SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) **SK**

ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

# ZVEREJNENÁ PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

(22) Dátum podania prihlášky: **24. 8. 2017**
(31) Číslo prioritnej prihlášky:
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky:
(33) Krajina alebo regionálna organizácia priority:
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: **4. 5. 2020**
Vestník ÚPV SR č.: **05/2020**
(62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade vylúčenej prihlášky:
(67) Číslo pôvodnej prihlášky úžitkového vzoru v prípade odbočenia:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky podľa PCT:
(96) Číslo európskej patentovej prihlášky:

(21) Číslo dokumentu:
**86-2017**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. (2020.01):
**G16B 20/00**

(71) Prihlasovateľ: **Grendár Marian, doc. Mgr., PhD., Kremnica, SK;**
**Loderer Dušan, RNDr., Brusno, SK;**
**Lasabová Zora, doc. RNDr., PhD., Martin, SK;**
**Danko Ján, prof. MUDr., CSc., Martin, SK;**

(72) Pôvodca: **Grendár Marian, doc. Mgr., PhD., Kremnica, SK;**
**Loderer Dušan, RNDr., Brusno, SK;**
**Lasabová Zora, doc. RNDr., PhD., Martin, SK;**
**Danko Ján, prof. MUDr., CSc., Martin, SK;**

(54) Názov: **Spôsob použitia fetálnej frakcie a chromozómovej reprezentácie pri určovaní aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní**

(57) Anotácia:
Opísaná je metóda na určenie aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní na základe fetálnej frakcie *f* a chromozómovej reprezentácie *t*. Metóda používa trojuholník neurčitosti pre trizómiu a trojuholník neurčitosti pre monozómiu, t. j. množiny hodnôt dvojíc *(f, t)*, pre ktoré nie je možné rozhodnúť o aneuploidnom stave.

SK 86-2017 A3

## Oblasť techniky

Vynález sa týka neinvazívneho prenatálneho testovania (medzinárodná klasifikácia G06F19/10, G06F19/24, C12Q1/68). Konkrétne ide o spôsob ako využiť fetálnu frakciu a chromozómovú reprezentáciu pri určení aneuploidného stavu a zvýšiť tak detekčnú schopnosť neinvazívneho prenatálneho testovania.

## Doterajší stav techniky

Ak je fetálna frakcia vyššia než detekčná medza, je možné pomocou neinvazívneho prenatálneho testovania stanoviť prítomnosť aneuploidie na základe chromozómovej reprezentácie získanej celogenómovým masívnym paralelným sekvenovaním (US2016224724, EP2981921). Ak je však fetálna frakcia nižšia než detekčná medza, tak je analyzovaná vzorka prehlásená za nerozhodnú, bez ohľadu na hodnotu chromozómovej reprezentácie [1].

[1] Tamminga S, a kol. Maternal Plasma DNA and RNA Sequencing for Prenatal Testing. Advances in clinical chemistry. 2016;74:63-102.

Hlavným cieľom tohto vynálezu je poskytnúť metódu na určenie aneuploidného stavu v prenatálnom neinvazívnom testovaní bežných anuploídií, ktorá berie do úvahy fetálnu frakciu *f* ako aj chromozómovú reprezentáciu *t*.

## Podstata vynálezu

Opísaná je metóda, ktorá na určenie aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní používa fetálnu frakciu ako aj chromozómovú reprezentáciu. Podľa opísanej metódy aneuploidný stav nie je možné určiť vtedy, keď fetálna frakcia *f* a chromozómová reprezentácia *t* patria do Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu (TNT) alebo do Trojuholníka Neurčitosti pre Monozómiu (TNM). Výsledkom tejto metódy je zvýšenie detekčnej schopnosti neinvazívneho prenatálneho testovania.

Pojmy a definície

- DNA – deoxyribonukleová kyselina
- Voľná cirkulujúca DNA (cfDNA) – fragmenty DNA s rôznou dĺžkou, ktoré sa nenachádzajú v jadre buniek, ale sú lokalizované v telových tekutinách (moč, plazma, sérum)
- Voľná cirkulujúca fetálna DNA (cffDNA) – DNA fragmenty fetálneho pôvodu, ktoré sa nachádzajú v plazme tehotných žien
- Fetálna frakcia (*f*) – množstvo cffDNA, ktoré sa nachádza v celkovom množstve cfDNA (vyjadrené v percentách)
- Nukleotid – základná stavebná jednotka nukleových kyselín (DNA)
- Sekvenovanie – určenie primárnej štruktúry DNA, t. j. presného poradia nukleotidov v DNA
- Masívne paralelné sekvenovanie (MPS) – simultánne, masívne, paralelné sekvenovanie extrémne veľkého množstva DNA molekúl, ktorého výsledkom sú tzv. sekvenačné čítania
- Čítanie – úsek DNA pochádzajúci z konkrétneho chromozómu, osekvenovaný pomocou MPS s určitou dĺžkou
- Chromozóm – útvar v bunkovom jadre, pozostávajúci z jednej alebo dvoch molekúl DNA
- Autozóm – chromozóm, ktorý nepatrí medzi pohlavné chromozómy (u človeka 22 rôznych typov)
- Haploidný stav (n) – počet chromozómov v pohlavných bunkách (23 v ľudských pohlavných bunkách)
- Euploídia – štandardný počet chromozómov v bunke (ľudská telová bunka má 46 chromozómov)
- Aneuploídia – počet chromozómov je zmenený, čo má vo väčšine prípadov za následok vznik vážnych vývinových porúch
- Určiť aneuploidný stav – stanoviť, či plod je euploidný alebo aneuploidný
- Monozómia – počet chromozómov je 2n-1 (45 chromozómov)
- Trizómia – počet chromozómov je 2n+1 (47 chromozómov)
- Euploidný na chromozóme – daný chromozóm je prítomný v bunke v dvoch kópiách
- Trizomický na chromozóme – daný chromozóm je prítomný v bunke v troch kópiách
- Monozomický na chromozóme – daný chromozóm je prítomný v bunke v jednej kópii
- Bežné aneuploídie – trizómia 21 (prítomnosť troch chromozómov 21), trizómia 18 (prítomnosť troch chromozómov 18), trizómia 13 (prítomnosť troch chromozómov 13), monozómia 21 (prítomnosť jedného chromozómu 21), monozómia 18 (prítomnosť jedného chromozómu 18), monozómia 13 (prítomnosť jedného chromozómu 13)

• Chromozómová reprezentácia (*t*) – počet čítaní, ktoré pochádzajú z konkrétneho chromozómu, alebo subregiónov daného chromozómu. Nazýva sa tiež chromozómový počet čítaní

• Detekčná medza – anglicky, Limit of Detection (LoD). Hodnota fetálnej frakcie, pod ktorou sa podľa štandardnej metódy na určenie aneuploidného stavu nedá tento stav určiť. Detekčná medza sa dá stanoviť napríklad experimentálne. Typicky sa považuje za blízku k 4 percentám

• Nerozhodná vzorka, nerozhodný prípad, 'no call' – to isté čo plod, u ktorého sa neinvazívnym prenatálnym testovaním nevie stanoviť jeho aneuploidný stav

• Štandardná metóda na určenie aneuploidného stavu – metóda neinvazívneho prenatálneho testovania, pri ktorej sa vzorka považuje za nerozhodnú, ak fetálna frakcia je nižšia než detekčná medza; a to bez ohľadu na chromozómovú reprezentáciu.

Hlavným cieľom tohto vynálezu je poskytnúť metódu na určenie aneuploidného stavu v prenatálnom neinvazívnom testovaní bežných anuploídií, ktorá berie do úvahy fetálnu frakciu *f* ako aj chromozómovú reprezentáciu *t*.

Tento cieľ je dosiahnutý pomocou tohto vynálezu, ktorý zahŕňa stanovenie, či dvojica (*f, t*) patrí do Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu (TNT), alebo do Trojuholníka Neurčitosti pre Monozómiu (TNM). TNT a TNM sú založené na korešpondencii medzi chromozómovou reprezentáciou a kompozíciou materskej voľnej DNA, ktorá je základom neinvazívneho prenatálneho testovania. Ak kompozícia cfDNA je taká, že pre trizomické tehotenstvo trojica chromozómov plodu tvorí *f* percent, a dvojica chromozómov matky tvorí *1-f* percent, potom výsledná chromozómová reprezentácia *t* je

$$t = (1 - f) * t^E + 1.5 * f * t^E, \quad (*)$$

kde $t^E$ je chromozómová reprezentácia euploidnej matky. V dôsledku technickej variability MPS varírujú hodnoty $t^E$ v určitom rozmedzí $[t^E_{min}, t^E_{max}]$. Táto variabilita sa prostredníctvom (*) prenáša do variability trizomických vzoriek. Z tohto dôvodu môže pre trizomickú vzorku, pre určité hodnoty fetálnej frakcie *f*, ležať jej chromozómová reprezentácia *t* v rozsahu $[t^E_{min}, t^E_{max}]$. Takže, pre určité hodnoty (*f, t*) nie je možné určiť aneuploidný stav. Tieto hodnoty tvoria TNT. Analogickou úvahou sa dospeje k TNM.

Trojuholník Neurčitosti pre Trizómiu je tvorený všetkými takými dvojicami (*f, t*) hodnôt fetálnej frakcie *f* a chromozómovej reprezentácie *t*, pre ktoré:

$$f \leq f^T_{LoD} \quad (1a)$$

$$t \geq (1 + 0.5 * f) * t^E_{min} \quad (1b)$$

$$t \leq t^E_{max} \quad (1c)$$

Pričom, $f^T_{LoD}$ je detekčná medza pre trizómiu, $t^E_{min}$ je minimálna hodnota chromozómovej reprezentácie v euploidných vzorkách, a $t^E_{max}$ je maximálna hodnota chromozómovej reprezentácie v euploidných vzorkách. Detekčná medza pre trizómiu $f^T_{LoD}$ je stanovená pomocou nasledovného vzorca:

$$f^T_{LoD} = \left(\frac{t^E_{max}}{t^E_{min}} - 1\right) * 2 \quad (4)$$

Trojuholník Neurčitosti pre Monozómiu je tvorený všetkými takými dvojicami (*f, t*) hodnôt fetálnej frakcie *f* a chromozómovej reprezentácie *t*, pre ktoré:

$$f \leq f^M_{LoD} \quad (5a)$$

$$t \leq (1 - 0.5 * f) * t^E_{max} \quad (5b)$$

$$t \geq t^E_{min} \quad (5c)$$

Pričom, $f^M_{LoD}$ detekčná medza pre monozómiu, $t^E_{min}$ je minimálna hodnota chromozómovej reprezentácie v euploidných vzorkách, a $t^E_{max}$ je maximálna hodnota chromozómovej reprezentácie v euploidných vzorkách. Detekčná medza pre monozómiu $f^M_{LoD}$ je stanovená pomocou nasledovného vzorca:

$$f^M_{LoD} = \left(\frac{t^E_{min}}{t^E_{max}} - 1\right) * 2 \quad (6)$$

Chromozómová reprezentácia sa dá určiť pomocou čítaní z celogenómového masívneho paralelného sekvenovania, ktoré sú namapované k referenčnému ľudskému genómu, s možným následným filtrovaním, predspracovaním (napr. pomocou GC korekcie), normalizáciou (napr. podelením počtom čítaní nachádzajúcich sa v autozómoch).

Chromozómová reprezentácia sa môže týkať celého chromozómu alebo jeho dizjunktných podúsekov, t. j. segmentov. Odhad minimálnej a maximálnej hodnoty chromozómovej reprezentácie v euploidnej populácii je možné získať na základe vzoriek z euploidnej populácie. Fetálna frakcia sa dá stanoviť laboratórne alebo pomocou *in silico* algoritmov, napríklad seqFF.

Ak sú obdržané nasledovné údaje o vzorke: i) chromozómová reprezentácia *t* chromozómu alebo jeho dizjuntkných podúsekov, ii) fetálna frakcia *f*, a iii) minimálna a maximálna hodnota chromozómovej reprezentácie vo vzorkách s potvrdeným euploidným stavom, tak potom na stanovenie aneuploidného stavu môže byť použitý nasledovný rozhodovací strom:

Ak (*f, t*) sú také, že:

a) ($t > t^E_{max}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako trizomický

b) ($t > t^E_{min}$) potom aneuploidný stav je stanovený ako monozomický

c) (*f, t*) patria do TNT, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
d) (*f, t*) patria do TNM, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
e) ináč; potom aneuploidný stav je stanovený ako euploidný na danom chromozóme.

TNT je možné ekvivalentne formulovať pomocou z-skóre, t. j., škálovanej chromozómovej reprezentácie. Vznikne tak z-skórový Trojuholník Neurčitosti pre Trizómiu (zTNT), daný súčasným splnením nasledovných troch podmienok:

$$f \leq f^{T}_{LoD,z} \quad (7a)$$

$$z \geq k_f * z^{E}_{min} + (k_f - 1) * \mu^{E} / \sigma^{E} \quad (7b)$$

$$z \leq z^{E}_{max} \quad (7c)$$

Pričom, $z$ je z-skóre vzorky, dané ako

$$z = (t - \mu^{E}) / \sigma^{E}$$

kde $t$ je chromozómová reprezentácia, $\mu^{E}$ je odhad polohy rozdelenia chromozómovej reprezentácie (typicky, priemer alebo medián) v populácii euploidnej na danom chromozóme, a $\sigma^{E}$ je odhad škály rozdelenia chromozómovej reprezentácie (typicky smerodajná odchýlka alebo interkvartilový rozsah) v populácii euploidnej na danom chromozóme. Ďalej,

$$k_f = 1 + 0.5 * f,$$

a z-skórová detekčná medza pre trizómiu na danom chromozóme $f^{T}_{LoD,z}$ je

$$f^{T}_{LoD,z} = \frac{2 * (z^{E}_{max} - z^{E}_{min})}{z^{E}_{min} + \mu^{E} / \sigma^{E}}$$

a je minimálna hodnota z-skóre na danom chromozóme v euploidných vzorkách, $z^{E}_{max}$ je maximálna hodnota z-skóre na danom chromozóme v euploidných vzorkách.

Obdobne sa dá TNM ekvivalentne vyjadriť pomocou z-skóre. Vznikne tak z-skórový Trojuholník Neurčitosti pre Monozómiu (zTNM).

Horeuvedený rozhodovací strom je možné ekvivalentne formulovať pomocou zTNT a zTNM, a to nasledovným spôsobom. Ak z-skóre $z$ a fetálna frakcia $f$ sú také, že:

a) ($z > z^{E}_{max}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako trizomický,
b) ($z < z^{E}_{min}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako monozomický,
c) *(f, z)* patria do zTNT, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
d) *(f, z)* patria do zTNM, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
e) ináč; potom aneuploidný stav je stanovený ako euploidný na danom chromozóme.

## Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1: schematické zobrazenie Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu. Vrcholy TNT sú: (0, $t^{E}_{min}$), (0, $t^{E}_{max}$), ($f^{T}_{LoD}$, $t^{E}_{max}$).

Obrázok 2: Z-skórový Trojuholník Neurčitosti pre Trizómiu. Štvorčekom a číslicou ‘1’ je označená vzorka z Príkladu 1

Obrázok 3: Z-skórový Trojuholník Neurčitosti pre Trizómiu. Štvorčekom a číslicou ‘2’ je označená vzorka, z Príkladu 2

Obrázok 4: Z-skórový Trojuholník Neurčitosti pre Trizómiu. Štvorčekom a číslicou ‘3’ je označená vzorka z Príkladu 3

## Príklady uskutočnenia vynálezu

Príklad 1

Krok 1) Masívne paralelné sekvenovanie, bioinformatické spracovanie: namapovanie čítaní, filtrovanie, binning, chromozómová reprezentácia

Voľná cirkulujúca DNA zo vzorky krvi tehotnej ženy bola osekvenovaná technológiou masívneho paralelného sekvenovania. Výsledné čítania boli namapované k ľudskému genómu hg19 pomocou algoritmu bowtie2.

Z týchto čítaní boli následne vyfiltrované tie čítania, ktoré boli duplikátne, alebo nekvalitne namapované. Následne boli čítania rozdelené do binov o veľkosť 50 kbp (kilo bázových párov). Celkový počet čítaní vo vybranej podmnožine binov bol normalizovaný celkovým počtom čítaní namapovaných na všetky autozómy. Takto bola získaná chromozómová reprezentácia pre chromozóm 21, rovná $t$ = 0.007476537.

Krok 2) Stanovenie minimálnej a maximálnej chromozómovej reprezentácie v podmnožine euploidných tehotenstiev

V sade 99 vzoriek s potvrdenou euploídiou na chromozóme 21 bola minimálna hodnota chromozómovej reprezentácie v tej istej podmnožine binov, ako v Kroku 1, rovná $t^E_{min}$ = 0.007282826. Maximálna hodnota bola $t^E_{max}$ = 0.007416512. Čo podľa vzorca (2) dáva detekčnú medzu pre trizómiu 21, $f^{T21}_{LoD}$ = 0.03671255, t. j., 3.67 %.

Krok 3) Stanovenie fetálnej frakcie

Fetálna frakcia pre analyzované tehotenstvo bola odhadnutá metódou seqFF, vyvinutou firmou Sequenom. Hodnota fetálnej frakcie bola *f*= 0.02899, t. j., 2.9 %.

Krok 4) Určenie aneuploidného stavu

Hodnota fetálnej frakcie *f* je nižšia než detekčná medza $f^{T21}_{LoD}$ nakoľko 0.02899 < 0.03671255. Takže táto vzorka by podľa tradičného postupu na určovanie aneuploidného stavu bola prehlásená za nerozhodnú; 'no call'.

Keď použijeme rozhodovací strom, ktorý sme zaviedli vyššie, tak zistíme, že analyzovaná vzorka patrí do prípadu a), nakoľko chromozómová reprezentácia *t* = 0.007476537 je vyššia než $t^E_{max}$ = 0.007416512. To znamená, že danú vzorku rozhodovací strom prehlási za trizomickú.

Ten istý záver získame, v prípade, že použijeme ekvivalentné vyjadrenie rozhodovacieho stromu, využívajúce namiesto chromozómovej reprezentácie z-skóre. Keďže $\mu^{E21}$ = 0.007355081 a $\sigma^{E21}$ = 2.787415*e* − 05, tak z-skóre uvažovanej vzorky je 4.357. Maximálna hodnota z-skóre vo vzorkách euploidných na chromozóme 21 je 2.203878, takže uvažovaná vzorka spĺňa prvú podmienku $z > z^E_{max}$ rozhodovacieho stromu, a teda aneuploidný status vzorky je trizomický; pozri Obr. 2 a na ňom bod označený '1'. Poznamenajme, že u analyzovanej vzorky bola potvrdená trizómia.

Zhrnutie. Príklad 1 poukazuje na situáciu, kedy tradičný spôsob rozhodovania o aneuploidnom stave nedokáže odhaliť chromozómovú abnormalitu, kvôli nízkej fetálnej frakcii. Tradičný spôsob ale ignoruje informáciu o chromozómovej reprezentácii. Predkladaný vynález berie túto informáciu do úvahy, a to prostredníctvom rozhodovacieho stromu, založeného na Trojuholníku Neurčitosti pre Trizómiu, alebo ekvivalentne z-skórovom Trojuholníku Neurčitosti pre Trizómiu. U danej vzorky by použitím tradičného spôsobu rozhodovania došlo k tomu, že by nebol rozpoznaný trizomický stav vzorky. Predkladaný vynález by tento stav rozpoznal.

Príklad 2

Pre inú vzorku bola v Kroku 1) získaná chromozómová reprezentácia *t* = 0.007333882. Fetálna frakcia bola v Kroku 3) odhadnutá *f*= 0.0323785. Keďže fetálna frakcia *f* je nižšia než $f^{T21}_{LoD}$, čo v tradičnom postupe na určovanie aneuploidného stavu znamenalo, že daná vzorka je nerozhodná.

Keď použijeme rozhodovací strom uvedený vyššie, zistíme, že nastal prípad e), nakoľko ani jedna z možností a) – d) nie je u tejto vzorky splnená. Následne náš rozhodovací strom stanoví aneuploidný stav vzorky ako euploidný na chromozóme 21.

Ten istý záver získame, v prípade, že použijeme ekvivalentné z-skórové vyjadrenie rozhodovacieho stromu. Keďže z-skóre vzorky je *z* = –0.760519, $k_f$ = 1.016189, $z^E_{min}$ = –2.592162, tak (*f*, *z*) nepatrí do zTNT; pozri Obr. 3, na ktorom je analyzovaná vzorka označená ako '2'. Podobne sa zistí, že vzorka nepatrí ani do zTNM. Takže aneuploidný stav vzorky je euploidnosť na chromozóme 21. Poznamenajme, že u vzorky bol potvrdený euploidný stav na chromozóme 21.

Zhrnutie: Príklad 2 ukazuje situáciu, kde tradičný spôsob rozhodovania o aneuploidnom stave nedokáže tento stav stanoviť, kvôli nízkej fetálnej frakcii. Tradičný spôsob ale ignoruje informáciu o chromozómovej reprezentácii. Predkladaný vynález berie túto informáciu do úvahy, a to prostredníctvom rozhodovacieho stromu, založeného na TNT, TNM, alebo ekvivalentne zTNT, zTNM. U danej vzorky by použitím tradičného spôsobu rozhodovania došlo k tomu, že by nebol rozpoznaný euploidný stav vzorky. Predkladaný vynález by tento stav rozpoznal.

Príklad 3

Pre inú vzorku bola v Kroku 1) získaná chromozómová reprezentácia *t* = 0.007355957.

Fetálna frakcia bola v Kroku 3) odhadnutá *f*= 0.01138656. Keďže fetálna frakcia *f* je nižšia než $f^{T21}_{LoD}$, tak v tradičnom postupe na určovanie aneuploidného stavu plodu by daná vzorka bola nerozhodná.

Keď použijeme rozhodovací strom uvedený vyššie, tak zistíme, že nastal prípad c), nakoľko

$f \le f^T_{LoD}$ [0.01138656 ≤ 0.03671255], a

$t \ge (1 + 0.5 * f) * t^E_{min}$, [0.007355957 ≥ 0.00732429], a

$t \le t^E_{max}$, [0.007355957 ≤ 0.007416512].

Takže pre danú vzorku nie je možné navrhovanou metódu stanoviť jej aneuploidný stav na chromozóme 21.

K tomu istému záveru dospejeme pomocou ekvivalentného, z-skórového rozhodovacieho stromu. Keďže z-skóre vzorky je z = 0.03144595, $f^T_{LoD,z}$ = 0.03671255, a $k_f$ = 1.005693, tak

$$f \leq f^{T}_{LoD,z} \qquad [0.01138656 < 0.03671255]$$

$$z \geq k_f * z^{E}_{min} + (k_f - 1) * \frac{\mu^E}{\sigma^E} \qquad [0.03144595 \geq -1.104649]$$

$$z \leq z^{E}_{max} \qquad [0.03144595 < 2.203878],$$

tak vzorka patrí do zTNT, pozri Obr. 4 a na ňom bod označený ako '3'. Analyzovaná vzorka patrí do Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu, a preto nie je možné stanoviť, či je trizómická alebo euploidná na chromozóme 21. Poznamenajme, že analyzovaná vzorka bola potvrdená ako euploidná.

Zhrnutie: Príklad 3 ukazuje situáciu, kde ani tradičný spôsob rozhodovania o aneuploidnom stave ani predkladaný vynález nedokážu určiť aneuploidný stav. Tradičný spôsob ale ignoruje informáciu o chromozómovej reprezentácii. Z toho dôvodu je počet vzoriek, u ktorých nedokáže tradičný spôsob stanoviť aneuploidný stav výrazne vyšší, než počet vzoriek, ktoré sa nedajú rozhodnúť predkladaným vynálezom. V analyzovanej sade vzoriek tradičný spôsob zlyhal u 12 vzoriek, zatiaľčo u predkladaného vynálezu to boli iba 4 vzorky. Je to vďaka tomu, že predkladaný vynález berie do úvahy fetálnu frakciu ako aj chromozómovú reprezentáciu, a to prostredníctvom rozhodovacieho stromu, založeného na TNT, TNM, alebo ekvivalentne zTNT, zTNM.

**Priemyselná využiteľnosť**

Tento vynález ukazuje metódu použitia fetálnej frakcie a chromozómovej reprezentácie pri stanovovaní aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní, založenú na Trojuholníku Neurčitosti pre Trizómiu, a Trojuholníku Neurčitosti pre Monozómiu. Použitie predstavenej metódy môže viesť k výraznému zníženiu zastúpenia nerozhodných prípadov.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob použitia fetálnej frakcie a chromozómovej reprezentácie pri určovaní aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní, **vyznačujúci sa tým,** že za nerozhodný prípad sa prehlási akýkoľvek prípad, u ktorého chromozómový počet čítaní, označený *t*, a fetálna frakcia, označená *f,* patria do Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu na danom chromozóme (TNT), ktorý je daný súčasným splnením nasledovných troch podmienok:

$$f \leq f_{LoD}^{T}$$
$$t \geq (1 + 0.5 * f) * t_{min}^{E}$$
$$t \leq t_{max}^{E},$$

kde $f_{LoD}^{T}$ je detekčná medza pre trizómiu na danom chromozóme, určená formulou

$$f_{LoD}^{T} = \left(\frac{t_{max}^{E}}{t_{min}^{E}} - 1\right) * 2;$$

$t_{min}^{E}$ je minimum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a $t_{max}^{E}$ je maximum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme.

2. Spôsob použitia fetálnej frakcie a chromozómovej reprezentácie pri určovaní aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní, **vyznačujúci sa tým,** že za nerozhodný prípad sa prehlási akýkoľvek prípad, u ktorého chromozómový počet čítaní na danom chromozóme, označený *t*, a fetálna frakcia, označená *f,* patria do Trojuholníka Neurčitosti pre Monozómiu na danom chromozóme (TNM), ktorý je daný súčasným splnením nasledovných troch podmienok:

$$f \leq f_{LoD}^{M}$$
$$t \leq (1 - 0.5 * f) * t_{max}^{E}$$
$$t \geq t_{min}^{E}$$

kde $f_{LoD}^{M}$ je detekčná medza pre monozómiu na danom chromozóme, určená formulou

$$f_{LoD}^{M} = \left(1 - \frac{t_{min}^{E}}{t_{max}^{E}}\right) * 2;$$

$t_{min}^{E}$ je minimum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a $t_{max}^{E}$ maximum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme.

3. Spôsob podľa nároku 1, s chromozomálnou reprezentáciou *t* nahradenou z-skórom *z*

$$z = \frac{t - \mu^{E}}{\sigma^{E}},$$

kde $\mu^{E}$ je odhad polohy (napr. priemer alebo medián) rozdelenia chromozómového počtu čítaní v populácii euploidnej na danom chromozóme, $\sigma^{E}$ je odhad škály (napr. smerodajná odchýlka alebo interkvartilový rozsah) rozdelenia chromozómového počtu čítaní v populácii euploidnej na danom chromozóme, **vyznačujúci sa tým,** že za nerozhodný prípad sa prehlási akýkoľvek prípad, u ktorého z-skóre *z,* a fetálna frakcia *f,* patria do Z-skórového Trojuholníka Neurčitosti pre Trizómiu na danom chromozóme (zTNT), ktorý je daný súčasným splnením nasledovných troch podmienok:

$$z \leq f_{LoD,z}^{T}$$
$$z \geq k_{f}^{T} * z_{min}^{E} + (k_{f}^{T} - 1) * \mu^{E}/\sigma^{E}$$
$$z \leq z_{max}^{E},$$

kde

$$f_{LoD,z}^{T} = \frac{2 * (z_{max}^{E} - z_{min}^{E})}{z_{min}^{E} + \mu^{E}/\sigma^{E}}$$
$$k_{f}^{T} = (1 + 0.5 * f)$$

a $z_{min}^{E}$ je minimálne z-skóre v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, $z_{max}^{E}$ je maximálne z-skóre v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme.

4. Spôsob podľa nároku 2, s chromozomálnou reprezentáciou *t* nahradenou z-skórom *z*

$$z = \frac{t - \mu^{E}}{\sigma^{E}}$$

kde $\mu^{E}$ je odhad polohy (napr. priemer alebo medián) rozdelenia chromozómového počtu čítaní v populácii euploidnej na danom chromozóme, $\sigma^{E}$ je odhad škály (napr. smerodajná odchýlka alebo interkvartilový rozsah) rozdelenia chromozómového počtu čítaní v populácii euploidnej na danom chromozóme, **vyznačujúci sa tým,** že za nerozhodný prípad sa prehlási akýkoľvek prípad, u ktorého z-skóre *z,* a fetálna frakcia *f,* patria do Z-skórového Trojuholníka Neurčitosti pre Monozómiu na danom chromozóme (zTNM), ktorý je daný súčasným splnením nasledovných troch podmienok:

$$z \leq f_{LoD,z}^{M}$$
$$z \geq k_{f}^{M} * z_{min}^{E} + (k_{f}^{M} - 1) * \mu^{E}/\sigma^{E}$$

$$z \leq z^E_{max},$$

kde

$$f^M_{LoD,z} = \frac{2 * (z^E_{max} - z^E_{min})}{z^E_{max} + \mu^E / \sigma^E}$$

$$k^M_f = (1 + 0.5 * f)$$

a $z^E_{min}$ je minimálne z-skóre v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, $z^E_{max}$ je maximálne z--skóre v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme.

5. Spôsob stanovenia aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že aneuploidný stav je určený pomocou nasledovného rozhodovacieho stromu: ak fetálna frakcia *f*, a chromozómová reprezentácia *t*, sú také, že,

a) ($t > t^E_{max}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako trizomický,
b) ($t < t^E_{min}$)potom aneuploidný stav je stanovený ako monozomický,
c) (*f, t*) patria do TNT, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
d) (*f, t*) patria do TNM, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
e) ináč; potom aneuploidný stav je stanovený ako euploidný na danom chromozóme.

6. Spôsob stanovenia aneuploidného stavu v neinvazívnom prenatálnom testovaní, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že aneuploidný stav je určený pomocou nasledovného rozhodovacieho stromu: ak fetálna frakcia *f*, a z-skóre *z*, sú také, že,

a) ($z > z^E_{max}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako trizomický,
b) ($z < z^E_{min}$), potom aneuploidný stav je stanovený ako monozomický,
c) (*f, z*) patria do zTNT, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
d) (*f, z*) patria do zTNM, potom nie je možné stanoviť aneuploidný stav,
e) ináč; potom aneuploidný stav je stanovený ako euploidný na danom chromozóme.

7. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že na stanovenie detekčnej medze pre trizómiu na danom chromozóme, $f^T_{LoD}$, sa použije $t^E_{min}$, t. j., minimum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a $t^E_{max}$, t. j., maximum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a to podľa formuly

$$f^T_{LoD} = \left(\frac{t^E_{max}}{t^E_{min}} - 1\right) * 2$$

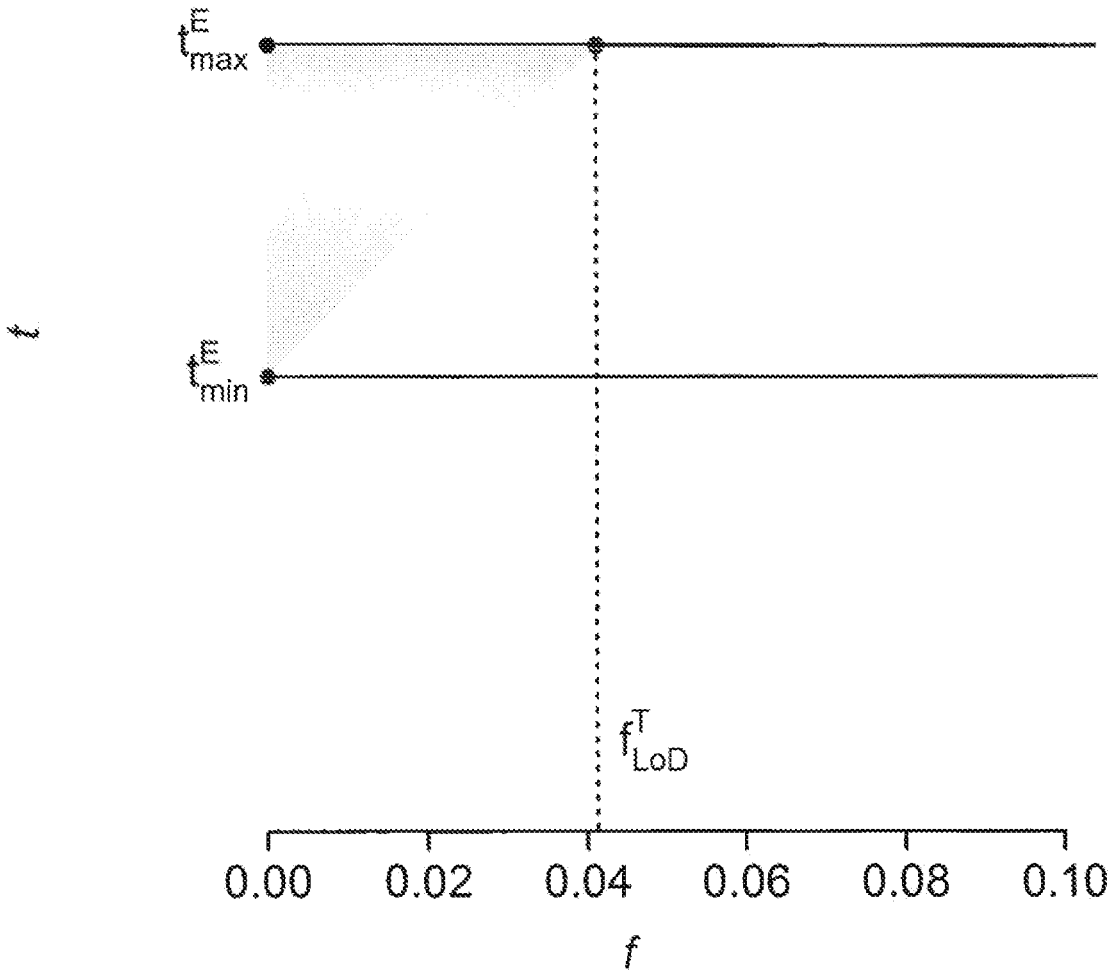
8. Spôsob podľa nároku 2, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že na stanovenia detekčnej medze pre monozómiu, $f^M_{LoD}$, sa použije $t^E_{min}$, t. j., minimum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a $t^E_{max}$, t. j., maximum chromozómového počtu čítaní na danom chromozóme v množine vzoriek euploidných na danom chromozóme, a to podľa formuly

$$f^M_{LoD} = \left(1 - \frac{t^E_{min}}{t^E_{max}}\right) * 2$$

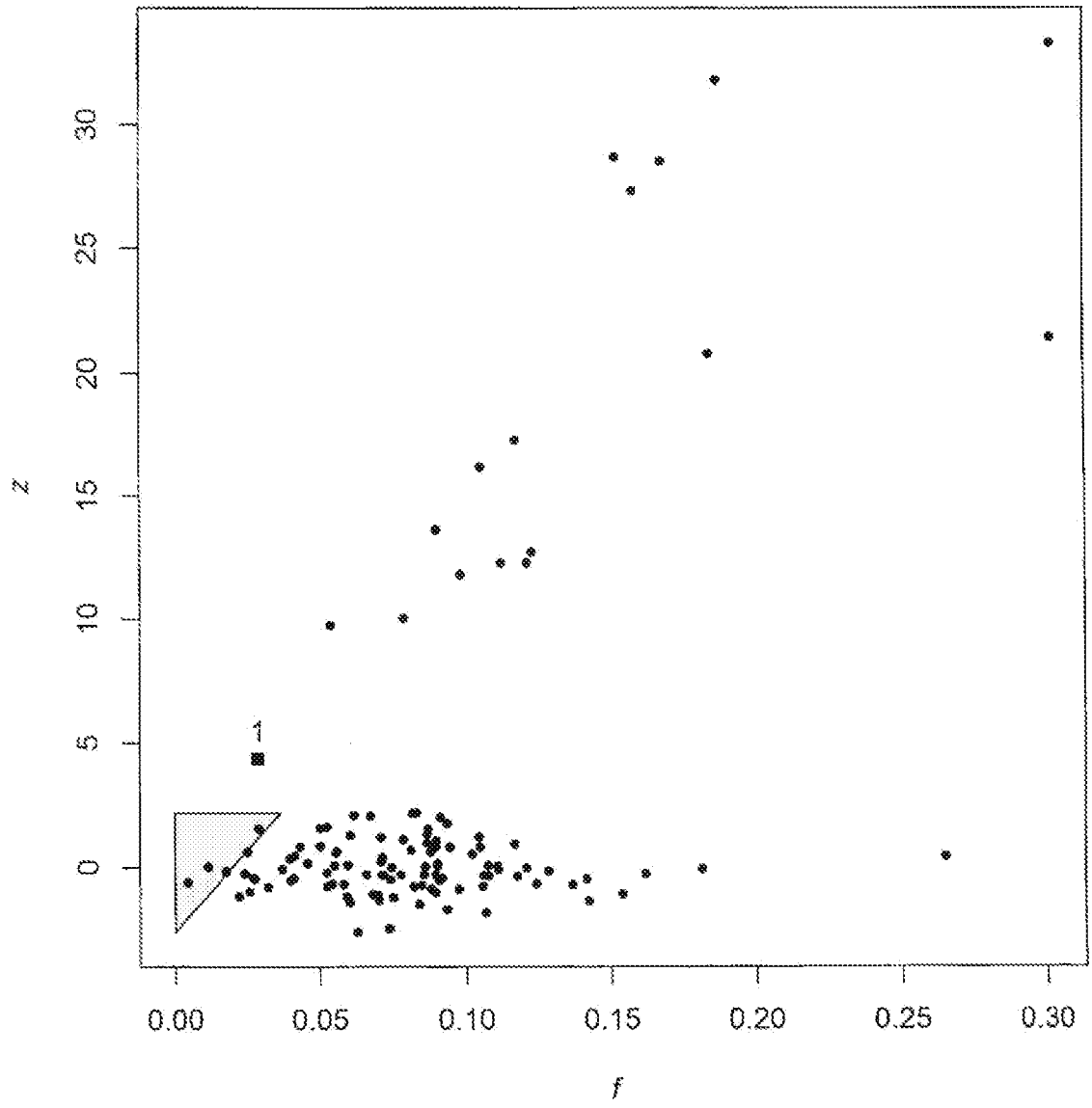
9. Spôsob podľa niektorého z predchádzajúcich nárokov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m ,** že namiesto chromozómového počtu čítaní *t* sa použije počet čítaní v dizjunktných subregiónoch daného chromozómu.

**4 výkresy**

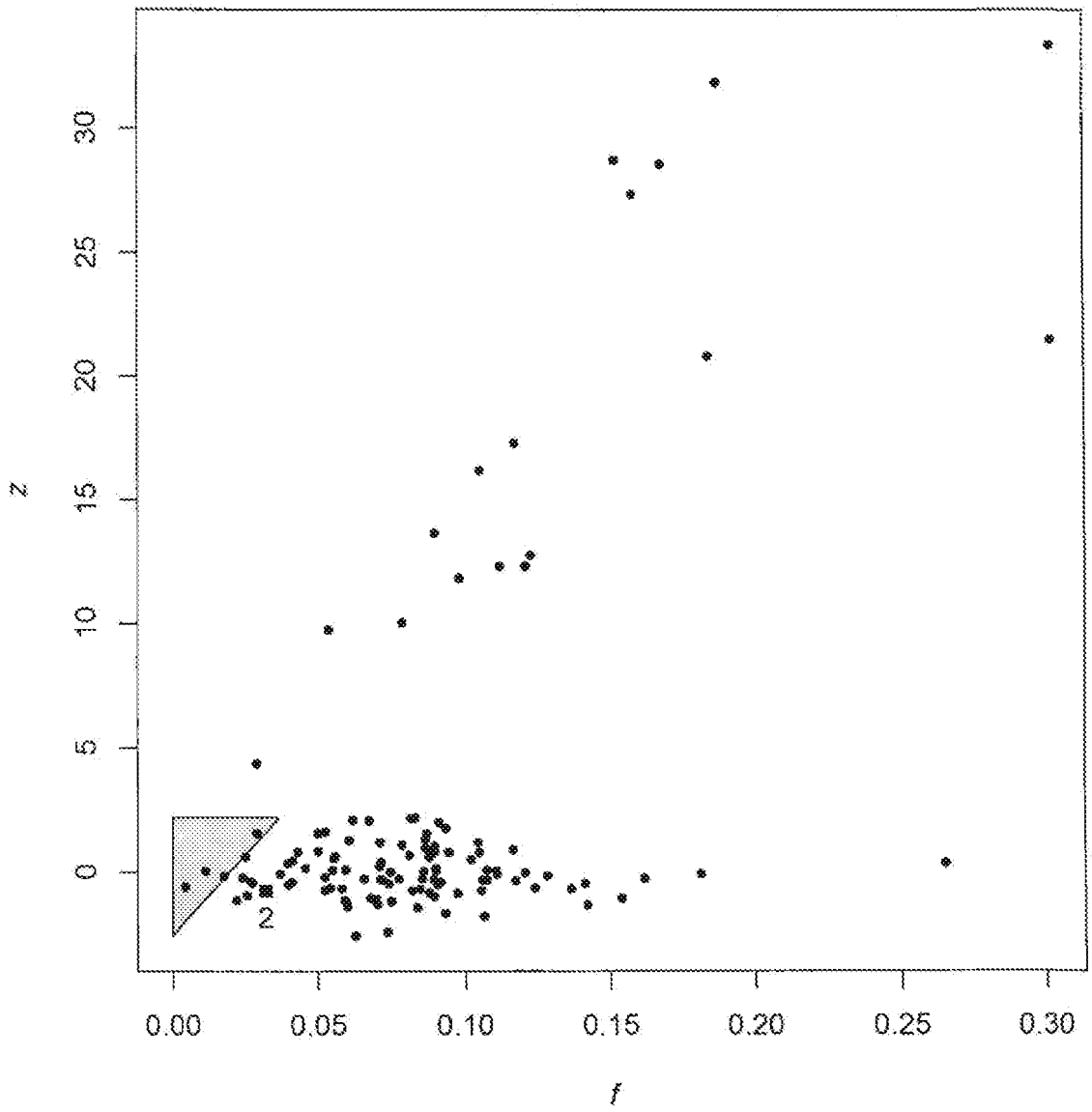
Obr. 1



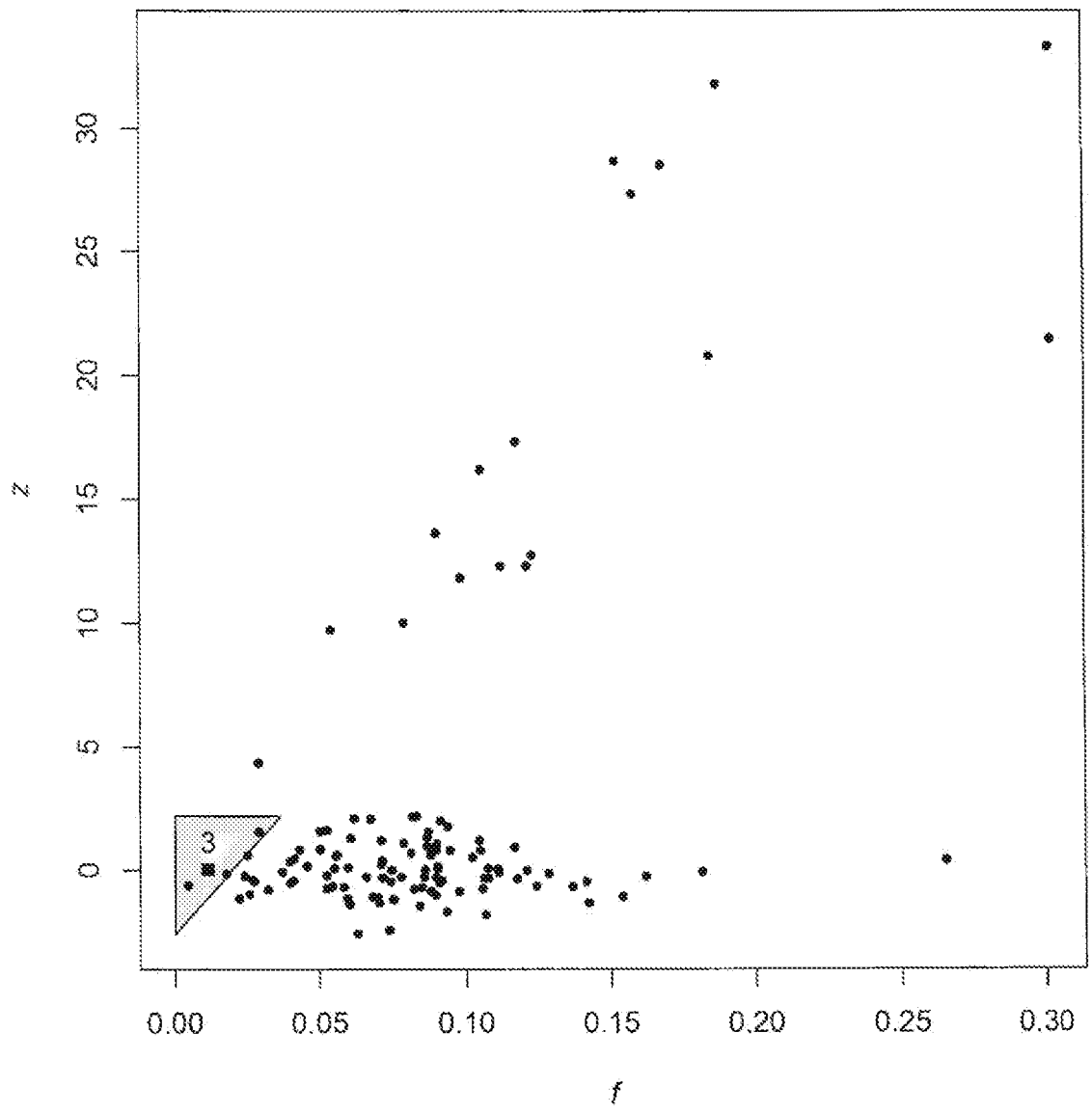
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4




Koniec dokumentu