrillator)。

[0042] 在另一个实施方案中,所述治疗可以是感染的治疗。在一些实施方案中,用于治疗感染的治疗包括用于治疗细菌、真菌和/或病毒感染的治疗。这样的治疗包括抗生素。其他实例包括但不限于杀阿米巴剂、氨基糖苷类、驱虫剂、抗真菌剂、唑类抗真菌剂、棘白菌素类、多烯类、二芳基喹啉类、酰肼衍生物、烟酸衍生物、利福霉素衍生物、链霉菌属衍生物、抗病毒剂、趋化因子受体拮抗剂、整合酶链转移抑制剂、神经氨酸酶抑制剂、NNRTI、NS5A抑制剂、核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)、蛋白酶抑制剂、嘌呤核苷、碳青霉烯类、头孢菌素、甘氨酸环素类(glycylcyclines)、抗麻风剂(leprostatics)、林可霉素衍生物、大环内酯衍生物、酮内酯类、大环内酯类、噁唑烷酮类抗生素、青霉素类、 $\beta$ -内酰胺酶类抑制剂、喹诺酮类、磺胺类和四环素类。

[0043] 抗排斥治疗包括例如免疫抑制剂。免疫抑制剂包括但不限于皮质类固醇(例如,泼尼松龙或氢化可的松)、糖皮质激素、细胞抑制剂、烷化剂(例如,氮芥类(环磷酰胺)、亚硝基脲类、铂化合物、环磷酰胺(Cytosan))、抗代谢物类(例如叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)、嘌呤类似物(例如硫唑嘌呤和巯嘌呤)、嘧啶类似物和蛋白质合成抑制剂)、细胞毒性抗生素(例如,放线菌素D、蒽环类、丝裂霉素C、博来霉素、光辉霉素)、抗体(例如,抗CD20,抗IL-1、抗IL-2R $\alpha$ 、抗T细胞或抗CD-3单克隆抗体和多克隆抗体,例如Atgam和即复宁(Thymoglobuline)、作用于免疫嗜素(immunophilin)的药物、环孢素、他克莫司、西罗莫司、



干扰素、阿片类 (opiod)、TNF-结合蛋白、霉酚酸酯、芬洛莫德和多里菌素 (myriocin)。在一些实施方案中,抗排斥治疗包括血液转移或骨髓移植。治疗还可包括静脉内输液 (intravenous fluid)、抗生素、外科引流、早期目标定向治疗 (early goal directed therapy, EGDT)、血管加压剂、类固醇、活化蛋白C、屈曲可净 $\alpha$  (drotrecogin alfa (活化的)、氧气和器官功能障碍的适当支持物。这可包括肾衰竭的血液透析、肺功能障碍的机械通气、血液制品的输注以及循环衰竭的药物和流体治疗。确保充足的营养 (优选通过肠内饲喂,但必要时通过肠胃外营养) 也应包括在内,尤其是在长期疾病期间。其他相关治疗可包括胰岛素和药物,以预防深静脉血栓形成和胃溃疡。其他这样的治疗是本领域普通技术人员已知的。

[0044] 其他治疗是本领域普通技术人员已知的。

[0045] 治疗或治疗的施用可通过本领域已知的任一种方法来完成 (参见,例如, Harrison's Principle of Internal Medicine, McGraw Hill Inc.)。优选地,以治疗有效量进行治疗或治疗的施用。施用可以是局部的,也可以是系统的。施用可以是肠胃外的 (例如,静脉内、皮下或皮内) 或经口的。用于不同施用途径的组合物是本领域已知的 (参见,例如, E.W.Martin 的 Remington's Pharmaceutical Sciences)。

[0046] 治疗和临床过程可以由如本文中提供的确定的对象病症和/或对象的相关预期结局来确定。例如,如果总cf-DNA的量为8ng/mL或更大,则可以用例如上述那些的治疗来治疗对象或向对象提供与其相关的信息。

[0047] 如本文所用,“确定监测方案”是指确定随时间推移监测对象的病症的行动过程。在本文中提供的任一种方法的一个实施方案中,确定监测方案包括确定适当的行动过程,用于适时地确定随时间推移的或在随后的时间点处的对象中的总cf-DNA的量,或向对象建议这样的监测。这可以允许测量临床状态的变化和/或允许计算正常值或基线水平 (以及与其比较)。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,确定监测方案包括确定从对象获得样品的时间和/或频率,和/或确定或获得总cf-DNA的量。

[0048] 在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,总cf-DNA可早在移植手术之后4天被检测到。在其他实施方案中,总cf-DNA可在移植之后5、6、7或8或更多天内进行定量。为了监测对象的总cf-DNA水平,可以每月、每两个月或以更频繁的间隔进行取样,持续长达6个月、长达8个月、长达10个月、长达12个月或更长。由于发现总cf-DNA的水平提高与风险提高有关,如果发现对象的总cf-DNA在两个时间点之间提高,则临床医生可确定该对象应进行更频繁的取样。如果发现对象在两个时间点之间的总cf-DNA水平降低,则临床医生可确定较低频率的取样就足够了。监测的时间和/或频率也可通过与一个或更多个阈值进行比较来确定。例如,如果总cf-DNA的量等于或大于8ng/mL (或本文中提供的任一个阈值) 和/或正在增加,则可能需要更频繁的取样,而如果总cf-DNA的量小于8ng/mL (或本文中提供的任一个阈值),和/或未增加,则可能需要较低的取样频率。通常来说,总cf-DNA的量较高或正在提高的对象需要更密切的监测和更频繁的取样。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,每个量和时间点可以被记录在报告或数据库中。

[0049] 在一个方面中,还提供了具有本文中提供的任意一个或更多个值的报告。报告可以采用口头、书面 (或硬拷贝) 或电子形式,例如可以可视化或显示的形式。优选地,该报告提供了样品中总核酸 (例如总cf-DNA) 的量。在一些实施方案中,该报告提供了随时间推移

来自对象的样品中的总核酸(例如总cf-DNA)的量。

[0050] 在一些实施方案中,量在数据库中或输入到数据库内。在一个方面中,提供了具有这种值的数据库。根据一个或更多个量,临床医生可以评价对对象进行治疗或监测的需要。因此,在本文中提供的任一种方法中,该方法可包括在多于一个时间点处适时地评价对象中核酸的量。可以用本文中提供的任一种方法或组合物进行这种评价。

[0051] 如本文所用,“量”是指用于核酸测量的任一个定量值,并且可以绝对或相对量给出。此外,该量可以是总量、频率、比、百分比等。如本文中所使用的,可使用术语“水平”代替“量”而旨在指代相同类型的值。通常,除非另外提供,否则本文中提供的量代表样品中的总cf-DNA。

[0052] 在一些实施方案中,本文中提供的任一种方法可包括将总核酸的量与阈值或与一个或更多个先前量进行比较,以鉴定对象处于提高或降低的风险中。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,与阈值相比或与一个或更多个先前量相比具有增加的总核酸量的对象被鉴定为处于提高的风险中。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,与阈值相比,或与一个或更多个先前量相比,具有降低或相似的总核酸量的对象被鉴定为处于降低或未提高的风险中。

[0053] 如本文所使用的,“阈”或“阈值”或“截止点”是指指示病症的存在或不存在或者风险的存在或不存在的任意预定水平或水平范围。阈值可采用多种形式。其可以是单个截止值,例如中位数或均值。其可基于比较组来建立,例如在一个确定组中的风险是另一个确定组中的风险的两倍的情况下。其可以是一个范围,例如在以下情况下:将测试群体平等地(或不平等地)分组,例如低风险组、中等风险组和高风险组;或者分为四个象限,最低象限是风险最低的对象,最高象限是风险最高的对象。阈值可取决于所选的特定群体。例如,表面健康的群体将具有不同的“正常”范围。作为另一个实例,可由在病症或风险存在之前或者在治疗过程之后的基线值确定阈值。这样的基线可指示对象中与所测试风险或病症不相关的正常或其他状态。在一些实施方案中,阈值可以是被测对象的基线值。因此,选择的预定值可以考虑对象落入的类别。本领域普通技术人员仅通过常规实验就可选择适当的范围和类别。本文中提供的任一种方法的阈值可以是本文中提供的任一个阈值,例如在实施例或附图中。

[0054] 本文中提供的阈值可用于确定对象中移植并发症的风险。因此,如果测得的总cf-DNA的量等于或大于8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20ng/mL,则对象可被确定为处在并发症之提高风险中。例如,等于或大于8或9ng/mL的量可以指示心脏停搏。作为另一个实例,等于或大于20ng/mL的量可指示感染。可基于本文中提供的任一种比较在带有或不带有这种并发症的其他指标的情况下来进行该确定。

[0055] 阈值也可用于比较以做出治疗和/或监测决定。例如,如果总cf-DNA的量大于本文中提供的阈值之一和/或随时间增加,则可以指示进一步的监测。作为另一实例,如果该量大于本文中提供的任一个阈值,则可以指示对对象的治疗。如果该量大于本文中提供的任一个阈值,则可以指示对对象的额外测试,例如活检。

[0056] 因此,本文中提供的任一种方法还可包括用于评价对象的额外测试,或向对象建议这样的另外的测试(或提供关于这样的另外的测试的信息)的步骤。一种或更多种额外测试可以是本文中提供的任一种方法。一种或更多种额外测试可以是本文中提供的或本领域

已知的其他方法中的任一种,这视情况而定。一种或更多种额外测试的类型将取决于对象的病症和/或完全在技术人员的确定范围内。

[0057] 针对怀疑感染的对象的一些示例性额外测试包括但不限于血液测试、尿液测试、咽拭子(throat swab)和脊椎抽液(spinal tap)。

[0058] 针对对象的一些示例性额外测试包括但不限于超声心动图(echocardiogram)、冠状动脉造影(coronary angiography)、血管内超声(intravascular ultrasound, IVUS)、活检(例如,心内膜心肌活检)、负荷超声心动图、CT冠状动脉造影、冠状动脉血流储备评价(对比增强的超声心动图)、负荷心肌灌注闪烁成像(stress myocardial perfusion scintigraphy)、正电子发射断层成像(positron emission tomography, PET)扫描以及血清生物标志物(例如BNP和/或肌钙蛋白(troponin))的测量。

[0059] 总cf-DNA的量可通过多种方法确定。在一些实施方案中,这种方法是基于测序的方法。例如,可通过分析样品的DNA以鉴定多个基因座来测量总cf-DNA,可确定每个基因座的等位基因,并且可基于所确定的等位基因选择信息性基因座。如本文所用,“基因座”是指核酸中的核苷酸位置,例如染色体上或基因中的核苷酸位置。如本文所用,“信息性基因座”是指这样的基因座,其中对象的基因型对于主要等位基因而言是纯合的,而供体的基因型对于次要等位基因而言是纯合的或杂合的。如本文所用,“次要等位基因”是指在基因座的核酸群体中频率较低的等位基因。在一些实施方案中,次要等位基因是供体核酸中的基因座处的核苷酸身份(nucleotide identity)。在另一个方面中,“主要等位基因”是指群体中频率更高的等位基因。在一些实施方案中,主要等位基因是对象的核酸中的基因座处的核苷酸身份。

[0060] 在一些实施方案中,可基于对象的核酸与供体的核酸的先前基因型分型(genotyping)来确定信息性基因座和等位基因。例如,可比较接受体和供体的基因型,并且可将信息基因座鉴定为其中接受体对于核苷酸身份而言是纯合的并且供体对于不同核苷酸身份而言是杂合的或纯合的那些基因座。基因型分型的方法是本领域公知的,并在本文中进一步描述。在这个实例中,次要和主要等位基因可通过确定信息性基因座上每个等位基因的相对量来鉴定,和/或可被鉴定为供体DNA(次要等位基因)和接受体DNA(主要等位基因)中的信息性基因座处的核苷酸身份。因此,所提供的方法还可包括对接受体和供体进行基因型分型的步骤,或者获得这样的基因型或被提供有这样的基因型的步骤。

[0061] 可使用任意合适的下一代测序或高通量测序和/或基因型分型技术来分析DNA。下一代测序和高通量测序和/或基因型分型技术的示例包括但不限于:大规模并行签名测序(massively parallel signature sequencing)、polony测序、454焦磷酸测序、Illumina (Solexa)测序、SOLiD测序、离子半导体测序、DNA纳米球测序、heliscope显微镜单分子测序、单分子实时(single molecule real time, SMRT)测序、**MassARRAY®**,以及选定区域的数字分析(DANSRTM)(参见例如Stein RA(1September 2008).“Next-Generation Sequencing Update”.Genetic Engineering&Biotechnology News 28(15);Quail, Michael;Smith,Miriam E;Coupland,Paul;Otto,Thomas D;Harris,Simon R;Connor, Thomas R;Bertoni,Anna;Swerdlow,Harold P;Gu,Yong(1January 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,Lin;Li,

Yinhu;Li,Siliang;Hu,Ni;He,Yimin;Pong,Ray;Lin,Danni;Lu,Lihua;Law,Maggie (1 January 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®).Methods Mol Biol.2009;578:307-43;Chu T,Bunce K,Hogge WA,Peters DG.A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma.Prenat Diagn 2010;30:1226-9;以及Suzuki N,Kamataki A,Yamaki J,Homma Y.Characterization of circulating DNA in healthy human plasma.Clinica chimica acta;International Journal of Clinical Chemistry 2008;387:55-8)。

[0062] 在一个实施方案中,用于确定总cf-DNA的任一种方法可以是U.S.公开No.2015-0086477-A1中的任一种方法,并且这样的方法通过引用整体并入本文。

[0063] 总cf-DNA的量也可通过MOMA测定来确定。在一个实施方案中,用于确定总cf-DNA的任一种方法可以是PCT公开No.WO 2016/176662 A1中的任一种方法,并且这样的方法通过引用整体并入本文。

[0064] 可确定多个SNV靶标的总cf-DNA。“多个SNV靶标”是指多于一个SNV靶标,其中对于每个靶标至少有两个等位基因。在一些实施方案中,每个SNV靶标是双等位基因的,并且对SNV靶标的每个等位基因具有特异性的引物对被用于特异性扩增每个等位基因的核酸,其中如果样品中存在特定等位基因的核酸,则发生扩增。

[0065] 在本文中提供的任一种方法或组物的一个实施方案中,可基于SNV靶标会具有信息性的知识(例如具有基因型的知识的情况下)来预先选择SNV靶标的一个或更多个引物对。在本文中提供的任一种方法的其他实施方案中,供体的基因型是未知的。在这种情况下,可以用期望最大化法推断供体基因型。例如,使用已知的接受体基因型,可选择已知在接受体中是纯合的靶标。任意污染物均可归因于供体特异性核酸,并且所得的测定收集物将由三模式分布(tri-modal distribution):非信息性测定、半信息性测定和完全信息性测定组成。利用足够量的接受体纯合测定,可推断出供体完全信息性测定的存在。

[0066] 在本文中提供的任一种方法或组物的另一个实施方案中,可选择多个SNV靶标的引物对,以使至少一个(或多个)可能提供信息。在这样的实施方案中,在本文中提供的任一种方法中使用了一组SNV靶标的引物对。在一些实施方案中,一组SNV靶标是至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或更多个可能靶标的组。

[0067] 如本文所用,“信息性SNV靶标”是这样的靶标,其中发生用如本文中所提供的引物进行的扩增,并且其结果是信息性的。如本文中所提供的“信息性结果”是可用于量化样品中总核酸水平的结果。在一些实施方案中,总核酸的量可以用主要和次要等位基因的量来确定。

[0068] 可获得用于MOMA测定的引物,并且本文中提供的任一种方法可包括获得用于进行基于扩增的定量测定(例如PCR测定)的一个或更多种引物对的步骤。一般来说,引物具有有利于其用于量化核酸的量的独特特性。例如,引物对的正向引物可在3'核苷酸(例如,倒数

第二位3'核苷酸)处错配。在所提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,这种错配位于3'核苷酸处但与SNV位置相邻。在所提供的任一种方法的一些实施方案中,引物相对于SNV位置的错配定位如图1中所示。一般来说,这样的正向引物即使具有3'错配也在扩增反应(例如PCR反应)中产生扩增产物(与合适的反向引物联合),因此允许扩增并导致检测到具有相应SNV的核酸。如果特定SNV不存在并且存在相对于SNV靶标的另一个等位基因的双错配,则通常不会产生扩增产物。优选地,在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,对于每种SNV靶标,获得以下引物对,通过所述引物对,可发生每个等位基因的特异性扩增而不扩增其他等位基因。“特异性扩增”是指扩增靶标的特定等位基因,而基本上不扩增另外的核酸或不扩增超过背景或噪声的另外核酸序列。在一些实施方案中,特异性扩增仅导致扩增特定等位基因。

[0069] 在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,对于是双等位基因的每种SNV靶标,存在两种引物对,每种对两个等位基因之一具有特异性,并且因此具有相对于其将要扩增之等位基因的单个错配,并且具有相对于其不扩增之等位基因的双错配(如果这些等位基因的核酸存在的话)。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,错配引物是正向引物。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,用于每种SNV靶标的两种引物对中的反向引物是相同的。

[0070] 这些概念可用于设计用于本文中提供的任一种方法或组合物的引物对。应理解,正向和反向引物被设计成结合相对链(例如,有义链和反义链)以扩增模板的特定基因座的片段。引物对的正向和反向引物可被设计成扩增任意合适大小的核酸片段以检测例如根据本公开内容之SNV靶标的等位基因是否存在。本文中提供的任一种方法均可包括用于获得如本文中所述的一种或更多种引物对的一个或更多个步骤。

[0071] 应理解,本文中所述的引物对可用于多路复用的基于扩增的定量测定(例如PCR测定)。因此,在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,引物对被设计成在PCR反应中与其他引物对相容。例如,引物对可被设计成在PCR反应中与至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种等其他引物对相容。如本文中使用的,如果引物对能够在同一PCR反应中扩增其靶标,则其在PCR反应中是“相容的”。在一些实施方案中,如果在同一PCR反应中多路复用进行时,引物对扩增其靶DNA被抑制不超过1%、不超过2%、不超过3%、不超过4%、不超过5%、不超过10%、不超过15%、不超过20%、不超过25%、不超过30%、不超过35%、不超过40%、不超过45%、不超过50%或不超过60%,则所述引物对是相容的。引物对可由于多种原因而不相容,所述原因包括但不限于引物二聚体的形成和与模板上的脱靶位点结合,这可能干扰另外的引物对。因此,本公开内容的引物对可被设计成避免与其他引物对形成二聚体或限制脱靶结合位点的数目。用于设计用于多路复用PCR测定的引物的示例性方法是本领域中已知的或在本文中别处描述。

[0072] 在一些实施方案中,本文中所述的引物对用于多路复用的基于扩增的定量测定(例如PCR测定)以量化总核酸的量。因此,在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,引物对被设计成检测二倍体的基因组区域,不包括被设计成检测可能是非二倍体的基因组区域的引物对。在本文中提供的任一种方法或组合物的一些实施方案中,根据本公开内容使用的引物对不检测重复掩蔽区、已知拷贝数可变区或可以是非二倍体的其他基因组区。

[0073] 在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,基于扩增的定量测定是任意定量测定,例如由此扩增核酸并可确定核酸的量。这样的测定包括用本文中所述的MOMA引物扩增核酸并进行定量的那些测定。这样的测定包括简单的扩增和检测、杂交技术(例如电泳的分离技术)、下一代测序等。

[0074] 在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,PCR是定量PCR,意味着可确定核酸的量。定量PCR包括实时PCR、数字PCR、TAQMAN™等。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,PCR是“实时PCR”。这样的PCR是指其中可在扩增过程仍在进行的同时在液相中监测反应动力学的PCR反应。与常规PCR相比,实时PCR提供了在扩增反应中同时实时地检测或量化的能力。基于来自特定染料的荧光强度的提高,甚至可在扩增达到其平台期之前确定靶标的浓度。

[0075] 使用多种探针可扩展单探针实时PCR的能力。多路复用实时PCR使用多个基于探针的测定,其中每个测定可具有用独特的荧光染料标记的特定探针,使得对于每个测定观察到不同的颜色。实时PCR仪器可区分由不同染料产生的荧光。不同的探针可用各自具有独特的发射谱的不同染料进行标记。谱信号用离散的光学装置收集,通过一系列滤光器组,并由检测器阵列收集。染料之间的谱重叠可通过使用纯染料谱通过矩阵代数对实验数据去卷积来进行校正。

[0076] 探针可用于本公开内容的一些方法,特别地可用于包括量化步骤的那些方法。本文中提供的任一种方法可包括在进行PCR测定中使用探针,同时本文中提供的组合物或试剂盒中的任一种可包含一种或更多种探针。重要的是,在本文中提供的任意一种或更多种方法的一些实施方案中,一个或更多个或全部PCR定量测定中的探针与错配引物位于同一链上,而不在相对链上。已发现,将探针这样并入PCR反应中,可提供另外的等位基因特异性区分。

[0077] 作为一个实例,TAQMAN™探针是在5'端具有FAM™或VIC®染料标记并且在3'端具有小沟结合剂(minor groove binder, MGB)非荧光猝灭剂(non-fluorescent quencher, NFQ)的水解探针。TAQMAN™探针原理一般依赖于Taq®聚合酶在与互补探针结合区杂交期间切割双重标记的TAQMAN™探针的5'-3'核酸外切酶活性和基于荧光团的检测。TAQMAN™探针可提高定量PCR反应的指数期期间定量测量中检测的特异性。

[0078] PCR系统通常依赖于荧光染料或报道子(其中信号与反应中PCR产物的量成正比地提高)的检测和量化。例如,在最简单和最经济的形式中,所述报道子可以是双链DNA特异性染料SYBR®Green (Molecular Probes)。SYBR®Green是与双链DNA小沟结合的染料。当SYBR®Green染料与双链DNA结合时,荧光强度提高。随着产生更多的双链扩增子,SYBR®Green染料信号将提高。

[0079] 应理解,可对本文中提供的PCR条件进行改进或优化以根据本文中所述的任一种方法来工作。通常来说,PCR条件基于所使用的酶、靶模板和/或引物。在一些实施方案中,对PCR反应的一种或更多种组分进行改进或优化。可优化的PCR反应组分的一些非限制性实例包括模板DNA、引物(例如,正向引物和反向引物)、脱氧核苷酸(dNTP)、聚合酶、镁浓度、缓冲剂、探针(例如,当进行实时PCR时)、缓冲剂和反应体积。

[0080] 在前述任一实施方案中,可使用任何DNA聚合酶(催化DNA核苷酸聚合成DNA链的

酶),包括热稳定性聚合酶。合适的聚合酶将是本领域技术人员已知的,并且包括大肠杆菌(*E.coli*)DNA聚合酶、大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow片段、T7 DNA聚合酶、T4 DNA聚合酶、T5 DNA聚合酶、Klenow类聚合酶、Taq聚合酶、Pfu DNA聚合酶、Vent聚合酶、噬菌体29、REDTaq™基因组DNA聚合酶或测序酶。示例性的聚合酶包括但不限于嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*) pol I、水生栖热菌(*Thermus aquaticus*, Taq) pol I、嗜热古细菌(*Pyrococcus furiosus*, Pfu)、乌兹炽热球菌(*Pyrococcus woesei*, Pwo)、黄栖热菌(*Thermus flavus*, Tfl)、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*, Tth)、里氏栖热菌(*Thermus litoris*, Tli)和海栖热袍菌(*Thermotoga maritime*, Tma)。这些酶、这些酶的经修饰形式和酶组合可从供应商商购获得,所述供应商包括Roche、Invitrogen、Qiagen、Stratagene和Applied Biosystems。代表性的酶包括 **PHUSION®** (New England Biolabs, Ipswich, MA)、Hot MasterTaq™ (Eppendorf)、**PHUSION®**Mpx (Finnzymes)、**PyroStart®** (Fermentas)、KOD (EMD Biosciences)、Z-Taq (TAKARA) 和CS3AC/LA (KlenTaq, University City, MO)。

[0081] 盐和缓冲剂包括本领域技术人员熟悉的那些,包括分别包含MgCl<sub>2</sub>、以及Tris-HCl和KCl的那些。通常来说,1.5至2.0mM的镁对于Taq DNA聚合酶是最佳的,然而,最佳的镁浓度可取决于模板、缓冲剂、DNA和dNTP因为每一种都具有与镁形成螯合物的潜力。如果镁[Mg<sup>2+</sup>]的浓度太低,则不能形成PCR产物。如果镁[Mg<sup>2+</sup>]的浓度太高,则可见到不期望的PCR产物。在一些实施方案中,镁浓度可通过以0.1mM或0.5mM的增量补充镁浓度直至镁浓度为约5mM来优化。

[0082] 根据本公开内容使用的缓冲剂可包含添加剂,例如表面活性剂、二甲基亚砜(DMSO)、甘油、牛血清白蛋白(BSA)和聚乙二醇(PEG),以及本领域技术人员熟悉的其他添加剂。核苷酸一般是三磷酸脱氧核糖核苷,例如三磷酸脱氧腺苷(dATP)、三磷酸脱氧胞苷(dCTP)、三磷酸脱氧鸟苷(dGTP)和三磷酸脱氧胸苷(dTTP),其也可以足够的量添加至反应用于扩增靶核酸。在一些实施方案中,一种或更多种dNTP(例如,dATP、dCTP、dGTP、dTTP)的浓度为约10μM至约500μM,这可取决于PCR反应中产生的PCR产物的长度和数量。

[0083] 在一些实施方案中,可改进或优化PCR反应中使用的引物的浓度。在一些实施方案中,PCR反应中引物(例如正向或反向引物)的浓度可以是例如约0.05μM至约1μM。在一些具体实施方案中,每种引物的浓度为约1nM至约1μM。应理解,根据本公开内容的引物可在PCR反应中以相同或不同的浓度使用。例如,引物对中的正向引物可以0.5μM的浓度使用,而引物对中的反向引物可以0.1μM使用。引物的浓度可基于包括但不限于以下的因素:引物长度、GC含量、纯度、与靶DNA的错配、或形成引物二聚体的可能性。

[0084] 在一些实施方案中,对PCR反应的热分布(thermal profile)进行改进或优化。PCR热分布改进的一些非限制性实例包括变性温度和持续时间、退火温度和持续时间,以及延伸时间。

[0085] PCR反应溶液的温度可在变性状态、退火状态和延伸状态之间依次地进行预定数目的循环。实际的时间和温度可以是酶、引物和靶标依赖性的。对于任何给定的反应,变性状态在某些实施方案中可以是约70℃至约100℃。另外,退火温度和时间可影响引物与靶核酸内特定基因座结合的特异性和效率,并且对于特定的PCR反应可以是重要的。对于任何给

定的反应,退火状态在某些实施方案中可以是约20℃至约75℃。在一些实施例中,退火状态可以是约46℃到64℃。在某些实施方案中,退火状态可在室温(例如,约20℃至约25℃)下进行。

[0086] 延伸温度和时间还可影响等位基因产物产率。对于给定的酶,延伸状态在某些实施方案中可以是约60℃至约75℃。

[0087] 由PCR测定来量化等位基因的量可如本文中提供的进行,或者如另外本领域普通技术人员显而易见地进行。作为一个实例,分析扩增迹线的一致性和稳健量化。可使用内标(internal standard)来将循环阈值转化为输入核酸(例如,DNA)的量。等位基因的量可作为性能测定的均值来计算,并且可针对基因型进行调整。

[0088] 用于确定样品中的总无细胞DNA的其他方法是本领域已知的。在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,使用RNA酶P作为靶标,用TAQMAN™实时PCR确定总无细胞DNA。

[0089] 本文中提供的任一种方法可包括从获自对象的样品提取核酸(例如总无细胞DNA)。这样的提取可使用本领域中已知或本文中另外提供的任何方法(参见例如Current Protocols in Molecular Biology,最新版本,或QIAamp循环核酸试剂盒或其他合适的可商购试剂盒)来进行。描述了用于从血液分离无细胞DNA的示例性方法。从对象收集包含抗凝剂(例如EDTA或DTA)的血液。使包含cf-DNA的血浆与血液中存在的细胞分离(例如,通过离心或过滤)。可进行任意的第二分离以从血浆中除去任何剩余的细胞(例如,第二离心或过滤步骤)。然后,可使用本领域中已知的任何方法,例如使用商用试剂盒(例如由Qiagen生产的那些)来提取cf-DNA。用于提取cf-DNA的其他示例性方法也是本领域中已知的(参见例如Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock.Clin.Chem.2008,v.54,p.1000-1007;Prediction of MYCN Amplification in Neuroblastoma Using Serum DNA and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.JCO 2005,v.23,p.5205-5210;Circulating Nucleic Acids in Blood of Healthy Male and Female Donors.Clin.Chem.2005,v.51,p.1317-1319;Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction:Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics.Clin.Chem.2003,v.49,p.1953-1955;Chiu RWK,Poon LLM,Lau TK,Leung TN,Wong EMC,Lo YMD.Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma.Clin Chem 2001;47:1607-1613;和Swinkels等Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma.Clinical Chemistry,2003,vol.49,no.3,525-526)。

[0090] 在本文中提供的任一种方法的一些实施方案中,进行预扩增步骤。这种扩增的示例性方法如下,并且这种方法可包括在本文中提供的任一种方法中。使用Q5 DNA聚合酶在PCR中扩增约15ng无细胞血浆DNA,约有13个靶标,其中合并的引物总量为4uM。样品经过约25个循环。反应总量为25ul。扩增后,可使用多种方法清洗样品,包括AMPURE珠净化、珠纯化、或者仅使用ExoSAP-IT™或Zymo。

[0091] 如本文所用,来自对象的样品可以是生物学样品。这样的生物样品的一些实例包括全血、血浆、血清、尿液等。在一些实施方案中,可向样品中添加其他核酸,例如标准品。

[0092] 在另一个方面中,提供了包含一个或更多个如本文中提供的引物对的组合物和试



剂盒。用于进行测定例如PCR测定的其他试剂还可包含在组合物或试剂盒中。

[0093] 本发明的不同方面可单独地、组合或以前文中所述实施方案中未具体讨论的多种布置使用,并且因此其应用不限于在先描述中所述的或附图中举例说明的组分的细节和布置。例如,一个实施方案中描述的方面可以任何方式与其他实施方案中描述的方面组合。

[0094] 此外,本发明的一些实施方案可作为一种或更多种方法实施,其实例已提供。作为方法的一部分执行的动作可以任何合适的方式排序。因此,可构建这样的一些实施方案,其中动作以不同于所举例说明的顺序执行,其可包括同时进行一些动作,即使在举例说明性实施方案中被示为顺序动作。

[0095] 在权利要求书中使用例如“第一”、“第二”、“第三”等的序数术语来修饰权利要求要素并非自身暗示一个权利要求要素相对于另一个具有任何优先权、优先性或顺序或者其中执行方法动作的时间顺序。这样的术语仅用作标记以区分具有某一名称的一个权利要求要素与具有相同名称(除序数术语的使用之外)的另一个要素。

[0096] 本文中使用的用语和术语是出于描述的目的,并且不应被认为是限制性的。“包括”、“包含”、“具有”、“含有”、“涉及”及其变化形式的使用意味着涵盖其后列出的项目和额外项目。

[0097] 已经详细描述了本发明的数个实施方案,本领域技术人员将容易想到不同的修改和改进。这样的修改和改进旨在落入本发明的精神和范围内。因此,前面的描述仅是作为示例,而不是旨在是限制性的。以下描述提供了本文中提供的方法的一些实例。

[0098] 实施例

[0099] 实施例1-计算机实现的实施方案的实施例

[0100] 在一些实施方案中,上述诊断技术可通过执行一种或更多种软件设施的一种或更多种计算装置来实现以随时间分析对象的样品、测量样品中的核酸(例如无细胞DNA)并基于一种或更多种样品产生诊断结果。图2示出了可用其操作一些实施方案的计算机系统的一个实例,但应理解,一些实施方案不限于使用图2中所示类型的系统来操作。

[0101] 图2的计算机系统包括对象802和可从对象806获得样品806的临床医生804。如从前述应理解的,样品806可以是用于对象802的任何合适的生物材料样品,其可用于测量对象802(包括血液样品)中核酸(例如无细胞DNA)的存在。可将样品806提供给分析装置808,普通技术人员将从前述内容中理解其将分析样品808以确定(包括评价)样品806和/或对象802中核酸(例如无细胞DNA)的总量。为了便于举例说明,将分析装置808描绘为单个装置,但应理解,分析装置808可采用任何合适的形式,并且在一些实施方案中,可作为多个装置实现。为了确定样品806和/或对象802中的核酸(例如无细胞DNA)的量,分析装置808可执行上述任何技术,并且不限于进行任何特定的分析。分析装置808可包含一个或更多个处理器以执行在软件中实现的分析设施,其可驱动处理器以操作其他硬件并接收由其他硬件执行的任务的结果以确定分析的总结果(其可以是样品806和/或对象802中的核酸(例如无细胞DNA)的量)。分析设施可存储在装置808的一个或更多个计算机可读存储介质(例如存储器)中。在另一些实施方案中,本文中描述的用于分析样品的技术可部分地或完全地在一个或更多个专用计算机组件(例如专用集成电路(Application Specific Integrated Circuits,ASIC))中实现,或者通过可代替软件实施的任何其他合适形式的计算机组件来实现。

[0102] 在一些实施方案中,临床医生804可直接将样品806提供给分析装置808,并且除了从对象802获得样品806之外还可操作装置808,而在另一些实施方案中,装置808可在地理上位于远离临床医生804的位置,并且对象802和样品806可能需要被运送或以其他方式转移至分析装置808的位置。在一些实施方案中,样品806可(例如,经由任何合适的界面输入)与样品806和/或对象802、获得样品806的日期和/或时间、或者描述或识别样品806之其他信息的标识符一起提供给分析装置808。

[0103] 在一些实施方案中,分析装置808可配置成将对样品806执行的分析的结果提供给计算装置810,所述计算装置810可包括可作为数据库或其他合适的数据存储的数据存储810A来实现。在一些实施方案中,计算装置810可作为一种或更多种服务器实现,包括作为例如云服务提供商的分布式计算平台的一种或更多种物理和/或虚拟机。在另一些实施方案中,装置810可作为台式或笔记本型个人计算机、智能移动电话、平板计算机、专用硬件装置或其他计算装置实现。

[0104] 在一些实施方案中,分析装置808可经由一种或更多种有线和/或无线、本地和/或广域计算机通信网络(包括因特网)将其分析结果传送至装置810。可使用任何合适的协议传达分析的结果,并且可与描述或识别样品806的信息,例如样品806和/或对象802的标识符或获得样品806的日期和/或时间一起传送。

[0105] 计算装置810可包括一种或更多种处理器以执行在软件中实现的诊断设施,其可驱动处理器来执行本文中描述的诊断技术。诊断设施可存储在装置810的一种或更多种计算机可读存储介质(例如存储器)中。在另一些实施方案中,本文中描述的用于分析样品的技术可部分地或全部地在一种或更多种专用计算机组件(例如专用集成电路(ASIC))中,或通过可代替软件实现的任何其他合适形式的计算机组件来实现。

[0106] 诊断设施可接收分析的结果以及描述或识别样品806的信息,并且可将该信息存储在数据存储810A中。该信息可与对于对象802的其他信息相关联地存储在数据存储810A中,例如在关于对象802的先前样品的信息先前由诊断设施接收和存储的情况下。关于多个样品的信息可使用通用标识符(common identifier)(例如对象802的标识符)来关联。在一些情况下,数据存储810A可包括用于多个不同对象的信息。

[0107] 还可操作诊断设施以分析由用户输入识别的特定对象802的一种或更多种样品806的分析结果,以便确定对象802的诊断。诊断可以是对象802患有、可患有或可在将来发生特定病症的风险的结论。诊断设施可使用上述任何多种实例来确定诊断,包括通过将针对特定样品806确定的核酸(例如无细胞DNA)的量与一种或更多种阈值进行比较,或者通过比较针对样品806确定的核酸(例如无细胞DNA)的量相对于一种或更多种阈值随时间的变化。例如,诊断设施可通过将一个或多个样品806的核酸(例如无细胞DNA)的总量与阈值进行比较来确定对象802的病症的风险。基于与阈值的比较,诊断设施可产生指示对象802的病症的风险的输出。

[0108] 如从前述应理解的,在一些实施方案中,诊断设施可配置有不同的阈值,可将核酸(例如无细胞DNA)的量与其进行比较。例如,不同的阈值可对应于不同的人口统计组(年龄、性别、种族、经济类别、病史中特定操作/病症/其他的存在或不存在,或其他人口统计类别)、不同的病症和/或其他参数或参数的组合。在这样的一些实施方案中,诊断设施可配置成选择与其比较核酸(例如无细胞DNA)的量的阈值,其中不同的阈值存储在计算装置810的

存储器中。因此,在基于人口统计组阈值不同的一些实施方案中,可基于对象802的人口统计信息进行选择,并且在这些情况下,可将对象802的人口统计信息提供给诊断设施或使用对象802的标识符通过诊断设施检索(来自另一个计算装置,或可以是与数据存储810A相同或不同的数据储存或来自任何其他合适的来源)。作为替代或补充,可基于待确定风险的条件来进行选择,并且诊断设施可在确定风险之前接收作为输入的条件并使用该条件来选择确定风险的基础的阈值。应理解,在支持多个阈值的一些实施方案中,诊断设施不限于以任何特定方式选择阈值。

[0109] 在一些实施方案中,诊断设施可配置成输出以向用户呈现用户界面,该用户界面包括对象802的风险的诊断和/或诊断的基础。诊断的基础可包括例如对于对象802在一种或更多种样品806中检测的核酸(例如无细胞DNA)的量。在一些实施方案中,用户界面可包括上面讨论的结果、值、量、图等任何实例。它们可包括随时间推移的结果、值、量等。例如,在一些实施方案中,用户界面可并入与本文中提供的任何一幅图中所示出的相类似的图。在这种情况下,在一些情况下,可对图进行注释以向用户指示图的不同区域如何可对应于可以从图中显示的数据的分析产生的不同诊断。例如,可将图数据所针对的阈值进行比较以确定分析可施加在图上。

[0110] 与可通过其他用户界面提供的相比,特别是具有线条和/或阴影的包含图的用户界面可向用户提供更直观且更快速评阅的界面,以基于核酸(例如无细胞DNA)的量确定对象802的风险。然而,应理解,实施方案不限于用任何特定用户界面来实现。

[0111] 在一些实施方案中,诊断设施可将诊断或用户界面输出至可由对象802和/或临床医生(可以是临床医生804或其他临床医生)操作的一种或更多种其他计算装置814(包括装置814A、814B)。诊断设施可经由网络812将诊断和/或用户界面传送至装置814。

[0112] 根据本文中描述的原理操作的技术可以任何合适的方式实现。上面讨论中包括一系列流程图,示出了基于核酸(例如无细胞DNA)的量的分析来确定病症风险之多种方法的步骤和动作。上面讨论的处理和决策块(decision block)表示可包括在执行这些多种过程的算法中的步骤和动作。从这些过程导出的算法可作为与一种或更多种单用途或多用途处理器的操作集成并指导其操作的软件来实现,可作为功能等效电路(例如数字信号处理(Digital Signal Processing,DSP)电路或应用型专用集成电路(Application-Specific Integrated Circuit,ASIC))来实现,或者可以任何其他合适的方式实现。应理解,实施方案不限于任何特定电路或任何特定编程语言或编程语言类型的任何特定语法(syntax)或操作。相反,本领域技术人员可使用上面的描述来制造电路或实现计算机软件算法以执行实施本文中描述的技术类型的特定装置的处理。还应理解的是,除非本文中另有指示,否则上述步骤和/或动作的特定顺序仅是举例说明可被实现的算法,并且可在本文中描述的原理的实现和实施方案中变化。

[0113] 因此,在一些实施方案中,本文中描述的技术可体现为作为软件(包括作为应用软件、系统软件、固件、中间件、嵌入代码或任何其他合适类型的计算机代码)的计算机可执行指令来实现。这样的计算机可执行指令可使用许多合适的编程语言和/或编程或脚本工具中的任一种来编写,并且还可被编译为在框架或虚拟机上执行的可执行机器语言代码或中间代码。

[0114] 当本文中描述的技术体现为计算机可执行指令时,这些计算机可执行指令可以任

何合适的方式实现,包括作为多种功能设施,每种功能设施提供一种或更多种操作以完成根据这些技术操作的算法的执行。然而,实例化的“功能设施”是计算机系统的结构组件,当用一种或更多种计算机集成并由其执行时,使得一种或更多种计算机执行特定的操作角色。功能设施可以是软件元素的一部分或全部。例如,功能设施可根据过程、或作为离散过程,或作为任何其他合适的处理单元来实现。如果本文中描述的技术作为多种功能设施来实现,则每种功能设施可以其自己的方式实现;所有这些都不需要以同样的方式实现。另外,这些功能设施可并行和/或串行地执行(如果适当的话),并且可使用正在执行它们的计算机上的共享存储器,使用消息传递协议,或者以任何其他合适的方式在彼此之间传递信息。

[0115] 一般来说,功能设施包括执行特定任务或实现特定抽象数据类型的例程、程序、对象、组件、数据结构等。通常来说,功能设施的功能可根据期望在它们运行的系统中组合或分布。在一些实现中,执行本文中技术的一个或更多个功能设施可一起形成完整的软件包。在一些作为替代的实施方案中,这些功能设施可适于与其他不相关的功能设施和/或过程交互以实现软件程序应用。

[0116] 本文中已经描述了用于执行一个或更多个任务的一些示例性功能设施。然而,应理解,所描述的功能设施和任务划分仅是举例说明可实现本文中描述的示例性技术的功能设施的类型,并且实施方案不限于以任何特定数目、划分或功能设施的类型来实现。在一些实现中,所有功能可在单个功能设施中实现。还应理解,在一些实现中,本文中描述的一些功能设施可与其他功能设施一起实现或与其他功能设施分开实现(即,作为单个单元或单独的单元),或者可以不实现这些功能设施中的一些。

[0117] 在一些实施方案中,实现本文中描述的技术的计算机可执行指令(当作为一个或更多个功能设施或以任何其他方式实现时)可在一个或更多个计算机可读介质上编码以向介质提供功能。计算机可读介质包括磁介质例如硬盘驱动器,光学介质例如光盘(Compact Disk,CD)或数字通用盘(Digital Versatile Disk,DVD),持久或非持久性固态存储器(例如,闪存、磁性RAM等)或任何其他合适的存储介质。这样的计算机可读介质可以任何合适的方式实现,包括作为计算装置的一部分或作为独立的单独存储介质。如本文中使用的,“计算机可读介质”(也称为“计算机可读存储介质”)是指有形存储介质。有形存储介质为非暂时性的并且具有至少一个物理结构组件。在如本文中使用的“计算机可读介质”中,至少一个物理结构组件具有至少一个物理特性,该特性可在创建具有嵌入信息的介质的过程、在其上记录信息的过程、或用信息编码介质的任何其他过程期间以某种方式改变。例如,可在记录过程期间改变计算机可读介质的物理结构的一部分的磁化状态。

[0118] 在其中技术可体现为计算机可执行指令的一些但非全部实现中,这些指令可在任何合适的计算机系统中操作的一个或更多个合适的计算装置上执行,包括图2的示例性计算机系统,或者可对一个或更多个计算装置(或一个或更多个计算装置的一个或更多个处理器)进行编程以执行计算机可执行指令。计算装置或处理器可被编程为当指令以可访问计算装置或处理器的方式,例如在数据存储介质(例如,片上高速缓存或指令寄存器、通过总线访问的计算机可读存储介质等)中存储时,执行指令。包括这些计算机可执行指令的功能设施可与以下集成并指导其操作:单个多用途可编程数字计算装置、共享处理能力并且联合执行本文中描述的技术的两个或更多个多用途计算装置的协调系统、专用于执行本文中

所述技术的单个计算装置或计算装置的协调系统(共址或地理上分布式)、用于执行本文中所述技术的一个或更多个现场可编程门阵列(Field-Programmable Gate Array,FPGA)或任何其他合适的系统。

[0119] 已经描述了以电路和/或计算机可执行指令实现这些技术的实施方案。应理解,一些实施方案可以是其中已经提供了至少一个实例的方法的形式。作为方法的一部分执行的动作可以任何合适的方式排序。因此,可构造一些实施方案,其中各动作以不同于所示的顺序执行,这可包括同时执行某些动作,即使所述动作在举例说明性实施方案中作为顺序动作示出。在另一些方面,本文中提供了前述任一个,包括前述装置、系统、实施方案、方法、技术、算法、介质、硬件、软件、接口、处理器、显示器、网络、输入、输出或其任何组合。

[0120] 实施例2-总无细胞DNA(cf-DNA)与移植并发症的相关性

[0121] 使用上述方法对移植接受体的总cf-DNA进行定量。检测了总cf-DNA与不同移植并发症之间的相关性,并且图形结果显示在图3至14中。

[0122] 死亡结局分析的统计在下表1中给出。

[0123] 表1.死亡结局统计摘要

	AUC	灵敏度	特异性	截止值	重复模型
1. 总cfDNA, 全部298个	0.8664	0.786	0.793	15.96	-1.9463 + 0.0023 * 总cfDNA (p=0.03)
[0124] 2. 总cfDNA, 全部292个 { 排除机械支持 }	0.8484	0.944	0.609	8.72	-2.0805 + 0.0019 * 总cfDNA (p=0.04)
3. 来自全部(n = 88)的最后的样品	0.9385	~1.0	0.769	8.77	-3.3358 + 0.0480 * 总cfDNA (p=0.01)

[0125] 实施例3-总无细胞DNA(cf-DNA)与移植并发症的相关性

[0126] 在移植、任意排斥治疗、再入院(readmission)时间前后以及活检和/或血管造影术之前,从心脏移植接受者中前瞻性地采集血样。对cf-DNA进行定量。检测了总cf-DNA与不同移植并发症之间的相关性,并将表格和图形结果显示在图15至20中。在每毫升15纳克(ng/mL)的截止点下,活检和血管造影结果以及心脏停搏、死亡和感染的治疗均与cf-DNA水平相关。分析了来自88位接受者的298个样品。>15ng/mL的cf-DNA与死亡[p<0.001,OR 20.10 (95%CI 3.55-113.69)]和感染的治疗[p0.006,OR 3.50 (95%CI 1.36-9.03)]密切相关。抽取时总循环cf-DNA与死亡和感染的治疗密切相关。

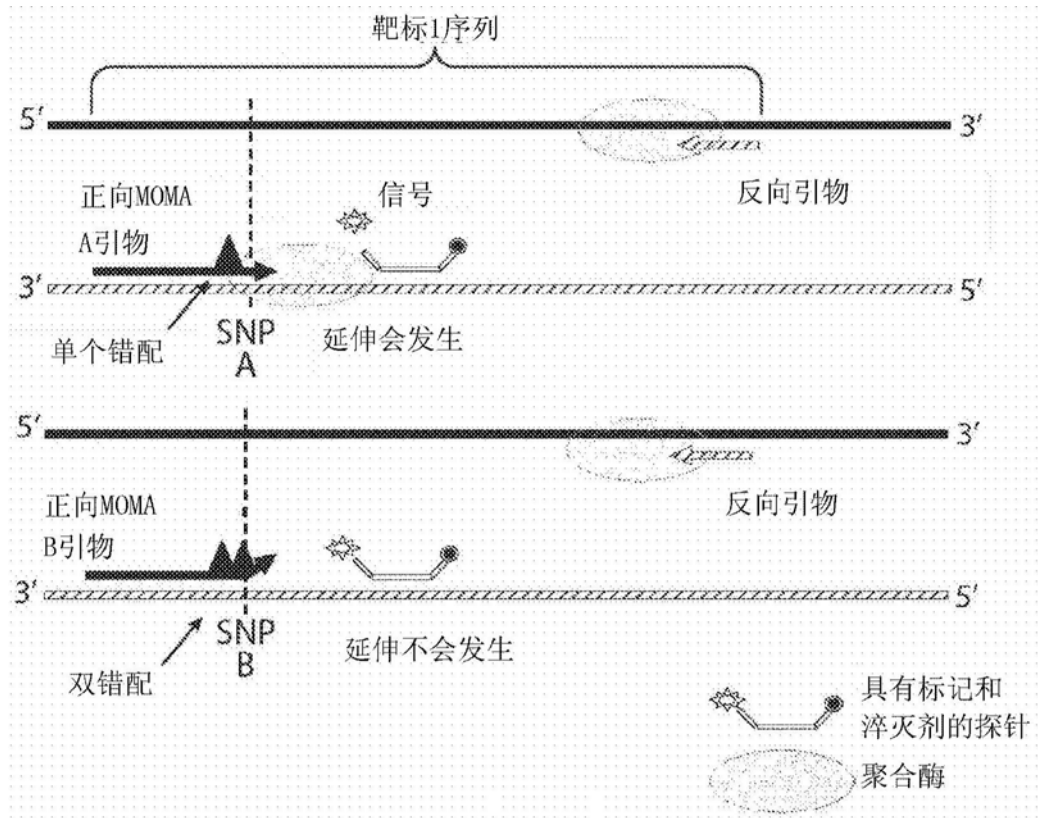


图1

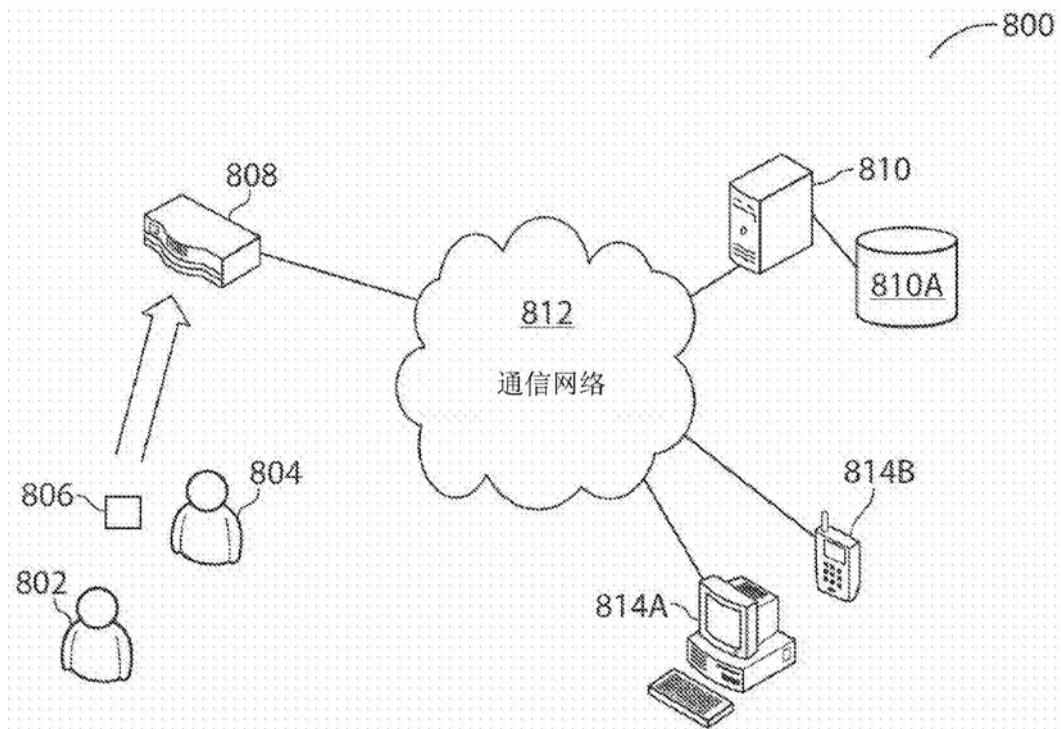


图2

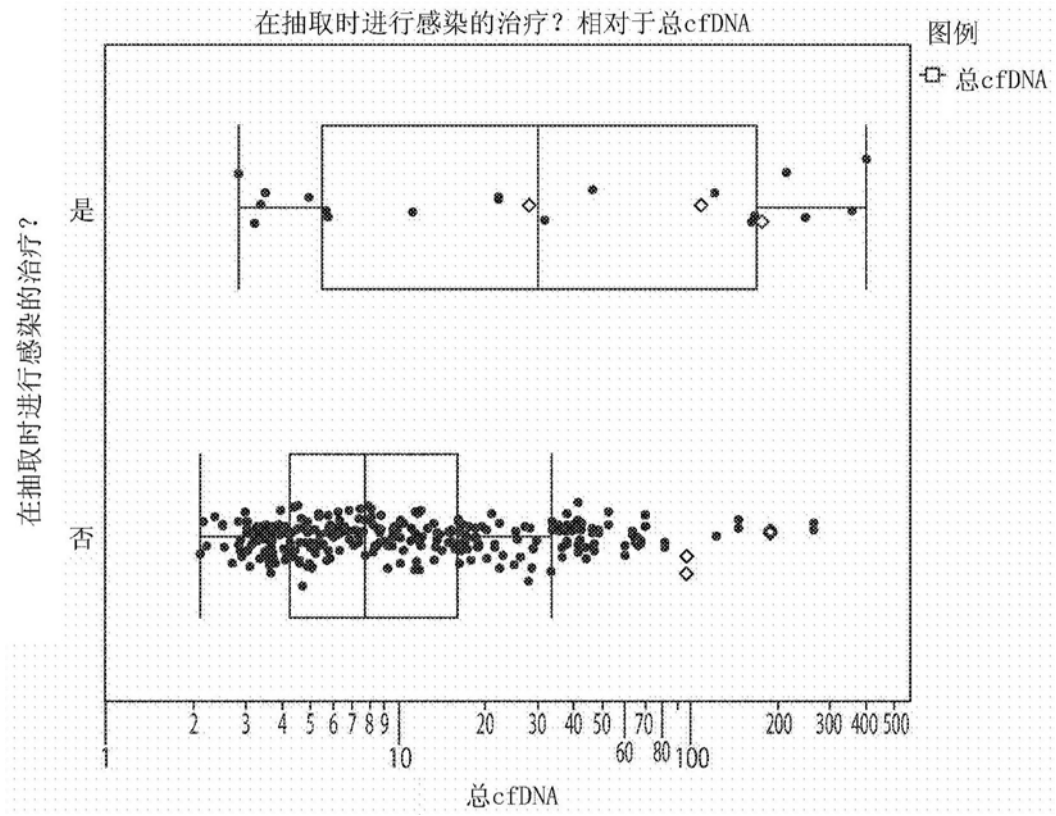


图3

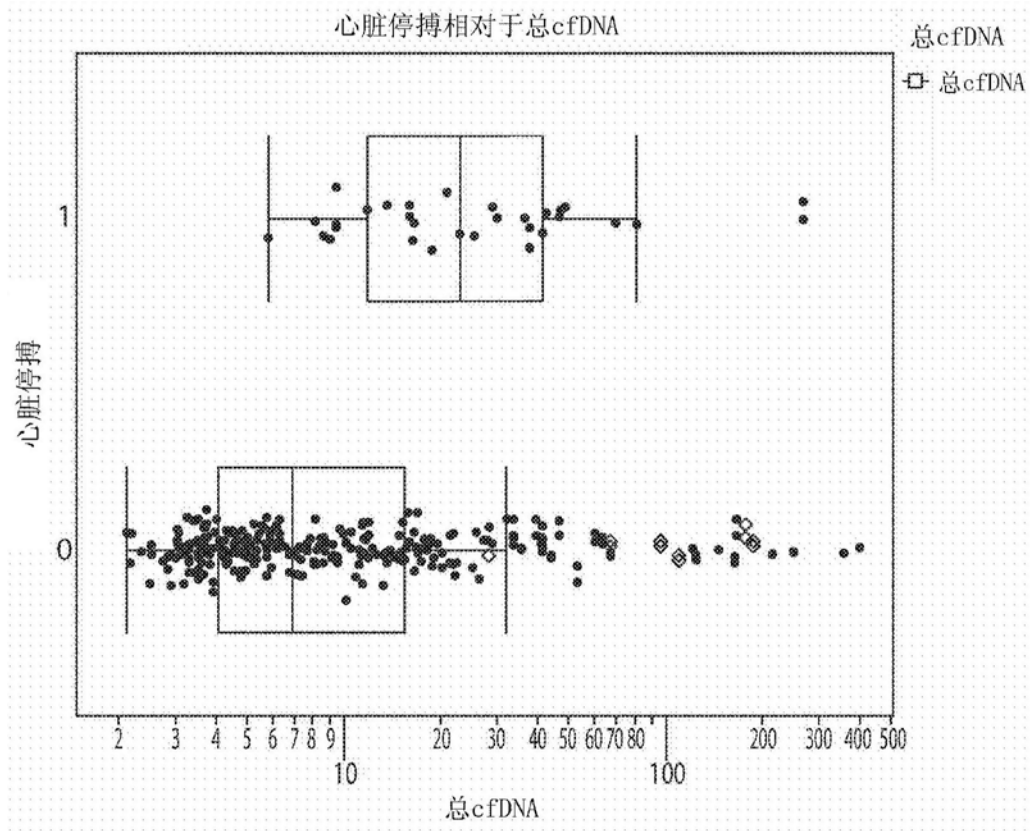


图4



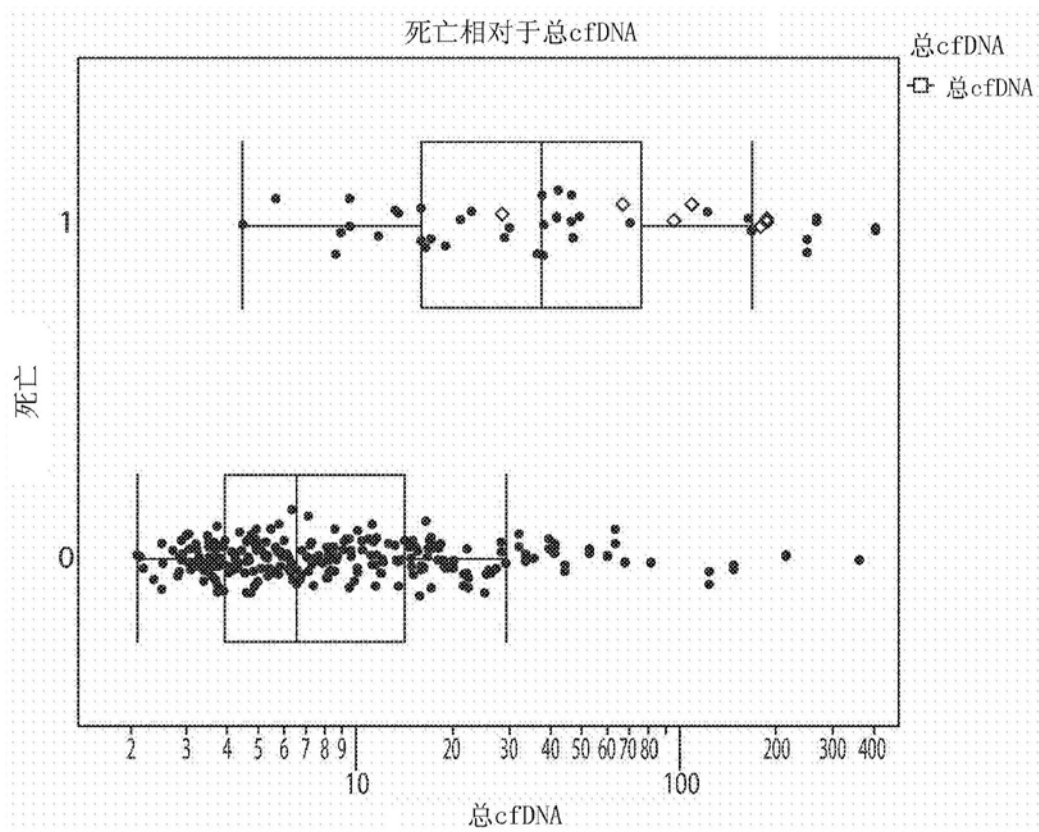
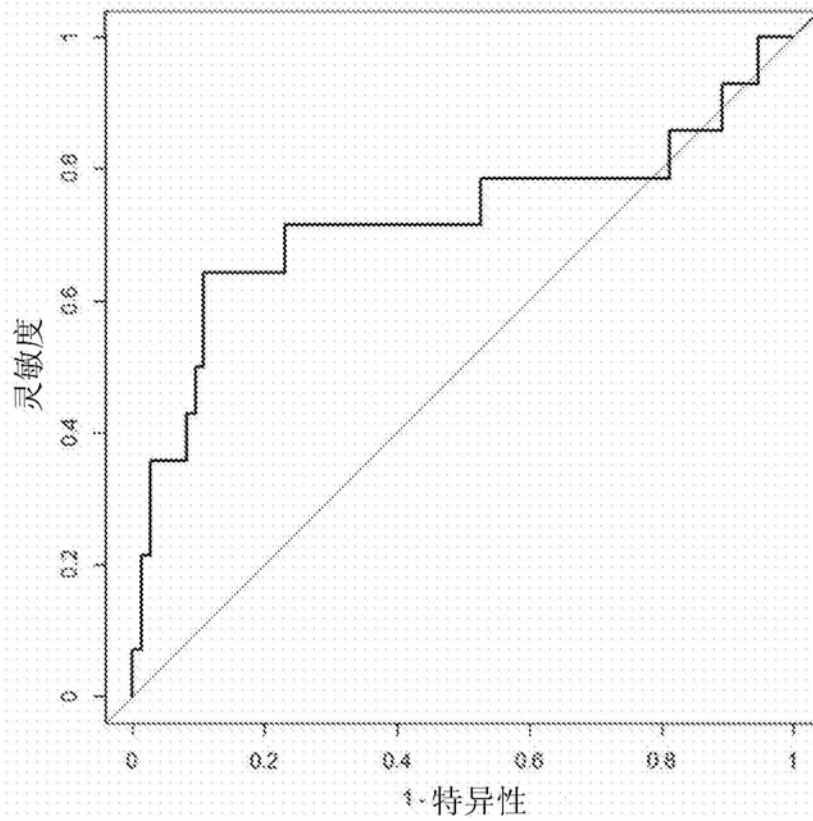


图5

### 3. 感染 (y) - 总cfDNA (每个对象1个样品-n = 88)

来自全部样品中的最后的样品 - 来自其他样品中的最后的感染样品和最后样品

$$-2.1845 + 0.0137 * \text{总cfDNA} \{p=0.003\}$$



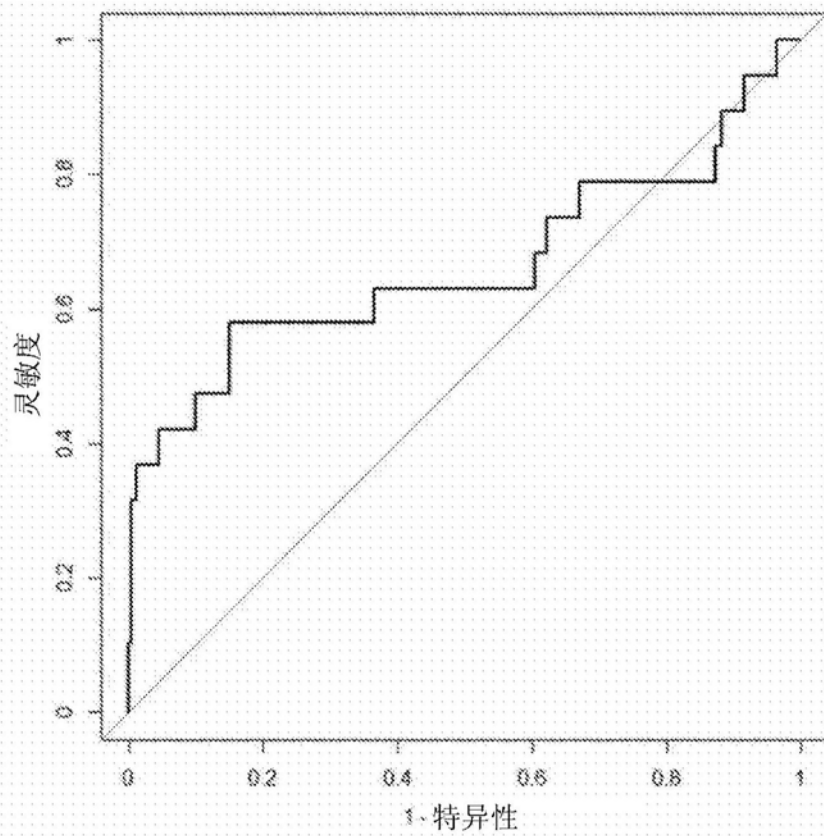
AUC = 0.723  
灵敏度 = 0.643  
特异性 = 0.892  
截止值 = 20.39

图6

**2. 感染 (y) - 总cfDNA (机械支持排除在外)**

6个机械支持样品被排除在外

$-3.0684 + 0.0159 * \text{总cfDNA}$  ( $p < 0.0001$ )



AUC = 0.6649  
灵敏度 = 0.579  
特异性 = 0.850  
截止值 = 21.67

图7

**1. 停搏-总cfDNA (全部298个样品)**

使用了全部298个

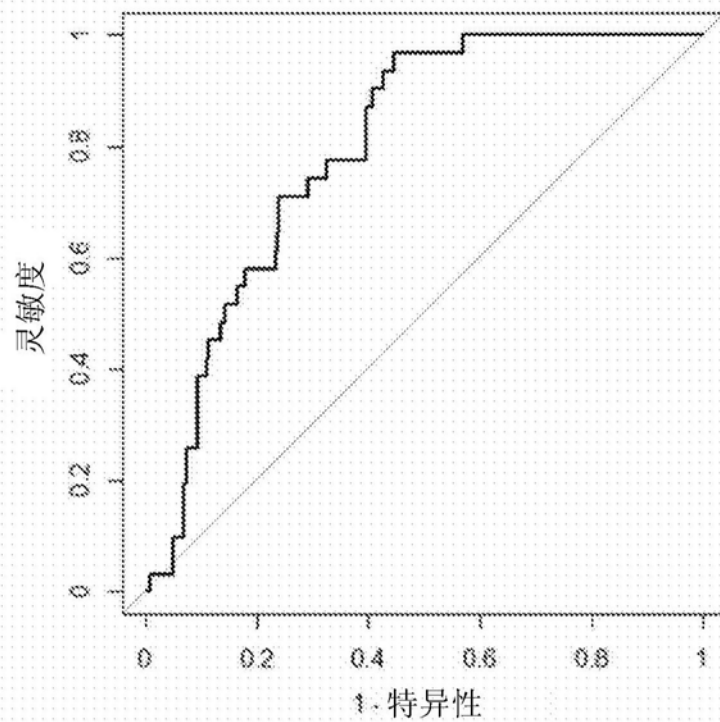
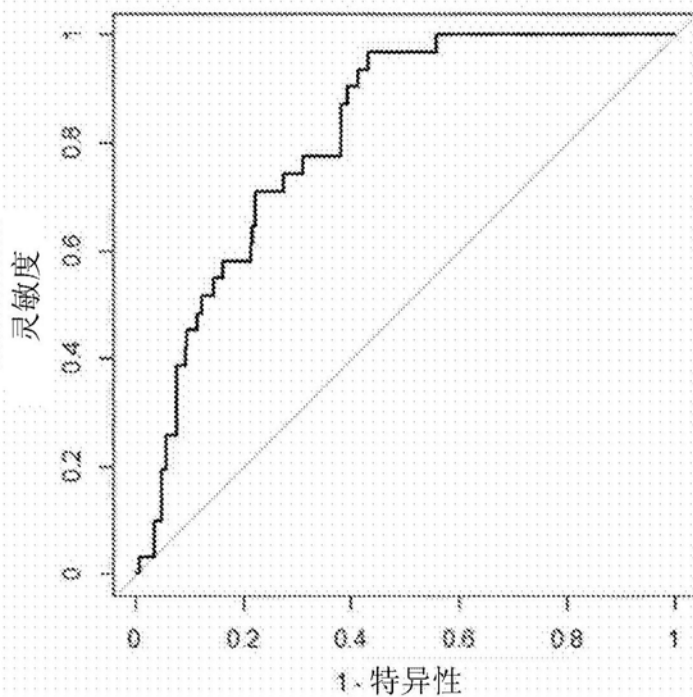
 $-2.3156 + 0.0005 * \text{总cfDNA}$  ( $p=0.04$ )AUC  $\approx 0.7974$ 灵敏度  $\approx 0.968$ 特异性  $\approx 0.554$ 截止值  $\approx 8.18$ 

图8

**2. 停搏-总cfDNA（在排除了机械支持之后的292个样品）**

使用了全部292个

$-2.3036 + 0.0005 * \text{总cfDNA}$  ( $p=0.04$ )



AUC = 0.8131

灵敏度 ≈ 0.968

特异性 ≈ 0.567

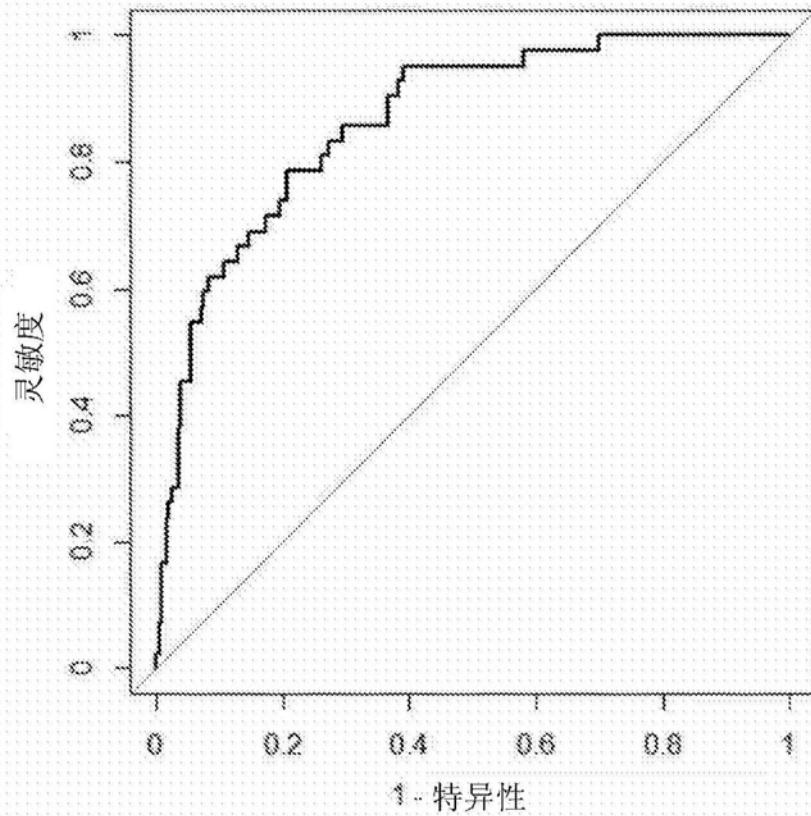
截止值 ≈ 9.06

图9

**1. 死亡-总cfDNA（全部298个样品）**

使用了全部298个

$$-1.9463 + 0.0023 * \text{总cfDNA} (p=0.03)$$



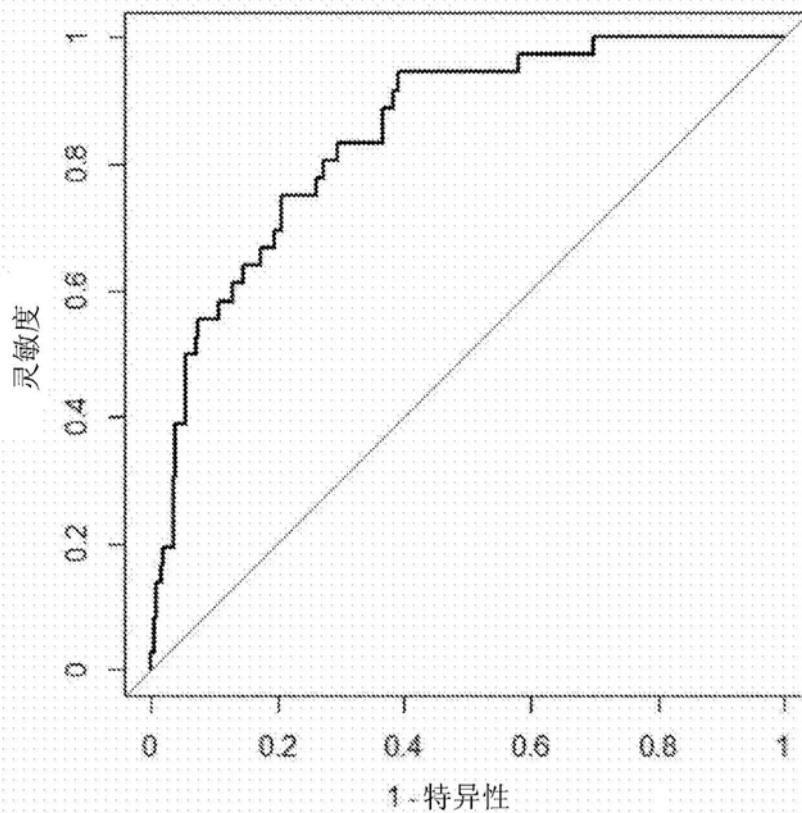
AUC = 0.8664  
灵敏度 = 0.786  
特异性 = 0.793  
截止值 = 15.96

图10

**2. 死亡-总cfDNA（机械支持排除在外）**

6个机械支持样品被排除在外

$-2.0805 + 0.0019 * \text{总cfDNA}$  ( $p=0.04$ )



AUC = 0.8484

灵敏度 = 0.944

特异性 = 0.609

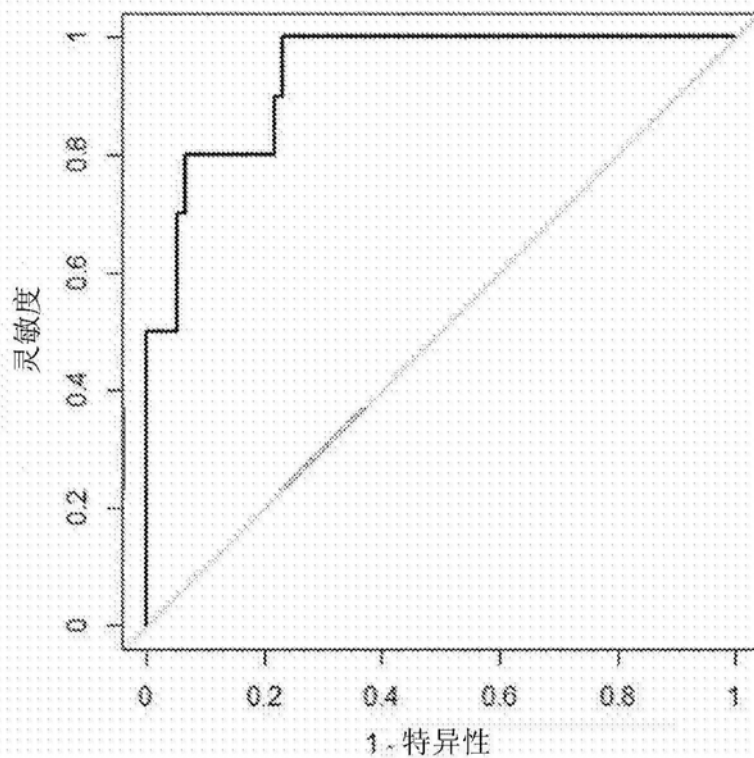
截止值 = 8.72

图11

**3. 死亡-总cfDNA (每个对象1个样品-n = 88)**

来自全部的最后的样品 (N=88)

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



AUC = 0.9385

灵敏度 ~1.0

特异性 = 0.769

截止值 = 8.77

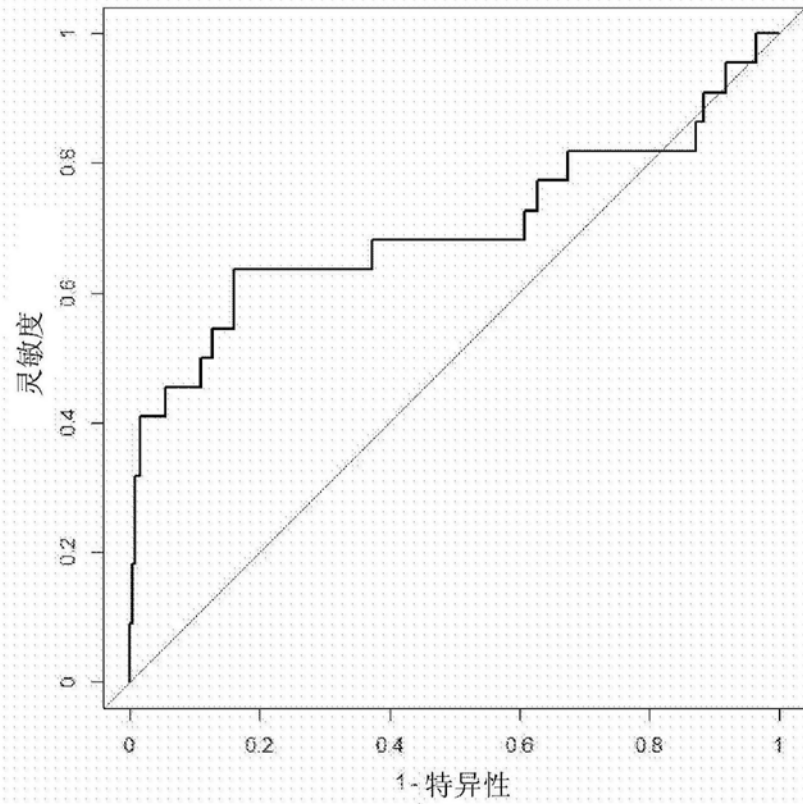
图12



**1. 感染 (y) - 总cdDNA (全部298个样品)**

使用了全部298个

$$-2.9484 + 0.0146 * \text{总cdDNA} \quad (p < 0.0001)$$



AUC = 0.7006

灵敏度 = 0.636

特异性 = 0.833

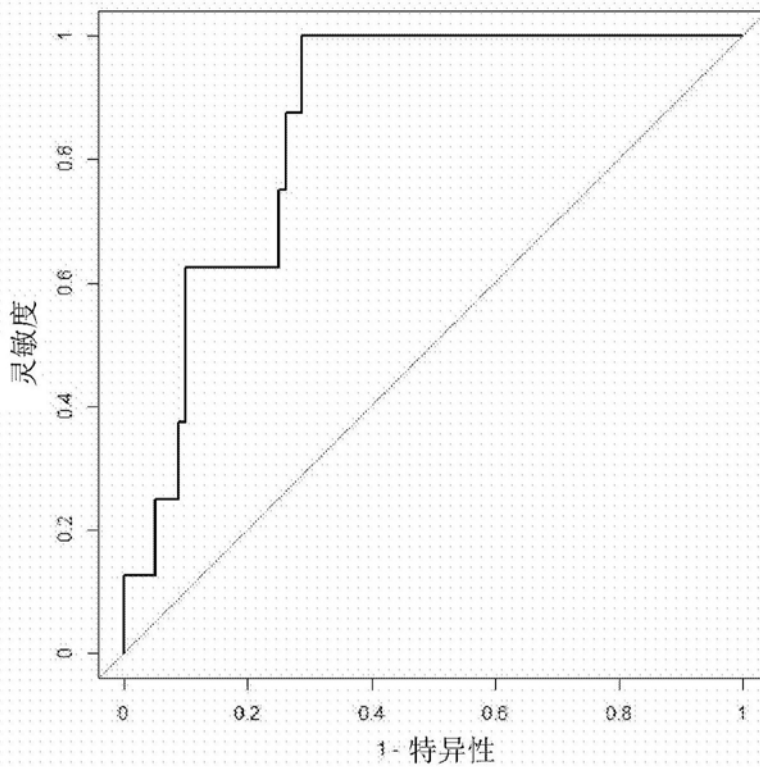
截止值 = 21.18

图13

停搏-总cfDNA (每个对象1个样品-n = 88)

来自全部的最后的样品 (N=88)

$-2.6123 + 0.0101 * \text{总cfDNA}$  ( $p=0.05$ )



AUC = 0.8578

灵敏度 ~ 1

特异性 = 0.712

截止值 = 8.18

图14

	死亡		p值
	否	是	
总cFDA			
N	77	8	
中位数 [IQR]	4.98 [3.70, 8.19]	75.56 [14.84, 204.98]	<0.001
每次加倍时的OR (95%CI)*		3.17 (1.71, 5.91)	<0.001
*每次cFDA的加倍时，存活的相对于死亡的优势比			
参比变量		死亡	
分类变量:		总cFDA	
经验最优截止值 (95%CI)		8.62 (3.48, 21.38)	p<0.001
截止值处的灵敏度:		1.00	
截止值处的特异性:		0.79	
截止值处的ROC曲线下面积		0.90	
PPV		33.3% (24.4, 43.6)	
NPV		100%	

图15

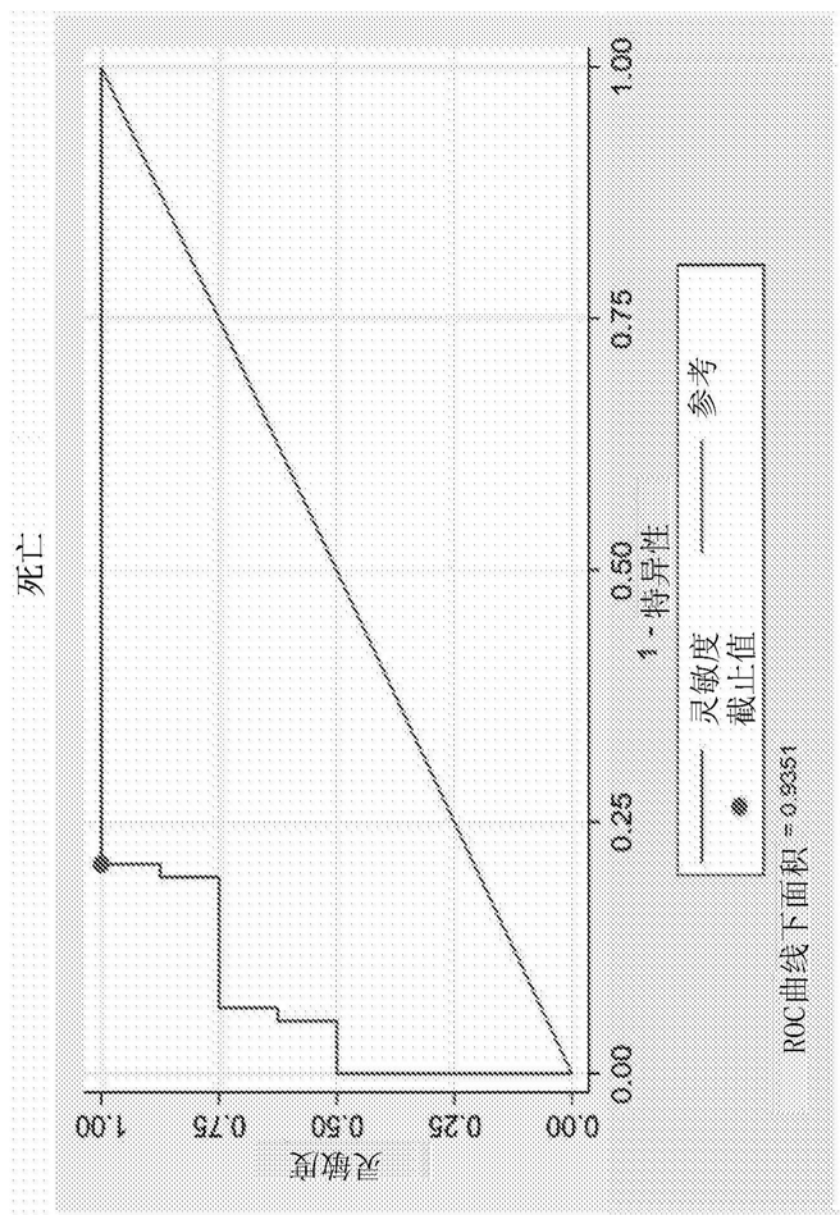


图16

	心脏停搏		p值
	否	是	
总cFDNA			
N	77	5	
中位数[IQR]	5.00 [3.78, 8.51]	9.51 [9.03, 20.96]	0.012
每次加倍时的OR (95%CI)*	1.61 (0.99, 2.63)		0.056
*每次cFDNA的加倍时，存活的相对于死亡的优势比			
参比变量		心脏停搏	
分类变量:		总cFDNA	
经验最优截止值 (95%CI)		8.17 (5.21, 12.81)	p<0.001
截止值处的灵敏度:		1.00	
截止值处的特异性:		0.73	
截止值处的ROC曲线下面积		0.86	
PPV		19.2% (14.2, 25.5)	
NPV		100%	

图17

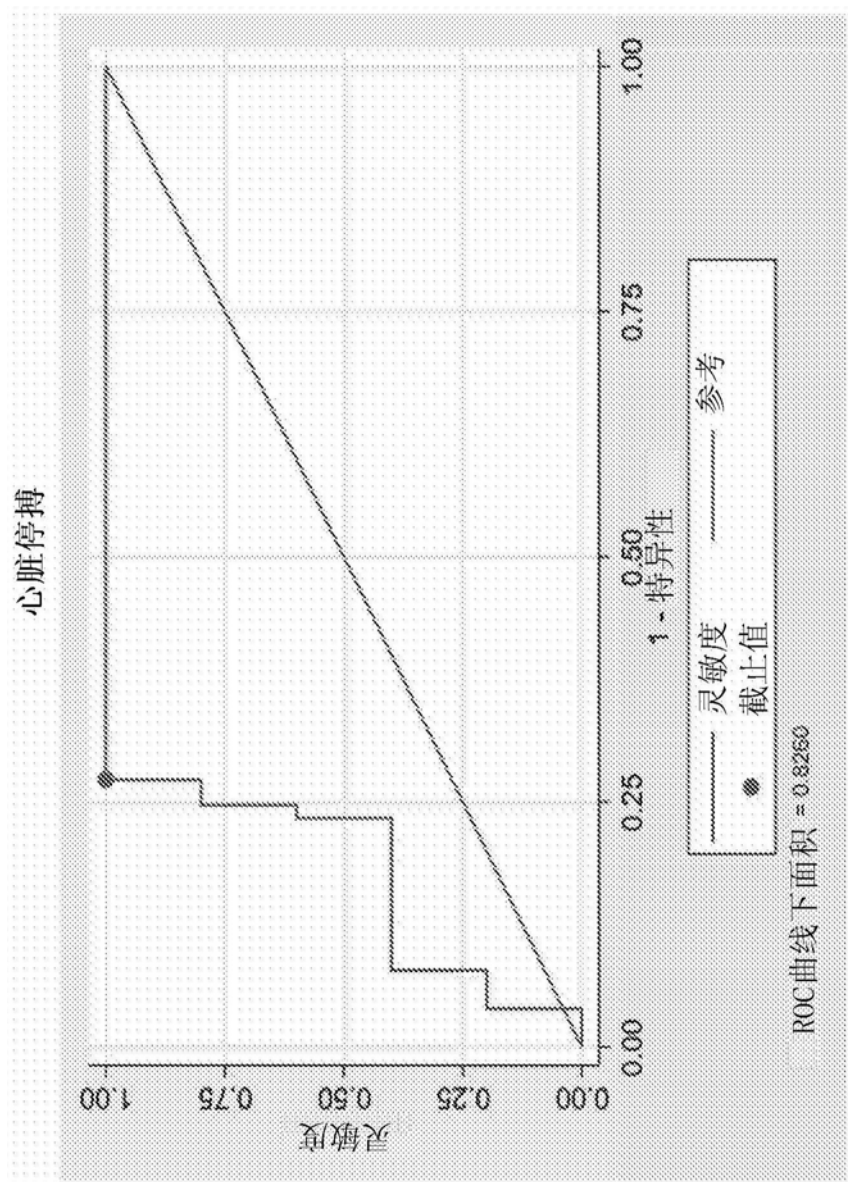


图18

	在抽取时进行治疗		零假设		统计检验
	否	是	在整个感染的治疗期间，中位数是相同的		
N	中位数 [IQR] 273	中位数 [IQR] 19			
总cfDNA	7.67 [4.29, 15.94]	21.97 [4.98, 166.07]	p=0.343		独立样本中位数检验
截止值估计					
参比变量		感染			
分类变量:		总cfDNA			
经验最优截止值 (95%CI)		21.44 (10.17, 45.18)	p<0.001		
截止值处的灵敏度:		0.58			
截止值处的特异性:		0.85			
截止值处的ROC曲线下面积		0.71			
PPV		21.2% (14.3, 30.2)			
NPV		96.7% (94.5, 98.0)			

图19

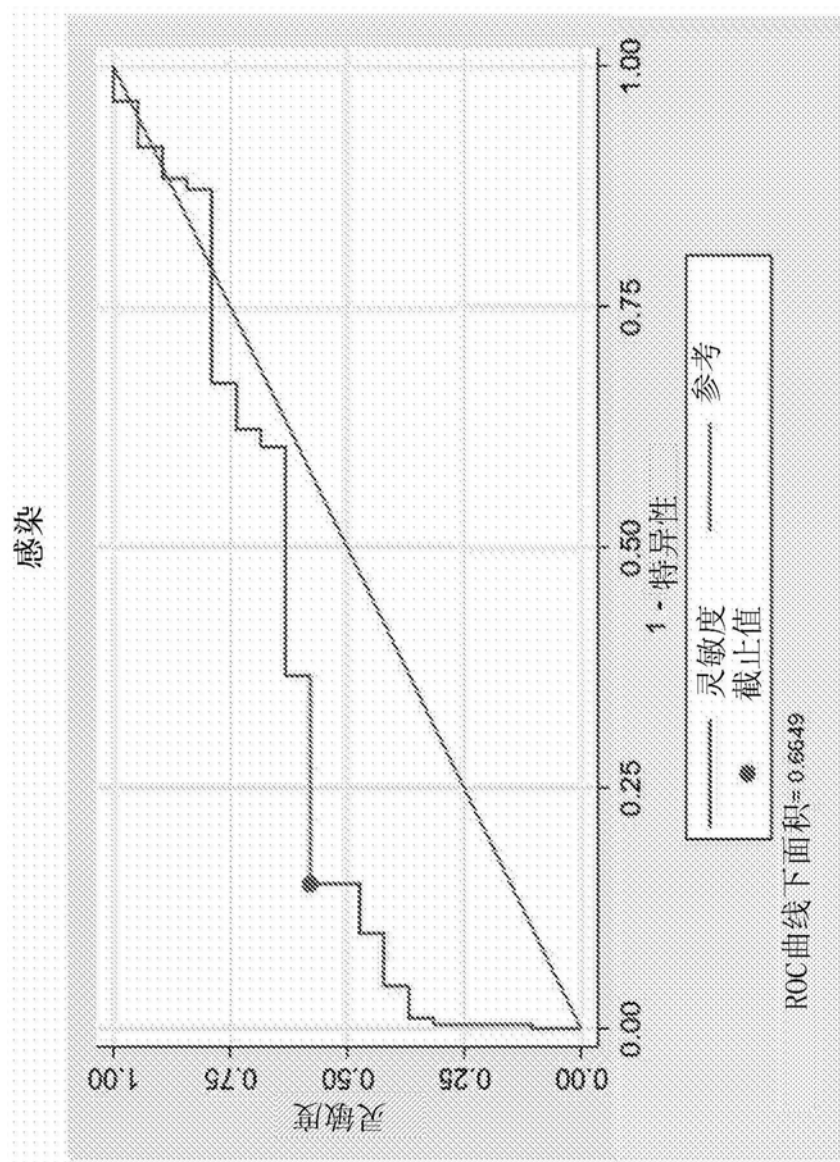


图20