(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118922560 A
(43)申请公布日 2024.11.08

(21)申请号 202380029001.6
(22)申请日 2023.03.21
(30)优先权数据
63/322,144 2022.03.21 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/064790 2023.03.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/183826 EN 2023.09.28
(71)申请人 凯尔迪克斯公司
地址 美国加利福尼亚州布里斯班湾岸大道3260号(94005)
(72)发明人 金·克拉克-朗格尼
纳塔莉·古尔巴赫切 付荣典
雪莉·施
(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
专利代理师 郝传鑫
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6883(2006.01)

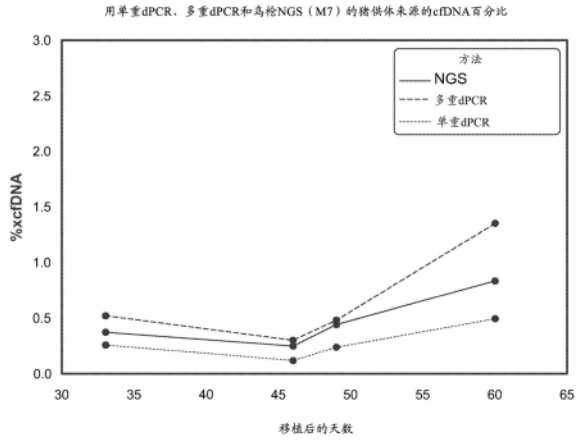
权利要求书8页 说明书44页
序列表（电子公布） 附图10页

(54)发明名称

用于在跨物种移植中非侵入性监测器官健康的方法

(57)摘要

本公开涉及用于检测、预测、诊断和/或监测移植受体中的跨物种移植物的状态的方法,以及用于监测、施用和调整免疫抑制疗法的方法。



CN 118922560 A

1.一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过从所述无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少所述供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;以及

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。

2.根据权利要求1所述的方法,还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到所述样本中,其中来自所述刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中所述测序读段是从所述基因组的选定大小的区域生成的。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

6.根据权利要求5所述的方法,其中区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。

7.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述供体来源的无细胞核酸的量是跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

8.一种用于在来自供体的移植物的受体中治疗移植排斥的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过从所述无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少所述供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及

d)基于所述供体来源的无细胞核酸的量来向所述移植受体施用免疫抑制剂治疗。

9.根据权利要求8所述的方法,还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到所述样本中,其中来自所述刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。

10.根据权利要求8或权利要求9所述的方法,其中所述确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。

11.根据权利要求8至10中任一项所述的方法,其中所述测序读段是从所述基因组的选定大小的区域生成的。

12.根据权利要求8至11中任一项所述的方法,其中供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

13.根据权利要求12所述的方法,其中区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。

14.根据权利要求8至11中任一项所述的方法,其中所述供体来源的无细胞核酸的量是跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

15.一种用于在来自供体的移植物的受体中调整免疫抑制疗法的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过从所述无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少所述供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及

d)基于所述供体来源的无细胞核酸的量来调整施用于所述移植受体的免疫抑制剂治疗。

16.根据权利要求15所述的方法,还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到所述样本中,其中来自所述刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。

17.根据权利要求15或权利要求16所述的方法,其中所述确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。

18.根据权利要求15至17中任一项所述的方法,其中测序读段是从所述基因组的选定大小的区域生成的。

19.根据权利要求15至18中任一项所述的方法,其中供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

20.根据权利要求19所述的方法,其中区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。

21.根据权利要求15至18中任一项所述的方法,其中所述供体来源的无细胞核酸的量是跨所述基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中所述区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。

22.根据权利要求1至21中任一项所述的方法,其中所述高通量测序测定包括下一代测序测定。

23.一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,其中所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过PCR测定来确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,所述供体来源的无细胞核酸的量被确定为:

(i)所述样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或

(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;以及

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且所述PCR定量是实时PCR定量。

25.根据权利要求23所述的方法,其中所述PCR测定是数字PCR测定并且所述PCR定量是终点PCR定量。

26.根据权利要求25所述的方法,其中所述数字PCR测定包括:

(a)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或

(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。

27.根据权利要求25所述的方法,其中所述数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关。

28.根据权利要求26所述的方法,其中所述数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:

(a)所述第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且

(b)所述第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

29.根据权利要求28所述的方法,其中所述第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。

30.根据权利要求27所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对:

(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及

(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

31.根据权利要求27或权利要求30所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

32.一种用于在移植受体中治疗来自供体的移植物的移植排斥的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,其中所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过PCR测定来确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,所述供体来源的无细胞核酸的量被确定为:

(i)所述样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或

(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及

d)基于所述供体来源的无细胞核酸的量来向所述移植受体施用免疫抑制剂治疗。

33.根据权利要求32所述的方法,其中所述PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且所述PCR定量是实时PCR定量。

34.根据权利要求32所述的方法,其中所述PCR测定是数字PCR测定并且所述PCR定量是终点PCR定量。

35.根据权利要求34所述的方法,其中所述数字PCR测定包括:

(a)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或

(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。

36.根据权利要求34所述的方法,其中所述数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关。

37.根据权利要求35所述的方法,其中所述数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:

(a)所述第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且

(b)所述第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

38.根据权利要求37所述的方法,其中所述第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。

39.根据权利要求36所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对:

(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及

(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

40.根据权利要求36或权利要求39所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

41.一种用于在来自供体的移植物的受体中调整免疫抑制疗法的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)提供在移植后来自所述移植受体的样本,其中所述样本包含来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过PCR测定来确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,所述供体来源的无细胞核酸的量被确定为:

(i)所述样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或

(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;

c)如果所述供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及

d)基于所述供体来源的无细胞核酸的量来调整施用于所述移植受体的免疫抑制剂治疗。

42.根据权利要求41所述的方法,其中所述PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且所述PCR定量是实时PCR定量。

43.根据权利要求41所述的方法,其中所述PCR测定是数字PCR测定并且所述PCR定量是终点PCR定量。

44.根据权利要求43所述的方法,其中所述数字PCR测定包括:

(a)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或

(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中所述受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。

45.根据权利要求43所述的方法,其中所述数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关。

46.根据权利要求44所述的方法,其中所述数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:

(a)所述第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且

(b)所述第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。

48.根据权利要求45所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对:

(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及

(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

49.根据权利要求45或权利要求48所述的方法,其中所述多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

50.根据权利要求1至49中任一项所述的方法,其中所述方法还包括测试传染剂的存在。

51.根据权利要求50所述的方法,其中所述传染剂选自由病毒、细菌、真菌和寄生生物组成的组。

52.根据权利要求51所述的方法,其中所述传染剂是选自由巨细胞病毒、Epstein-Barr病毒、指环病毒科和BK病毒组成的组的病毒。

53.根据权利要求1至52中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述受体中进行

一种或多种基因表达谱分析测定。

54.根据权利要求53所述的方法,其中基于所述样本中所述供体来源的无细胞核酸的量和所述基因表达谱分析测定的结果来计算组合评分。

55.一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的试剂盒,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述试剂盒包括:

(a)一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集,其与来自所述移植受体的样本中的无细胞核酸中的供体特异性或受体特异性靶序列杂交以用于供体来源的无细胞核酸的PCR定量,作为所述样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或作为所述样本中供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;以及

(b)用于确定供体来源的无细胞核酸的量的数据分析的说明书。

56.根据权利要求55所述的试剂盒,其中所述PCR定量是qPCR定量。

57.根据权利要求55所述的试剂盒,其中所述PCR定量是数字PCR定量。

58.根据权利要求1至54中任一项所述的方法,或根据权利要求55至57中任一项所述的试剂盒,其中所述供体来源的无细胞核酸和/或所述受体来源的无细胞核酸是DNA。

59.根据权利要求1至54中任一项所述的方法,或根据权利要求55至57中任一项所述的试剂盒,其中所述供体来源的无细胞核酸和/或所述受体来源的无细胞核酸是DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹或它们的组合。

60.根据权利要求1至22和58至59中任一项所述的方法,其中用校正所述供体基因组和所述受体基因组之间的基因组长度差异的校正因子来调整所述供体来源的无细胞核酸的量。

61.根据权利要求1至22和58至60中任一项所述的方法,其中用校正来源于所述供体的无细胞核酸与来源于所述受体的无细胞核酸之间的无细胞核酸片段大小差异的校正因子来调整所述供体来源的无细胞核酸的量。

62.根据权利要求1至54和58至61中任一项所述的方法,或根据权利要求55至59中任一项所述的试剂盒,其中所述供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核酸与总或受体来源的无细胞核酸的比率。

63.根据权利要求1至54和58至61中任一项所述的方法,或根据权利要求55至59中任一项所述的试剂盒,其中所述供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核酸与总无细胞核酸相比的百分比。

64.根据权利要求1至54和58至63中任一项所述的方法,或根据权利要求55至59和62至63中任一项所述的试剂盒,其中所述移植物是实体器官、组织或细胞移植物。

65.根据权利要求64所述的方法或试剂盒,其中所述移植物的所述供体是动物。

66.根据权利要求65所述的方法或试剂盒,其中所述动物是猪。

67.根据权利要求22所述的方法,其中所述下一代测序测定是基于扩增子的。

68.根据权利要求22所述的方法,其中所述下一代测序测定是基于非扩增子的。

69.一种用于分析来自接受来自供体的实体器官移植物的移植受体的生物样本的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)从来自所述移植受体的生物样本中分离无细胞核酸,其中所述无细胞核酸包括来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过扩增所述无细胞核酸的靶区生成扩增子,其中所述靶区包括一个或多个包含供体特异性核苷酸序列的靶区和/或一个或多个包含受体特异性核苷酸序列的靶区;

c)通过对所述扩增子测序从所生成的扩增子生成序列读段,

其中所生成的序列读段包括对应于供体特异性基因组序列的一个或多个序列读段和/或对应于受体特异性基因组序列的一个或多个序列读段,以及

任选地将所生成的序列读段映射到至少供体特异性基因组序列,任选地其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;以及

c)从所述样本中所生成的序列读段定量无细胞核酸的量。

70.根据权利要求69所述的方法,其中所述无细胞核酸的量是所述样本中移植供体来源的无细胞核酸的量。

71.根据权利要求69所述的方法,其中所述无细胞核酸的量是所述样本中总无细胞核酸的量。

72.根据权利要求69或权利要求71所述的方法,还包括向所述样本中添加一种或多种定量刺突核酸对照,以及通过对所述一种或多种刺突核酸对照进行测序来生成对应于所述一种或多种刺突核酸对照的序列读段,其中对应于所述刺突对照的序列读段用于确定所述样本中总无细胞核酸的绝对量。

73.根据权利要求69或权利要求70所述的方法,还包括向所述样本中添加一种或多种定量刺突核酸对照,以及通过对所述一种或多种刺突核酸对照进行测序来生成对应于所述一种或多种刺突核酸对照的序列读段,其中来自所述刺突对照的序列读段用于确定所述样本中移植供体来源的无细胞核酸的绝对量。

74.根据权利要求72或权利要求73所述的方法,其中在步骤a)之前添加所述一种或多种定量刺突核酸对照。

75.根据权利要求72或权利要求73所述的方法,其中在步骤a)之后添加所述一种或多种定量刺突核酸对照。

76.根据权利要求72或权利要求73所述的方法,其中在步骤a)之前和之后添加所述一种或多种定量刺突核酸对照。

77.根据权利要求69至76中任一项所述的方法,包括使用校正因子来校正所述供体基因组与所述受体基因组之间的基因组长度差异来计及供体与受体之间的基因组大小差异。

78.一种用于分析来自接受来自供体的实体器官移植物的移植受体的生物样本的方法,其中所述供体和所述受体属于不同物种,所述方法包括:

a)从来自所述受体的生物样本中分离无细胞核酸,其中所述无细胞核酸包括来源于所述供体的无细胞核酸和来源于所述受体的无细胞核酸;

b)通过数字PCR测定来确定所述样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所述数字PCR测定包括:

(i)用于一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定,或

(ii)用于一种或多种单拷贝或多拷贝受体特异性靶和一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定,

其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且

其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的数字PCR定量,所述供体来源的无细胞核酸的量被确定为:

(i)所述样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或

(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率。

79.根据权利要求78所述的方法,其中所述数字PCR测定包括(a)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的第一数字PCR测定,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的第二数字PCR测定,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

80.根据权利要求79所述的方法,其中所述第二数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。

81.根据权利要求78所述的方法,其中所述数字PCR测定针对(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中所述受体特异性靶的所述拷贝数与单倍体受体基因组相关;以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

82.根据权利要求81所述的方法,其中所述数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶,其中所述供体特异性靶的所述拷贝数与单倍体供体基因组相关。

用于在跨物种移植中非侵入性监测器官健康的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年3月21日提交的美国临时申请63/322,144号的权益,该临时申请据此全文以引用方式并入。

[0003] 电子序列表的引用

[0004] 电子序列表的内容(506612003040SEQLIST.xml;大小:21,075字节;以及创建日期:2023年3月21日)全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0005] 本文提供了用于检测、预测、诊断和/或监测器官、细胞或组织的跨物种移植物状态的方法和试剂盒,以及与其相关的治疗方法。

背景技术

[0006] 将细胞、组织或器官从一个物种移植到另一个物种中的跨物种移植或异种移植是对可用于移植的人类器官、细胞和组织的严重短缺的有希望的解决方案。然而,至少部分地由于感染的跨物种传播的可能性,移植受体的免疫排斥以及供体和受体之间的遗传、解剖学和生理学差异,跨物种移植存在挑战。跨物种移植物的免疫排斥可通过移植受体中的获得性免疫和先天免疫两者介导。在一些情况下,受体对跨物种移植的免疫反应可导致超急性排斥、急性抗体介导的排斥、急性细胞排斥或混合的抗体介导的排斥和细胞排斥。参见例如Lu等人,"Xenotransplantation:Current Status in Preclinical Research." Frontiers in immunology,第10卷3060,2020年1月23日。因此,为了预防或抑制跨物种移植物的免疫排斥,有必要在医学上抑制受体的免疫系统。

[0007] 在移植后,移植受体中的移植物状态可在受体寿命的剩余时间内被监测,包括评估移植物的功能和移植物的免疫介导的排斥。在心脏移植中,例如,对排斥的监察可包括在移植的第一年内进行多达15次预定的活组织检查,以提供心肌的标本供病理学家进行组织学评价。每个活组织检查规程都是侵入性的、有压力的、不方便的,并且对患者而言存在程序风险,并且是昂贵的。此外,活组织检查取样是极其局部的,因此心脏任何非活组织检查区域的组织学异常都会被遗漏。活组织检查的分级是主观的,并且活组织检查发现的不一致在独立的病理学家之间是常见的。此外,活组织检查主要用于在移植后第一年内监察移植排斥,但这种侵入性方法不是很适合或确立用于在较长时期内(例如,移植后一年以上)引导个体化免疫抑制疗法。已经开发了临床实验室测试以基于相同物种内的遗传变异(例如,单核苷酸多态性(SNP)或基于人白细胞抗原(HLA)基因的多态性)来评估同种异体移植物(即,单一物种的成员之间的移植物)的状态。然而,这些实验室测试可能不适用于或不适于评估供体和受体属于不同物种的移植物的状态。

[0008] 因此,存在对以下各项的需要:检测、预测、诊断和/或监测移植受体中的跨物种移植物状态的改进的非侵入性方法,以及确定施用或调整对跨物种移植物的移植受体施用的免疫抑制疗法的需要的方法。

发明内容

[0009] 在一个方面,本文提供了一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过从无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;以及c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。在一些实施方案中,该方法还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到样本中,其中来自刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。在一些实施方案中,确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。在一些实施方案中,从基因组的选定大小的区域生成测序读段。在一些实施方案中,供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,高通量测序测定包括下一代测序测定。

[0010] 在另一个方面,本文提供了一种用于在来自供体的移植物的受体中治疗移植排斥的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过从无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来向移植受体施用免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,该方法还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到样本中,其中来自刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。在一些实施方案中,确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。在一些实施方案中,从基因组的选定大小的区域生成测序读段。在一些实施方案中,供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,高通量测序测定包括下一代测序测定。

[0011] 在另一个方面,本文提供了一种用于在来自供体的移植物的受体中调整免疫抑制疗法的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过从无细胞核酸生成序列读段来在高通量测序测定中确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中所

生成的序列读段对应于供体特异性和受体特异性基因组序列,并且将所生成的序列读段映射到至少供体特异性基因组序列,其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来调整施用于移植受体的免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,该方法还包括在步骤a中将定量刺突核酸对照添加到样本中,其中来自刺突对照的序列读段用于确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。在一些实施方案中,确定步骤包括将所生成的序列读段映射到供体特异性和受体特异性基因组序列。在一些实施方案中,从基因组的选定大小的区域生成测序读段。在一些实施方案中,供体基因组和受体基因组之间的大小差异通过利用跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖来计及,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,区域的大小为至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是跨基因组的选定大小的区域的平均覆盖百分比,其中区域足够大以具有足够的覆盖,并且其中背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些实施方案中,高通量测序测定包括下一代测序测定。

[0012] 在另一个方面,本文提供了一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过数字PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中供体来源的无细胞核酸的量是参考所分析的样本的量来确定的,或通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的数字PCR定量确定为供体来源的无细胞核酸与总供体特异性和受体特异性核酸的比率;以及c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。在一些实施方案中,数字PCR测定包含一个或多个单重数字PCR测定。在一些实施方案中,数字PCR测定是在单个数字PCR反应中由两个或更多个PCR测定组成的多重数字PCR测定。在一些实施方案中,第一单重数字PCR测定在单倍体受体基因组中具有单拷贝受体特异性靶,并且第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定在单倍体受体基因组中具有至少一个或两个单拷贝受体特异性靶,并且在单倍体供体基因组中具有至少一个或多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,每个PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。

[0013] 在另一个方面,本文提供了一种用于在移植受体中治疗来自供体的移植物的移植排斥的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过数字PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中供体来源的无细胞核酸的量是参考所分析的样本的量来确定的,或通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的数字PCR定量确定为供体来源的无细胞核酸与总供体特异性和受体特异性核酸的比率;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来向移植受体施用免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,数字PCR测定包含一个或多个单重数字PCR测定。在一些实施方案中,数字PCR测定是在单个数字PCR反应中由两个或更多个PCR测定组成的多重数字PCR测定。在一些实施方案中,第一单重数字PCR测定在单倍体受体基因

组中具有单拷贝受体特异性靶,并且第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定在单倍体受体基因组中具有至少一个或两个单拷贝受体特异性靶,并且在单倍体供体基因组中具有至少一个或多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,每个PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。

[0014] 在另一个方面,本文提供了一种用于在来自供体的移植物的受体中调整免疫抑制疗法的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过数字PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中供体来源的无细胞核酸的量是参考所分析的样本的量来确定的,或通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的数字PCR定量确定为供体来源的无细胞核酸与总供体特异性和受体特异性核酸的比率;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来调整施用于移植受体的免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,数字PCR测定包含一个或多个单重数字PCR测定。在一些实施方案中,数字PCR测定是在单个数字PCR反应中由两个或更多个PCR测定组成的多重数字PCR测定。在一些实施方案中,第一单重数字PCR测定在单倍体受体基因组中具有单拷贝受体特异性靶,并且第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定在单倍体受体基因组中具有至少一个或两个单拷贝受体特异性靶,并且在单倍体供体基因组中具有至少一个或多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,每个PCR测定在单倍体供体基因组中具有双拷贝或多拷贝供体特异性靶。

[0015] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,该方法还包括测试传染剂的存在。在一些实施方案中,传染剂选自病毒、细菌、真菌或寄生生物。在一些实施方案中,传染剂是选自巨细胞病毒、Epstein-Barr病毒、指环病毒科(Anelloviridae)或BK病毒的病毒。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,该方法还包括在受体中进行一种或多种基因表达谱分析测定。在一些实施方案中,基于样本中供体来源的无细胞核酸的量和基因表达谱分析测定的结果来计算组合评分。

[0016] 在另一个方面,本文提供了一种用于检测和监测移植受体中来自供体的移植物的移植排斥状态的试剂盒,其中供体和受体属于不同物种,该试剂盒包含一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集,其与来自移植受体的无细胞核酸中的供体特异性或受体特异性靶序列杂交以用于参考所分析的样本量或参考所分析的总无细胞核酸对供体来源的无细胞核酸进行数字PCR定量;以及用于确定供体来源的无细胞核酸的量的数据分析的说明书。

[0017] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸是DNA。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸是DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹或它们的组合。

[0018] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,用校正供体和受体基因组之间的基因组长度差异的校正因子来调整供体来源的无细胞核酸的量。在可与前

述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,用校正来源于供体的无细胞核酸与来源于受体的无细胞核酸之间的无细胞核酸片段大小差异的校正因子来调整供体来源的无细胞核酸的量。

[0019] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核酸与总或受体来源的无细胞核酸的比率。在一些实施方案中,该比率是供体来源的无细胞核酸质量与总或受体来源的无细胞核酸质量的比率。在一些实施方案中,该比率是供体来源的无细胞核酸基因组拷贝当量与总或受体来源的无细胞核酸基因组拷贝当量的比率。

[0020] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核酸与总无细胞核酸相比的百分比。在一些实施方案中,该百分比是供体来源的无细胞核酸质量与总无细胞核酸质量相比的百分比。在一些实施方案中,该百分比是供体来源的无细胞核酸基因组拷贝当量与总无细胞核酸基因组拷贝当量相比的百分比。

[0021] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,移植物是实体器官、组织或细胞移植物。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,移植物的供体是动物。在一些实施方案中,动物是猪。

[0022] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,下一代测序测定是基于扩增子的。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,下一代测序测定是基于非扩增子的。

[0023] 在另一个方面,本文提供了一种用于在移植受体中检测和监测来自供体的移植物的移植排斥状态的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,其中该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,供体来源的无细胞核酸的量被确定为:(i)样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;以及c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。在一些实施方案中,PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且PCR定量是实时PCR定量。在一些实施方案中,PCR测定是数字PCR测定并且PCR定量是终点PCR定量。在一些实施方案中,数字PCR测定包括:(a)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:(a)第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且(b)第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对:(a)至少一个单拷贝或多

拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

[0024] 在另一个方面,本文提供了一种用于在移植受体中治疗来自供体的移植物的移植排斥的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,其中该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,供体来源的无细胞核酸的量被确定为:(i)样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来向移植受体施用免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且PCR定量是实时PCR定量。在一些实施方案中,PCR测定是数字PCR测定并且PCR定量是终点PCR定量。在一些实施方案中,数字PCR测定包括:(a)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:(a)第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且(b)第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对:(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

[0025] 在另一个方面,本文提供了一种用于在来自供体的移植物的受体中调整免疫抑制疗法的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)提供在移植后来自移植受体的样本,其中该样本包含来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的PCR定量,供体来源的无细胞核酸的量被确定为:(i)样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;c)如果供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥;以及d)基于供体来源的无细胞核酸的量来调整施用于移植受体的免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,PCR测定是定量PCR(qPCR)测定,并且PCR定量是实时PCR定量。在一些实施方案中,PCR测定是数字PCR测定并且PCR定量是终点PCR定量。在一些实施方案中,数字PCR测定包括:(a)用于单拷

贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或(b)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:(a)第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且(b)第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对:(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

[0026] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,该方法还包括测试传染剂的存在。在一些实施方案中,传染剂选自由病毒、细菌、真菌和寄生生物组成的组。在一些实施方案中,传染剂是选自由巨细胞病毒、Epstein-Barr病毒、指环病毒科和BK病毒组成的组的病毒。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,该方法还包括在受体中进行一种或多种基因表达谱分析测定。在一些实施方案中,基于样本中供体来源的无细胞核酸的量和基因表达谱分析测定的结果来计算组合评分。

[0027] 在另一个方面,本文提供了一种用于检测和监测移植受体中来自供体的移植物的移植排斥状态的试剂盒,其中供体和受体属于不同物种,该试剂盒包含:(a)一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集,其与来自移植受体的样本中的无细胞核酸中的供体特异性或受体特异性靶序列杂交以用于供体来源的无细胞核酸的PCR定量,作为样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或作为样本中供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;以及(b)用于确定供体来源的无细胞核酸的量的数据分析的说明书。在一些实施方案中,PCR定量是qPCR定量。在一些实施方案中,PCR定量是数字PCR定量。

[0028] 在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸和/或受体来源的无细胞核酸是DNA。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸和/或受体来源的无细胞核酸是DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹或它们的组合。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,用校正供体和受体基因组之间的基因组长度差异的校正因子来调整供体来源的无细胞核酸的量。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,用校正来源于供体的无细胞核酸与来源于受体的无细胞核酸之间的无细胞核酸片段大小差异的校正因子来调整供体来源的无细胞核酸的量。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核酸与总或受体来源的无细胞核酸的比率。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量是供体来源的无细胞核

酸与总无细胞核酸相比的百分比。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,移植物是实体器官、组织或细胞移植物。在可与前述方面或实施方案中的任一项组合的一些实施方案中,移植物的供体是动物。在一些实施方案中,动物是猪。

[0029] 在另一个方面,本文提供了一种用于分析来自接受来自供体的实体器官移植物的移植受体的生物样本的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:a)从来自移植受体的生物样本中分离无细胞核酸,其中无细胞核酸包括来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;b)通过扩增无细胞核酸的靶区生成扩增子,其中靶区包括一个或多个包含供体特异性核苷酸序列的靶区和/或一个或多个包含受体特异性核苷酸序列的靶区;c)通过对扩增子测序从所生成的扩增子生成序列读段,其中所生成的序列读段包括对应于供体特异性基因组序列的一个或多个序列读段和/或对应于受体特异性基因组序列的一个或多个序列读段,并且任选地将所生成的序列读段映射到至少供体特异性基因组序列,任选地其中计及供体和受体之间基因组大小的差异;以及c)从样本中生成的序列读段定量无细胞核酸的量。在一些实施方案中,无细胞核酸的量是样本中移植供体来源的无细胞核酸的量。在一些实施方案中,无细胞核酸的量是样本中总无细胞核酸的量。在一些实施方案中,该方法还包括向样本中添加一种或多种定量刺突核酸对照,以及通过对一种或多种刺突核酸对照进行测序来生成对应于一种或多种刺突核酸对照的序列读段,其中对应于刺突对照的序列读段用于确定样本中总无细胞核酸的绝对量。在一些实施方案中,该方法还包括向样本中添加一种或多种定量刺突核酸对照,以及通过对一种或多种刺突核酸对照进行测序来生成对应于一种或多种刺突核酸对照的序列读段,其中来自刺突对照的序列读段用于确定样本中移植供体来源的无细胞核酸的绝对量。在一些实施方案中,在步骤a)之前添加一种或多种定量刺突核酸对照。在一些实施方案中,在步骤a)之后添加一种或多种定量刺突核酸对照。在一些实施方案中,在步骤a)之前和之后添加一种或多种定量刺突核酸对照。在一些实施方案中,该方法还包括使用校正因子来校正供体基因组与受体基因组之间的基因组长度差异来计及供体与受体之间的基因组大小差异。

[0030] 在另一个方面,本文提供了一种用于分析来自接受来自供体的实体器官移植物的移植受体的生物样本的方法,其中供体和受体属于不同物种,该方法包括:从来自受体的生物样本中分离无细胞核酸,其中无细胞核酸包括来源于供体的无细胞核酸和来源于受体的无细胞核酸;通过数字PCR测定来确定样本中供体来源的无细胞核酸的量,其中数字PCR测定包括:(i)用于一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定,或(ii)用于一种或多种单拷贝或多拷贝受体特异性靶和一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且其中通过供体特异性核酸和受体特异性核酸的数字PCR定量,供体来源的无细胞核酸的量被确定为:(i)样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或(ii)供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率;在一些实施方案中,数字PCR测定包括(a)用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的第一数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的第二数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。在一些实施方案中,数字PCR测定针对(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特

异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关;以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

附图说明

[0031] 图1A至图1B示出数字PCR(dPCR)测定的准确性和线性,以确定含有猪和人DNA的混合物的样本中猪DNA的百分比。在含有已知百分比的对照猪和人基因组DNA的对照样本中,使用双拷贝猪特异性靶("猪测定A",参见表2)和单拷贝人特异性靶("人测定A",参见表2),用单重dPCR测定生成图1A所示的结果。x轴示出每个样本中猪DNA的已知百分比(即,"预期的猪DNA%"),y轴示出如使用dPCR测定测量的猪DNA的百分比("测量的猪DNA%")。曲线图中的每个点代表一个样本,并且曲线图上的拟合线和对应公式示出预期和测量结果的线性。图1B中示出的结果是用多重dPCR测定生成的,该多重dPCR测定包括两个单拷贝猪测定("猪测定B"和"猪测定C",参见表2)和一个单拷贝人测定("人测定B",参见表2)。

[0032] 图2提供了来自猪心脏移植物的人移植受体的cfDNA样本中猪供体来源的cfDNA百分比(%dd-cfDNA)和每ml血浆的拷贝(cp/ml)的纵向分析,使用单重dPCR("人测定A"和"猪测定A",参见表2)评估以检测单拷贝人特异性靶和双拷贝猪特异性靶(每个单倍体基因组两个猪拷贝)。如x轴所示,在移植后数天(即,器官移植后第6、13、19、25、33、46、55和60天)从人器官移植受体获得的cfDNA样本中确定猪供体来源的cfDNA的百分比和cp/ml(y轴)。

[0033] 图3提供了使用鸟枪下一代测序(NGS)评估的来自猪心脏移植物的人受体的cfDNA样本中的猪来源的cfDNA百分比的纵向分析。如本文实施例1和表3中所述,根据过滤模型M1-M7分析NGS结果。如x轴所示,在移植后数天(即,器官移植后第6、13、19、25、33、46、55和60天)从人器官移植受体获得的cfDNA样本中确定猪供体来源的cfDNA百分比(y轴)。

[0034] 图4示出如通过单重dPCR("人测定A"和"猪测定A",参见表2)或鸟枪NGS测量的来自猪心脏移植物的人受体的样本中猪供体来源的cfDNA估计百分比的比较。如x轴所示,在移植后数天(即,器官移植后第6、13、19、25、33、46、55和60天)从人器官移植受体获得的cfDNA样本中确定猪供体来源的cfDNA百分比(y轴)。如本文实施例1和表3中所述,根据过滤模型M7分析NGS结果。

[0035] 图5示出如通过单重dPCR("人测定A"和"猪测定A",参见表2)、多重dPCR("人测定B"、"猪测定B"和"猪测定C",参见表2)和鸟枪NGS测量的来自猪心脏移植物的人受体的样本中猪供体来源的cfDNA百分比的比较。如x轴所示,在移植后数天(即,器官移植后第33、46、49和60天)从人器官移植受体获得的cfDNA样本中确定猪供体来源的cfDNA百分比(y轴)。如本文实施例1和表3中所述,根据过滤模型M7分析NGS结果。

[0036] 图6A和图6B示出如通过多重dPCR("人测定C"和"猪测定D",参见表2)或鸟枪NGS测量的来自猪心脏移植物的人死亡模型受体(受体1和受体2)的样本中猪供体来源的cfDNA百分比(%xcfDNA)的比较。在从移植后的人死亡模型受体获得的cfDNA样本中确定猪供体来源的cfDNA百分比(y轴),如x轴所示(即,对于受体1,器官移植后第30、48、72小时,图6A,并且对于受体2,器官移植后第0、12、24、60、66小时,图6B)。如本文实施例1和表3中所述,根据过滤模型M7分析NGS结果。图6C和图6D示出如通过多重dPCR("人测定C"和"猪测定D",参见表2)测量的移植后来自人死亡模型受体1(图6C)和受体2(图6D)的每mL样本的猪基因组拷

贝的比较。

具体实施方式

[0037] 呈现以下描述以使得所属领域的技术人员能够制作和使用各种实施方案。特定设备、技术和应用的描述仅作为示例来提供。对于本领域普通技术人员来说,对本文描述的示例的各种修改将是显而易见的,并且在不脱离各种实施方案的精神和范围的情况下,本文定义的一般原理可以应用于其他示例和应用。因此,各种实施方案不旨在限于本文中所描述的示例,而是应被赋予与权利要求书一致的范围。

[0038] 综述

[0039] 本公开描述了用于检测、预测、诊断和/或监测移植物的健康状态以及用于检测、预测和/或监测来自供体的器官、细胞或组织移植物的受体中的移植排斥状态的灵敏和非侵入性方法和试剂盒,其中供体和受体属于不同物种。此类方法和试剂盒基于对移植后体液中的供体特异性核酸(诸如DNA或RNA)的检测和定量,体液包括但不限于血液、血清、血浆或尿液。

[0040] 将器官、细胞或组织从供体移植到受体中触发来自受体免疫系统的免疫反应,这可能导致急性和/或慢性移植排斥。不希望受理论束缚,认为移植排斥与来自器官、组织或细胞移植物的细胞死亡相关联,这导致供体来源的核酸(诸如供体来源的无细胞DNA(dd-cfDNA))从正在死亡的不再完整的供体细胞中释放到受体的血流和其他体液中。因此,本公开的方法涉及分析来自供体的器官、细胞或组织移植物的受体的样本中的无细胞DNA(cfDNA)以基于dd-cfDNA的量诊断移植物的状态,其中供体和受体属于不同物种。如本文所公开的,可以使用基于核酸测序的方法(例如,高通量测序和/或下一代测序方法)以及用于定量核酸的基于PCR的方法(例如,定量PCR[qPCR]和数字PCR[dPCR])来进行从移植受体获得的样本中的cfDNA的分析。参见本文的实施例1和2。有利地,本公开的基于核酸测序的方法通过计及供体和受体之间的基因组大小差异而在dd-cfDNA的量的估计中提供增强的准确性。参见本文的实施例1和2。类似地,本公开的基于核酸PCR的方法(例如,基于dPCR的方法)例如通过检测在供体的单倍体基因组中以多个拷贝存在的供体特异性靶,在估计稀有量的dd-cfDNA中提供增强的灵敏度和准确性。因此,如本文所证明的,本公开的方法允许例如通过重复地并且在延长的时间段内监测来自移植受体的体液(例如,血液)中的dd-cfDNA的量来对移植受体中的器官、细胞或组织移植物的状态进行灵敏、准确和非侵入性监测。参见例如本文的实施例2和实施例3。

[0041] 定义

[0042] 如在说明书中和所附权利要求书中所用,除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个”、“一种”和“该”包含复数指示物。

[0043] 术语“或”在本文中用于意指术语“和/或”,并且可与术语“和/或”互换使用,除非上下文清楚地另外指示。

[0044] 如本文所用,术语“样本”是指从移植受体获得的任何样本,诸如全血、血浆、血清、淋巴、外周血单核细胞、口腔拭子、唾液、尿液、肺灌洗液或来自活组织检查的组织。

[0045] 如本文所用,术语“移植物”是指从供体到受体中的任何细胞、组织或器官的移植物,包括它们的组合。关于组织或器官的术语“移植物”可以指整个组织或器官(例如,整个

肝脏)或其部分。

[0046] 如本文所用,术语“核酸”是指线性、环状或分支、单链或双链的RNA或DNA,或它们的杂交体。该术语还涵盖RNA/DNA杂交体。在一些情况下,核酸是指DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹以及它们的片段和组合中的任一者。

[0047] 如本文所用,术语“无细胞核酸”是指存在于细胞外的核酸。在一些情况下,无细胞核酸是存在于细胞外并且存在于移植受体的体液(例如,血液、血浆、血清、尿液等)中的核酸。在一些实施方案中,无细胞核酸是指存在于细胞外的任何DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹以及它们的片段和组合。该术语还包括器官特异性或组织特异性RNA转录物。

[0048] 如本文所用,术语“提供样本”是指提供例如用于本公开的方法中的样本。在一些情况下,提供样本包括执行获得样本的过程(例如,执行物理方法)。在一些情况下,样本由执行本公开的方法的各方或实体提供。在其他情况下,样本由除了执行本公开方法的各方或实体之外的实体或一方提供。因此,在一些情况下,本公开的方法包括从另一方或来源(例如,获得样本的第三方)接收样本。

[0049] 如本文所用,术语“生成序列读段”是指执行获得序列读段的过程,例如用于本公开的方法中。例如,生成序列读段可涉及执行测序方法(例如,下一代测序(NGS)方法或高通量测序(HTS)方法)。此类测序方法可涉及全基因组测序或靶向测序,并且可对核酸进行测序,包括但不限于基因组DNA、线粒体DNA、从RNA转录物获得的cDNA、或RNA。在一些实施方案中,可生成至少500个、至少1000个、至少5000个、至少10000个、至少20000个、至少50000个、至少100000个或更多个序列读段。每个序列读段可包括每读段至少20个、至少50个、至少75个、至少100个、至少150个或更多个碱基。序列读段可由执行本公开的方法的各方或实体生成。在其他情况下,序列读取可以由除了执行本公开方法的各方或实体之外的实体或一方生成。因此,在一些情况下,本公开的方法包括从另一方或来源(例如,直接生成或获取序列读段的第三方实验室)接收序列读段的信息或知识,或接收序列读段。

[0050] 如本文所用,术语“靶序列”是指包含感兴趣序列的核酸区。如本文所用,术语“靶”可包含一个或多个靶序列。

[0051] 本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序执行,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。关于本文的某些实施方案提供的任何和所有示例或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在说明这些实施方案,并且不对另外受权利要求保护的实施方案的范围造成限制。说明书中的任何语言都不应被计及为指示对实施方案的实践必不可少的任何不受权利要求保护的要素。

[0052] I.本公开的方法

[0053] 本公开的某些方面涉及用于在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态的方法;用于在移植受体中治疗来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥的方法;以及用于在来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植受体中调整免疫抑制疗法的方法。本公开的其他方面涉及分析来自移植受体的生物样本的方法,例如,以定量无细胞核酸,例如供体来源的无细胞核酸、受体来源的无细胞核酸和/或总无细胞核酸(例如,使用基于测序或PCR的方法)。在一些实施方案中,根据本公开的

器官、组织或细胞移植物是跨物种移植物(即,异种或异源移植物),其中器官、组织或细胞移植供体是与移植受体不同的物种。因此,在一些实施方案中,本公开的方法包括检测、预测、诊断和/或监测移植受体中的跨物种、异种或异源器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态;在移植受体中治疗跨物种、异种或异源器官、组织或细胞移植物的移植排斥;在跨物种或异种器官、组织或细胞移植物的移植受体中调整免疫抑制疗法。

[0054] 在一些实施方案中,本公开的方法包括提供来自移植后供体的器官、组织或细胞移植物的受体的样本,其中来自移植受体的样本包含来源于供体的无细胞核酸(例如,cfDNA和/或cfRNA)和来源于受体的无细胞核酸(例如,cfDNA和/或cfRNA);确定来自样本的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量;以及基于确定的供体来源的无细胞核酸的量检测移植排斥。在一些实施方案中,该方法包括如果确定的供体来源的无细胞核酸的量超过预定阈值,则检测移植排斥。在一些实施方案中,本公开的方法包括至少部分地基于移植排斥的检测(例如,基于确定的供体来源的无细胞核酸的量)向移植受体施用免疫抑制剂治疗。在一些实施方案中,本公开的方法包括至少部分地基于移植排斥的检测(例如,基于确定的供体来源的无细胞核酸的量)调整移植受体的免疫抑制剂治疗。

[0055] 在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量使用基于测序的方法确定,诸如高通量测序(HTS)和/或下一代测序(NGS),如下文更详细描述的。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量使用基于核酸PCR的定量方法确定,诸如定量PCR(qPCR)或数字PCR(dPCR),如下文更详细描述的。

[0056] A.定量无细胞核酸

[0057] 本公开的某些方面涉及用于使用基于测序的方法或基于核酸PCR的定量方法确定来自移植受体的样本中的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量的方法,如下文更详细描述的。

[0058] 本公开的其他方面涉及用于定量来自移植受体的生物样本中的无细胞核酸(诸如受体来源的无细胞核酸、供体来源的无细胞核酸和/或总无细胞核酸)的方法。

[0059] 基于测序的方法

[0060] 在一些实施方案中,本公开的方法包括使用基于核酸测序的方法确定来自移植受体的样本中的无细胞核酸中的无细胞核酸(例如受体来源的无细胞核酸、供体来源的无细胞核酸和/或总无细胞核酸)的量。

[0061] 本领域熟知的用于核酸测序和分析的各种方法和方案可用于本公开的方法中。例如,DNA测序可以使用高通量测序(HTS)技术、全基因组测序、鸟枪测序、全外显子组测序、靶向测序、桑格测序、大规模平行测序技术或下一代测序(NGS)来完成。下一代和高通量测序的示例包括例如大规模平行签名测序、聚合酶克隆测序、454焦磷酸测序、利用HiSeq、MiSeq和其他Illumina平台的Illumina(Solexa)测序、SOLiD测序、离子半导体测序(Ion Torrent)、纳米孔测序(参见例如网站:anoporetech.com/applications/short-fragment-mode)、DNA纳米球测序、heliscope单分子测序、单分子实时(SMRT)测序、MassARRAY®和选定区域的数字分析(DANSR™)。参见例如,Stein RA(2008).“Next-Generation Sequencing Update”.Genetic Engineering&Biotechnology News 28(15);Quail等人,(2012).“A tale of three next generation sequencing platforms:comparison of Ion torrent,pacific biosciences and illuminaMiSeq sequencers”.BMC Genomics 13

(1):341;Liu等人,(2012)."Comparison of Next-Generation Sequencing Systems".Journal of Biomedicine and Biotechnology2012:1-11;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等人,A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma.PrenatDiagn 2010;30:1226-9;以及Suzuki等人,Characterization of circulating DNA in healthy human plasma.Clinicachimica acta;international journal of clinical chemistry 2008;387:55-8。

[0062] 在一些实施方案中,本公开的方法包括生成与来自从移植受体获得的样本的无细胞核酸中的一个或多个供体特异性基因组序列和/或受体特异性基因组序列相对应的序列读段。在一些实施方案中,序列读段使用本领域已知的任何合适的测序方法产生,诸如高通量测序(HTS)技术或下一代测序(NGS),例如如上所述。在一些实施方案中,使用NGS鸟枪测序,例如使用来自Illumina的MiSeq或NextSeq测序平台来生成序列读段。在一些实施方案中,使用配对末端测序来生成序列读段。在一些实施方案中,使用基于扩增子的NGS来生成序列读段,其中在测序之前例如使用PCR来扩增基因组的靶区。在一些实施方案中,使用基于非扩增子的NGS,例如使用杂交捕获NGS来生成序列读段。在一些实施方案中,对于供体和受体基因组,将序列读段分组为相同大小的选定大小的区域。在一些实施方案中,该方法包括将序列读段映射到供体和/或受体特异性基因组序列。在一些实施方案中,映射包括将序列读段与参考序列比对。可以使用本领域已知的任何合适的方法,诸如使用Burrows-Wheeler比对器(BWA)进行比对或映射。在一些实施方案中,以约90%的最小比对评分截止值、约5%的允许的缺口百分比和/或无分裂比对进行序列读段比对。在一些实施方案中,参考序列包含对应于供体的参考基因组和/或对应于受体的参考基因组。在一些实施方案中,参考序列是包含对应于供体的参考基因组和对应于受体的参考基因组的组合参考序列。在一些实施方案中,该方法包括从比对或映射的序列读段中排除与参考序列多重匹配的一个或多个序列读段。在一些实施方案中,该方法包括从比对或映射的序列读段中排除具有缺失配偶的一个或多个序列读段、易位的序列读段和具有不正确取向的序列读段。在一些实施方案中,该方法包括从比对或映射的序列读段中排除比对评分小于95%或小于98%的一个或多个序列读段。在一些实施方案中,该方法包括从比对或映射的序列读段中排除一个或多个部分比对的序列读段或软剪接的序列读段。在一些实施方案中,该方法包括从比对或映射的序列读段中排除一个或多个部分比对的序列读段或硬和软剪接的序列读段,或者其中与MAPQ的比对小于10。

[0063] 在一些实施方案中,基于与供体基因组比对的序列读段的百分比将来自移植受体的样本中的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量确定为与供体和受体基因组比对的序列读段的分数。

[0064] 在一些实施方案中,本公开的方法包括计及受体和供体之间的基因组大小差异以确定样本中供体来源的无细胞核酸的量。

[0065] 在一些实施方案中,基于所生成的序列读段中供体和受体基因组的测序覆盖,计及受体和供体之间的基因组大小差异。在一些实施方案中,基于在所生成的序列读段中跨

供体和受体基因组的所选大小的一个或多个区域的平均覆盖,计及受体和供体之间的基因组大小差异。在此类实施方案中的一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为跨供体和受体基因组的所选大小的一个或多个区域的平均覆盖百分比。在一些实施方案中,所选大小的一个或多个区域足够大以具有足够的覆盖。在一些实施方案中,背景噪声足够低以区分供体和受体基因组。在一些情况下,供体来源的无细胞核酸的量被确定为$m_d/(m_d+m_r)\times100$,其中m_d是跨选定大小的供体基因组的一个或多个区域的平均覆盖的中值,并且m_r是跨选定大小的受体基因组的一个或多个区域的平均覆盖的中值。在一些实施方案中,供体和受体基因组的选定大小的区域包含至多1兆碱基(Mb)、约1Mb和约10Mb之间、至多10Mb、约10Mb和约100Mb之间或至多100Mb中的任一者。在一些实施方案中,供体和受体基因组的选定大小的区域包含至多1M碱基、至多10M碱基或至多100M碱基。

[0066] 在一些实施方案中,使用校正因子计及受体和供体之间的基因组大小差异。例如,对于小于受体基因组的供体基因组,可以通过将映射到供体特异性基因组序列的序列读段的分数乘以供体基因组大小与受体基因组大小的比率来获得校正因子。

[0067] 供体来源的无细胞核酸片段和受体来源的无细胞核酸片段的大小可以不同,参见例如本文的实施例2和表4,这表明与来自人移植受体的无细胞DNA片段相比,在猪供体来源的无细胞DNA片段的平均片段大小方面观察到差异。供体来源的无细胞核酸和受体来源的无细胞核酸之间的片段大小的此类差异可导致对供体来源的无细胞核酸的量的过高估计或过低估计。因此,在一些实施方案中,该方法包括例如使用校正因子计及由于供体来源的无细胞核酸和受体来源的无细胞核酸的片段大小的差异导致的对供体来源的无细胞核酸的量的可能的过高估计或过低估计。例如,校正因子可以通过在人工的和计算机模拟样本中的片段大小比较研究来确定。此外,供体来源的无细胞核酸和受体来源的无细胞核酸之间的片段大小的差异也可导致对在所生成的序列读段中供体和受体基因组的测序覆盖的过高估计或过低估计。例如,与较大的核酸片段相比,较小的核酸片段可获得较大的覆盖。因此,在一些实施方案中,该方法包括例如使用校正因子计及由于供体来源的无细胞核酸和受体来源的无细胞核酸之间的片段大小差异导致的对供体和受体基因组的测序覆盖的可能的过高估计或过低估计。例如,可以通过将覆盖分数(例如,跨供体和受体基因组的选定大小的区域的平均覆盖的分数)乘以平均供体核酸片段大小与平均受体核酸片段大小的比率来确定校正因子。

[0068] 在一些实施方案中,来自移植受体的样本中的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量的绝对定量可通过在生成序列读段之前在来自移植受体的样本中或在来自移植受体的无细胞核酸中包含已知浓度或量的对照核酸(例如,定量刺突核酸对照)来完成。然后基于对应于对照核酸和对应于供体来源的无细胞核酸的序列读段确定供体来源的无细胞核酸的绝对量。

[0069] 在存在来自待测序的移植受体的多个无细胞核酸样本的情况下,诸如当随时间推移从移植受体取得多个样本时或当从各种移植受体取得样本时,可单独对每个样本进行测序,或者可使用多重测序对多个样本一起进行测序。

[0070] 基于核酸PCR的基于定量的方法

[0071] 在一些实施方案中,本公开的方法包括使用核酸PCR定量方法确定来自从移植受体获得的样本的无细胞核酸中的无细胞核酸(例如受体来源的无细胞核酸、供体来源的无

细胞核酸和/或总无细胞核酸)的量。

[0072] 用于核酸定量的各种方法和方案是本领域熟知的,诸如定量核酸扩增方法,包括定量聚合酶链反应(qPCR)、数字PCR(dPCR)和实时dPCR。

[0073] qPCR或实时定量PCR是指使用PCR同时扩增和定量靶核酸的方法。如本领域已知的,qPCR反应中累积的扩增核酸的定量在每个扩增循环后实时进行。可以使用标准曲线进行绝对定量,并且可以使用以下各项进行定量:可检测地标记的探针、引物或染料,诸如,与双链DNA产物结合的嵌入染料,例如YO-PRO-I、SYBR绿等(参见例如Ishiguro等人,Anal.Biochem.,229:207-213(1995);Tseng等人,Anal.Biochem.,245:207-212(1997);Morrison等人,Biotechniques,24:954-962(1998));具有发夹结构的引物,该发夹结构具有保持在荧光淬灭剂附近的荧光分子,直到通过引物延伸而被强制分开(参见例如Whitecombe等人,Nature Biotechnology,17:804-807(1999;"AMPLIFLUOR primers");或序列特异性探针,其通常包含接近荧光淬灭剂的荧光分子,直到它们所附接的寡核苷酸部分特异性结合到扩增产物(参见例如Gelfand等人,美国专利5,210,015(TAQMAN);Nazarenko等人,Nucleic Acids Research,25:2516-2521(1997)(蝎形探针);Tyagi等人,Nature Biotechnology,16:49-53(1998)(分子信标)。可使用的其他合适的染料、引物或探针包括双杂交探针、eclipse探针、LUX PCR引物和QZyme PCR引物。此类染料、引物或探针可与如本文所述的qPCR结合使用,或者它们可用于测量反应完成时反应产物的总量。在一些实施方案中,可检测地标记的探针、引物或染料是荧光标记的,例如,使用FAM、HEX、ATTO 550、ROX、Cy5、Cy5.5或任何其他合适的染料中的一者或多者。

[0074] 数字PCR或dPCR是指允许靶核酸的绝对定量的方法。如本领域已知的,dPCR通过将PCR反应分成多个分区来进行,使得每个分区包含一个、几个或不包含靶序列。在PCR反应后,即,在PCR反应的终点,扩增阳性和分区的总数用于使用泊松统计来定量靶序列。阳性分区可使用可检测地标记的探针、引物或染料来鉴定,例如,如上文针对qPCR所述。在一些实施方案中,可检测地标记的探针、引物或染料是荧光标记的,例如,使用FAM、HEX、ATTO 550、ROX、Cy5、Cy5.5或任何其他合适的染料中的一者或多者。对于dPCR方法的描述,参见例如Hindson等人,(2011)Anal.Chem.83(22):8604-8610;Pohl和Shih(2004)Expert Rev.Mol.Diagn.4(1):41-47;Pekin等人,(2011)Lab Chip 11(13):2156-2166;Pinheiro等人,(2012)Anal.Chem.84(2):1003-1011;Day等人。(2013)Methods 59(1):101-107;以及Quan等人,Sensors(Basel).2018年4月;18(4):1271。可使用本领域已知的任何合适的方法(诸如通过将PCR反应分配到微孔、室或微滴中)来生成多个分区。在其中通过将PCR反应分配到微滴中来生成多个分区的实例中,dPCR方法可被称为微滴数字PCR,例如如从BioRad(ddPCR™)或Stilla(例如,Crystal digital PCR™)可获得的。

[0075] 在一些实施方案中,本公开的方法包括使用数字PCR测定确定样本中供体来源的无细胞核酸的量。

[0076] 在一些实施方案中,dPCR测定包括一个或多个单重dPCR测定。在此类实施方案中的一些实施方案中,单重dPCR测定可包括一个或多个受体特异性单重dPCR测定,和/或一个或多个供体特异性单重dPCR测定。在一些实施方案中,受体特异性单重PCR测定和供体特异性单重PCR测定每单倍体基因组各自具有单拷贝靶。在一些实施方案中,受体特异性单重dPCR测定和/或供体特异性单重dPCR测定中的一些或全部每单倍体基因组具有多拷贝(例

如,双拷贝或更多拷贝)靶,这对于相同量的样本输入生成更多的靶阳性分区(例如,对于相同量的样本输入生成两倍或更多倍的靶阳性分区)以增加测定检测和定量灵敏度和精度。这在供体来源的无细胞核酸在来自样本的总无细胞核酸中的量很少的情况下特别有用。在一些实施方案中,多拷贝靶PCR测定可以靶向多基因家族的多个成员,诸如肌动蛋白、微管蛋白、rRNA基因家族,或重复序列的多个成员,诸如Alu序列,或每二倍体细胞的线粒体DNA的多个拷贝。在一些实施方案中,dPCR测定包括用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关;和/或用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的至少单重数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定包括第一单重数字PCR测定和第二单重数字PCR测定,其中:(a)第一单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,并且(b)第二单重数字PCR测定针对单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二单重数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。可以将通过靶向不同拷贝数靶的不同dPCR测定的无细胞核酸的定量标准化为基因组拷贝定量,以用于分析供体来源的基因组与总供体和受体基因组的相对定量,或每单位样本的供体来源的基因组拷贝(例如,每ml血浆样本的拷贝)的绝对定量。

[0077] 在一些实施方案中,dPCR测定是在单个dPCR反应中包含两个或更多个PCR测定的多重dPCR测定。在一些此类实施方案中,多重dPCR测定可包括至少一个供体特异性PCR测定。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括至少一个供体特异性PCR测定和至少一个受体特异性PCR测定,用于相对于受体或总无细胞核酸定量供体来源的无细胞核酸。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括受体特异性PCR测定和供体特异性PCR测定,各自靶向物种的每单倍体基因组至少一个单拷贝靶。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括受体特异性PCR测定和供体特异性PCR测定,各自靶向每单倍体基因组至少一个多拷贝靶以改进具有有限样本输入的靶检测和定量灵敏度。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括至少一个供体特异性PCR测定,其具有对应于单倍体供体基因组的至少一个单拷贝或多拷贝靶(例如,双拷贝靶或更多拷贝靶)(即,每个供体特异性PCR测定检测对应于供体的至少一个单拷贝或多拷贝靶),其中靶的拷贝数与供体的单倍体基因组相关。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括一个或多个(例如,介于一个和五个之间的)供体特异性PCR测定,其具有对应于供体基因组的至少一个单拷贝或多拷贝靶(例如,至少一个双拷贝靶或更多拷贝靶)(即,每个供体特异性PCR测定检测对应于供体的至少一个单拷贝或多拷贝靶),其中靶的拷贝数与供体的单倍体基因组相关。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括至少一个受体特异性PCR测定,其具有对应于单倍体受体基因组的至少一个单拷贝或多拷贝靶(即,每个受体特异性PCR测定检测对应于受体的至少一个单拷贝或多拷贝靶),其中靶的拷贝数与受体的单倍体基因组相关。在一些实施方案中,多重dPCR测定可包括一个或多个(例如,介于一个和五个之间的)受体特异性PCR测定,其具有对应于受体基因组的至少一个单拷贝或多拷贝靶(即,每个受体特异性PCR测定检测对应于受体的至少一个单拷贝或多拷贝靶),其中靶的拷贝数与受体的单倍体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定至少包括用于在单个数字PCR反应中的两个或更多个单拷贝或多拷贝供体特异性靶和/或受体特异性靶的多重数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关,并且受体特异性靶的拷

贝数与单倍体受体基因组相关。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对:(a)至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及(b)至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,多重数字PCR测定针对至少一个多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

[0078] 在一些实施方案中,dPCR测定包括用于一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定。在一些实施方案中,dPCR测定包括用于一种或多种单拷贝或多拷贝受体特异性靶和一种或多种单拷贝或多拷贝供体特异性靶的至少一个数字PCR测定。在一些实施方案中,dPCR测定包括用于单拷贝或多拷贝受体特异性靶的第一数字PCR测定,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关,以及用于单拷贝或多拷贝供体特异性靶的第二数字PCR测定,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,第二数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶。

[0079] 在一些实施方案中,数字PCR测定针对至少一个单拷贝或多拷贝受体特异性靶,其中受体特异性靶的拷贝数与单倍体受体基因组相关;以及至少一个单拷贝或多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。在一些实施方案中,数字PCR测定针对多拷贝供体特异性靶,其中供体特异性靶的拷贝数与单倍体供体基因组相关。

[0080] 在一些实施方案中,对应于受体的单拷贝靶作为单拷贝存在于受体的单倍体基因组中,并且不存在于供体的基因组中。在一些实施方案中,对应于供体的单拷贝靶作为单拷贝存在于供体的单倍体基因组中,并且不存在于受体的基因组中。在一些实施方案中,对应于供体的多拷贝靶(例如,双拷贝靶或多拷贝靶)以多个(例如,两个或更多个)拷贝存在于供体的单倍体基因组中,并且不存在于受体的基因组中。在一些实施方案中,对应于供体的靶和/或对应于受体的靶在供体或受体基因组的内含子区中。在一些实施方案中,对应于供体的靶和/或对应于受体的靶在供体或受体基因组的线粒体DNA中。在一些实施方案中,对应于供体的多拷贝(例如,双拷贝靶或多拷贝)靶包含供体基因组中多基因家族的序列。多基因家族的非限制性示例包括rRNA、Hox、组蛋白和微管蛋白基因家族。

[0081] 在一些实施方案中,每个受体特异性PCR测定包含例如通过在PCR反应期间直接扩增受体特异性靶来检测受体特异性靶(例如,对应于受体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对。在一些实施方案中,每个供体特异性PCR测定包含例如通过在PCR反应期间直接扩增供体特异性靶来检测供体特异性靶(例如,对应于供体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对。在一些实施方案中,引物对中的每个引物的长度为介于约5和约50之间、介于约10和约50之间、介于约15和约30之间、介于约15和约25之间、介于约18和约30之间或介于约20和约30之间的碱基,包括所述范围中的每一者内的任何值。在一些实施方案中,引物对中的每个引物具有约55℃、约56℃、约57℃、约58℃、约59℃、约60℃、约61℃、约62℃、约63℃、约64℃、约65℃、约66℃、约67℃、约68℃、约69℃或约70℃中的任一者的解链温度(T_m)。在一些实施方案中,引物对中的每个引物具有约60℃的解链温度(T_m)。

[0082] 如上所述,dPCR测定中供体特异性或受体特异性阳性分区的检测可使用任何合适的检测试剂进行,诸如使用DNA结合荧光染料(诸如SYBR绿或EvaGreen)或可检测地标记的探针(例如,荧光标记的探针)。在使用可检测地标记的探针检测供体特异性或受体特异性阳性分区的情况下,受体特异性PCR或供体特异性PCR测定包含适于分别检测受体特异性或

供体特异性靶的可检测地标记的探针。在此类实施方案中的一些实施方案中,每个受体特异性PCR测定包含检测受体特异性靶(例如,对应于受体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对,以及与受体特异性靶杂交的可检测地标记的探针;并且/或者每个供体特异性PCR测定包含检测供体特异性靶(例如,对应于供体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对,以及与供体特异性靶杂交的可检测地标记的探针。在一些实施方案中,可检测地标记的探针包含被配置为与受体特异性靶或与供体特异性靶杂交的寡核苷酸,荧光标签和淬灭剂。在一些实施方案中,荧光标签在寡核苷酸的一端,并且淬灭剂在寡核苷酸的另一端。在一些实施方案中,荧光标签是本领域已知的任何标签或染料,包括但不限于FAM、HEX、ATTO 550、ROX、Cy5和Cy5.5。在一些实施方案中,淬灭剂是本领域已知的任何淬灭剂,例如BHQ、IABkFQ、TAMRA。在一些实施方案中,寡核苷酸包含长度介于约5和约50之间、介于约10和约50之间、介于约15和约30之间、介于约15和约25之间、或介于约20和约30之间的碱基的序列,包括所述范围中的每一者内的任何值。在一些实施方案中,探针具有约60℃、约61℃、约62℃、约63℃、约64℃、约65℃、约66℃、约67℃、约68℃、约69℃或约70℃中的任一者的解链温度(T_m)。在一些实施方案中,探针具有介于约65℃至约70℃之间的解链温度(T_m),包括该范围内的任何值。

[0083] 在一些实施方案中,dPCR测定包括一个或多个单重PCR测定(例如,受体特异性PCR测定,和/或供体特异性PCR测定),并且每个单重PCR测定包括使用具有独特染料或可检测标签(例如,独特荧光染料或标签)的检测试剂。例如,在包括一个或多个单PCR测定(例如,受体特异性PCR测定,和/或供体特异性PCR测定)的dPCR测定中,受体特异性PCR测定包括具有第一荧光标签的检测试剂,并且供体特异性PCR测定包括具有不同于第一荧光标签的第二荧光标签的检测试剂。因此,在一个实施方案中,dPCR测定包括受体特异性PCR测定,其包含检测受体特异性靶(例如,对应于受体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对,以及与受体特异性靶杂交的可检测地标记的探针,其中可检测地标记的探针用第一荧光标签标记;以及供体特异性PCR测定,其包含检测供体特异性靶(例如,对应于供体的单拷贝或多拷贝靶)的引物对,以及与供体特异性靶杂交的可检测地标记的探针,其中可检测地标记的探针用不同于第一荧光标签的第二荧光标签标记。

[0084] 在一些实施方案中,dPCR测定是多重dPCR测定,其在单个dPCR反应中包含两个或更多个PCR测定,例如至少一个供体特异性PCR测定,用于将供体来源的无细胞核酸定量为样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,例如作为每mL样本的绝对供体(基因组)拷贝,例如每mL血浆的拷贝,或作为每DNA量的供体(基因组)拷贝,例如每ng DNA的拷贝。在一些实施方案中,dPCR测定是多重dPCR测定,其在单个dPCR反应中包含两个或更多个PCR测定,例如,至少一个供体特异性PCR测定,以及一个或多个受体特异性PCR测定,用于参考样本中受体来源的无细胞核酸或总供体和受体来源的无细胞核酸进行相对供体来源的无细胞核酸定量,其中包含独特染料或可检测标签(例如,独特荧光染料或标签)的检测试剂用于多重dPCR反应中的每个PCR测定;或其中多重dPCR反应中的至少两个PCR测定包含含有相同染料或可检测标签(例如,相同荧光染料或标签)的检测试剂。因此,在一个实施方案中,在单个dPCR反应中包含至少一个受体特异性PCR测定和至少一个供体特异性PCR测定的多重dPCR测定中,dPCR反应中的每个PCR测定可包含具有独特荧光染料或标签的检测试剂。例如,多重dPCR测定可以包括具有对应于受体的单拷贝或多拷贝靶的至少一个受体特异性PCR测定和具有对应于供体的单拷贝或多拷贝(例如,双拷贝或更多拷贝)靶的至少一个供

体特异性PCR测定,其中dPCR反应中的每个PCR测定(即,每个受体特异性PCR测定和每个供体特异性PCR测定)包括具有独特荧光染料或标签的检测试剂。在另一个实施方案中,在单个dPCR反应中包含至少一个受体特异性PCR测定和至少一个供体特异性PCR测定的多重dPCR测定中,dPCR反应中的至少两个受体特异性或供体特异性PCR测定包含含有相同染料或可检测标签(例如,相同荧光染料或标签)的检测试剂。例如,多重dPCR测定可以包括具有对应于受体的单拷贝或多拷贝靶的至少一个受体特异性PCR测定和具有对应于供体的单拷贝或多拷贝(例如,双拷贝或更多拷贝)靶的两个或更多个供体特异性PCR测定,其中dPCR反应中的至少两个供体特异性PCR测定包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂。

[0085] 来自移植受体的无细胞核酸样本中存在的供体来源的无细胞核酸的量(例如,如根据本公开的方法确定)可以以多种方式表达。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为样本中总无细胞核酸的百分比。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为样本中供体来源的无细胞核酸与总无细胞核酸(例如,总供体来源的无细胞核酸和受体来源的无细胞核酸)的比率。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为样本中供体来源的无细胞核酸与受体来源的无细胞核酸的比率。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量被确定为与样本中的一种或多种参考核酸分子相比的比率或百分比。例如,供体来源的无细胞核酸的量可被确定为无细胞核酸样本中总核酸(或总DNA或RNA)分子的10%。另选地,供体来源的无细胞核酸的量与无细胞DNA样本中的总核酸(或DNA或RNA)分子相比的比率可以是1:10。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量可被确定为浓度。例如,无细胞核酸样本中供体来源的无细胞核酸的量可被确定为1μg/mL样本;100个供体(基因组)拷贝/mL样本;10个供体(基因组)拷贝/DNA量,诸如10个供体(基因组)拷贝/ng DNA等。本文所述的值仅是示例性的,以说明表达供体来源的无细胞核酸的量的各种方式。来自移植受体的无细胞核酸样本中供体来源的无细胞核酸的百分比可以是极低的。需注意,无细胞核酸样本中受体来源的无细胞核酸的量也可以如对供体来源的无细胞核酸所述的方式表达。表达无细胞核酸样本中给定来源、类型或序列的核酸的量的附加方法对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0086] 在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量参考通过dPCR测定分析的样本的量来确定。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量可被确定为来自移植受体的样本中供体基因组的拷贝数(例如,每mL样本,或样本中每无细胞核酸量的供体基因组的拷贝数)。在一个实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量可被确定为每体积来自受体的样本的供体基因组的拷贝数,诸如每体积(例如mL)来自受体的血浆的供体基因组的拷贝数。在另一个实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量可被确定为来自受体的样本中每总无细胞核酸量的供体基因组的拷贝数,诸如来自受体的样本中每ng无细胞核酸的供体基因组的拷贝数。在一个示例中,将如通过dPCR测定确定的供体特异性靶序列分子的拷贝数(例如,作为每μL的供体DNA分子的拷贝数)调整为dPCR测定中供体特异性单倍体基因组的拷贝数(例如,在用于对应于供体单倍体基因组的双拷贝靶的供体特异性PCR测定中,将如通过dPCR测定确定的供体靶序列的拷贝数除以两个拷贝/单倍体基因组)。如通过dPCR测定确定的受体靶序列分子的拷贝数可以如上文针对供体特异性靶序列所述进行调整。接下来,基于用于dPCR测定的体积、来自样本的无细胞核酸的体积(例如,从来自移植受体的样本提取的无细

胞核酸的体积)和来自移植受体的样本的体积(例如,来自从其提取无细胞核酸的移植受体的样本的体积),确定来自移植受体的样本中供体基因组的拷贝数(例如,每mL样本,或样本中每无细胞核酸量的供体基因组的拷贝数)。在dPCR反应中的两个或更多个PCR测定(例如,在多重dPCR测定中)包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂的情况下,该方法还包括将包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂的PCR测定的数量标准化。在包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂的dPCR反应中具有两个供体特异性单拷贝靶PCR测定的多重dPCR测定的一个示例中,如通过dPCR测定确定的供体特异性靶序列的拷贝数(例如,作为每μL的供体特异性序列的拷贝数总和)由包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂的dPCR反应中的供体特异性PCR测定的数量调整(除以该数量)(例如,在具有包含具有相同荧光染料或标签的检测试剂的两个供体特异性PCR测定的dPCR测定中,每μL的供体基因组的拷贝数通过将测量的总拷贝/μL除以二来获得),并且调整为PCR测定中每个供体特异性靶的拷贝数(例如,在用于对应于供体的双拷贝靶的供体特异性PCR测定中,供体基因组的拷贝数通过将测量的拷贝/μL除以二来获得)。如通过dPCR测定确定的受体基因组的拷贝数(例如,作为每μL的受体基因组的拷贝数)也可以如上文针对供体基因组的拷贝数所描述的那样进行调整。接下来,基于用于dPCR测定的体积、来自样本的无细胞核酸的体积(例如,从来自移植受体的样本提取的无细胞核酸的体积)和来自移植受体的样本的体积(例如,来自从其提取无细胞核酸的移植受体的样本的体积),确定来自移植受体的样本中供体基因组的拷贝数(例如,每mL样本,或样本中每无细胞核酸量的供体基因组的拷贝数)。在一些实施方案中,使用以下步骤中的一个或多个或全部来确定供体来源的无细胞核酸的量:(1)将来自dPCR仪器的供体靶拷贝/μl除以每单倍体基因组的供体靶拷贝数(如果在荧光通道中组合多于1个供体靶测定,也除以荧光通道中的供体靶测定数),得到反应中的供体靶拷贝/μl;(2)通过将反应中供体靶拷贝/μl乘以反应体积来计算反应中的总供体基因组拷贝;(3)将反应中的总供体基因组拷贝除以反应中使用的核酸样本的体积,得到每体积核酸样本的总供体基因组拷贝;(4)将每核酸体积的样本的总供体基因组拷贝乘以从核酸提取获得的核酸样本的总体积,得到从核酸提取获得的总供体基因组拷贝;以及(5)通过将从核酸提取获得的总供体基因组拷贝除以在核酸提取中使用的血浆体积来计算来自受体的每体积血浆的总供体基因组拷贝。

[0087] 在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸的量基于通过样本中供体特异性核酸和受体特异性核酸两者的dPCR测定的定量,被确定为供体来源的无细胞核酸与总供体特异性核酸和受体特异性核酸的比率。在一些实施方案中,将如通过dPCR测定确定的供体基因组的拷贝数(例如,作为每μL反应的供体基因组的拷贝数)调整为dPCR测定中每个供体特异性靶的拷贝数(例如,对于对应于供体的双拷贝靶,将如通过dPCR测定确定的供体基因组的拷贝数除以二)。如通过dPCR测定确定的受体基因组的拷贝数(例如,作为每μL反应的受体基因组的拷贝数)可以如上文针对供体基因组的拷贝数所描述的那样进行调整。然后确定供体基因组拷贝与受体基因组和供体基因组的总组合拷贝数的比率。在一些情况下,确定供体基因组拷贝与受体基因组和供体基因组的总组合拷贝数的分数或百分比。

[0088] B.器官、组织或细胞移植排斥状态

[0089] 例如,器官、组织或细胞的移植后,受体可能经历免疫静止,这是一种状态,其特征在于缺乏或低水平的免疫活性或缺乏排斥相关临床症状,诸如活组织检查证实的排斥,或

器官功能的显著变化,例如,如升高的血清肌酐水平、降低的估计肾小球滤过率、异常超声心动图结果或指示对活组织检查的临床需求的一些其他临床问题所指示的。

[0090] 另选地,受体可能经历主动排斥,这可能是由于T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或两者的组合(即,“混合”排斥)。ABMR是指器官、组织或细胞移植物的抗体介导的排斥,包括但不限于急性活性抗体介导的排斥、慢性活性抗体介导的排斥和慢性稳定抗体介导的排斥。TCMR是指器官、组织或细胞移植物的细胞或T-细胞介导的排斥,包括但不限于TCMR IA、IB、IIA、IIB、临界TCMR和慢性TCMR。

[0091] 因此,在一些实施方案中,如通过本文提供的方法中的任一种方法确定的器官、组织或细胞移植物的状态可以是不存在排斥,例如以免疫静止为特征。在其他实施方案中,如通过本文提供的方法中的任一种方法确定的器官、组织或细胞移植物的状态可以是存在排斥,诸如主动排斥、T细胞介导的排斥、抗体介导的排斥或混合排斥。在另外的实施方案中,如通过本文提供的方法中的任一种方法确定的器官、组织或细胞移植物的状态可以是预测有排斥的风险和可能性,诸如主动排斥、T细胞介导的排斥、抗体介导的排斥或混合排斥。

[0092] 检测移植排斥

[0093] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态。在一些实施方案中,该方法包括如果从移植受体获得的样本中的无细胞核酸中的供体来源的无细胞核酸的量(例如,如根据本公开的方法确定的)超过预定阈值,则检测移植排斥。

[0094] 预定阈值通常是指任何预定水平或水平范围,其指示病症的存在或不存在,或病症存在或不存在的风险或可能性的存在或不存在,诸如排斥或不排斥。根据本公开的预定阈值可以采取多种形式。它可以是单个截止值,诸如中值或平均值。作为另一个示例,预定阈值可以在病症存在、或病症存在的风险或可能性之前,或在治疗过程之后从基线值确定。这样的基线可以指示移植受体中与被测试的风险或病症不相关的正常或其他状态。例如,基线值可以是在移植前来自移植受体的样本中供体来源的无细胞核酸(诸如供体来源的无细胞DNA)的水平,其大概为零或可忽略不计,但也可以指示系统中的基线误差。在一些实施方案中,预定阈值可以是被测试的移植受体的基线值。当预定阈值涉及界定移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量的显著变化时,其可显著变化。本领域技术人员将认识到用于确定移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量随时间推移的显著变化的适当参数和方式。一旦选择了适当的分析参数,确定移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量在一段时间内的变化可通知移植物的状态。

[0095] 在一些实施方案中,移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量随时间推移的增加指示移植排斥或移植排斥的风险或可能性、需要施用或调整免疫抑制疗法、免疫抑制治疗肾毒性、感染和/或需要进一步研究移植状态。不希望受理论束缚,据信如果供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量在移植受体中随时间推移增加,则移植物的细胞随时间推移越来越多地经历细胞凋亡和/或坏死,这指示移植排斥或移植排斥的风险或可能性。

[0096] 在一些实施方案中,移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量随时间推移的减少指示移植耐受、需要调整免疫抑制疗法(例如,减少)和/或需要进一步研究移植状态。不受理论的束缚,据信如果供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量在移植受体中随时间推移减少,则移植物的细胞随时间推移逐渐减少地经历细胞凋亡和/或坏死,这指示移植

物耐受、过度免疫抑制或适当的免疫抑制。

[0097] 在一些实施方案中,移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量随时间推移没有变化指示稳定的移植排斥状态和/或调整免疫抑制疗法的机会。不希望受理论束缚,据信如果供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量在移植受体中不随时间推移而变化,则移植无的细胞随时间推移经历稳态水平的细胞凋亡,这指示稳定的移植排斥状态。稳定的移植排斥状态可以在分析的时间窗口期间通知移植物的状态,但是可能不通知移植物正在朝向排斥或耐受的方向。例如,移植物可以在移植受体中经历主动排斥,但是稳定的移植排斥状态指示排斥速率在其被分析的时间期间不改变(即,移植排斥速率不增加或降低)。类似地,移植物可以在移植受体中经历主动耐受,但是稳定的移植排斥状态指示耐受速率在其被分析的时间期间不改变(即,移植耐受速率不增加或降低)。

[0098] C.施用或调整免疫抑制疗法

[0099] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括在移植受体中治疗来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥,和/或在来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植受体中调整免疫抑制疗法。

[0100] 免疫抑制疗法通常是指施用免疫抑制剂或抑制移植受体免疫反应的其他治疗剂。移植受体中免疫抑制的医疗实践已发展为包括预防性药物制剂的方案,通常从诱导疗法开始以消耗淋巴细胞,随后是旨在抑制淋巴细胞的活化或复制的维持药物,诸如皮质类固醇、钙调神经磷酸酶抑制剂(诸如他克莫司)和淋巴细胞复制的附加抑制剂(诸如霉酚酸酯)。移植后,免疫抑制剂的剂量可随时间推移减少以降低副作用的发生率和严重性,诸如增加的感染性疾病的风险,同时仍避免移植物的免疫排斥。

[0101] 在一些实施方案中,可响应于对器官、组织或细胞移植物的排斥的鉴定而施用或推荐施用免疫抑制疗法,该排斥包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。在其他实施方案中,可响应于对器官、组织或细胞移植物的排斥,或排斥的风险或可能性的鉴定而增加或推荐增加免疫抑制疗法剂量或频率,该排斥包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。例如,响应于TCMR的鉴定,就剂量和/或频率而言,可以开始(或推荐开始)类固醇推注治疗,或者可以增加(或推荐增加)维持免疫抑制疗法。在另一个示例中,响应于ABMR的鉴定,可以开始(或推荐开始)血浆取出或静脉注射免疫球蛋白(IVIg)。

[0102] 在其他实施方案中,免疫抑制疗法剂量或频率可响应于器官、组织或细胞移植物的排斥(例如免疫静止)的不存在的鉴定而被维持或推荐维持。在其他实施方案中,免疫抑制疗法剂量或频率可响应于器官、组织或细胞移植物的排斥(例如免疫静止)的不存在的鉴定而被减少或推荐减少。在其他实施方案中,免疫抑制疗法剂量或频率可响应于器官、组织或细胞移植物的排斥(例如免疫静止)的不存在的鉴定而被停止或中断或推荐停止或中断。

[0103] 在其他实施方案中,本公开的方法可包括相对于施用或推荐施用的药剂修改免疫抑制疗法。在一些实施方案中,例如响应于对器官、组织或细胞移植物的排斥的鉴定,免疫抑制疗法可替代(或被推荐替代)另一种免疫抑制疗法,该排斥包括T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。在其他实施方案中,例如响应于对器官、组织或细胞移植物的排斥的鉴定,免疫抑制疗法可与一种或多种附加免疫抑制疗法组合施用(或被推荐与一种或多种附加免疫抑制疗法组合施用),该排斥包括T细胞介导的排斥

(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。

[0104] 免疫抑制疗法和对免疫抑制疗法的修改(例如,用一种疗法替代另一种疗法,或组合疗法)可基于各种因素来选择,诸如以下可能性:免疫抑制疗法将减轻或减少器官、组织或细胞移植物的排斥,减轻或减少器官、组织或细胞移植物的排斥的症状,减少器官、组织或细胞移植物的排斥的任何直接或间接病理后果,降低器官、组织或细胞移植排斥的速率,改善或缓和器官、组织或细胞移植排斥状态,改进器官、组织或细胞移植物的预后,或减缓器官、组织或细胞移植排斥的进展。

[0105] 应当注意,移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量可能不是确定是否需要施用或调整免疫抑制疗法时所考虑的唯一因素。例如,对于同时表现出移植物的排斥和感染严重性增加的移植受体,增加或甚至维持目前的免疫抑制疗法可能是不可取的。因此,应当注意,施用于移植受体的免疫抑制疗法可以增加、减少或维持,而与移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的确定量无关,这取决于其他控制或起作用的临床因素的存在或不存在。因此,当选择、施用、修改或调整免疫抑制疗法时可考虑的附加因素包括预防、控制、改善或减少免疫抑制疗法的不良作用,诸如不良事件、不期望的副作用、毒性、不期望的药物-药物相互作用、不期望的症状等。

[0106] 可根据本公开的方法使用的示例性免疫抑制疗法包括但不限于钙调神经磷酸酶抑制剂、mTor抑制剂、ACE抑制剂、抗凝血剂、抗疟药、β-阻断剂、皮质类固醇、心血管药物、非甾体抗炎药(NSAID)和类固醇,包括例如阿司匹林、硫唑嘌呤、B7RP-1-fc、布喹那钠、campath-1H、塞来考昔、氯喹、香豆素、环磷酰胺、环孢菌素A、DHEA、脱氧精胍菌素、地塞米松、双氯酚酸、二氟尼柳、依托度酸、依维莫司、FK778、吡罗昔康、非诺洛芬、氟比洛芬、肝素、肼屈嗪、羟氯喹、CTLA-4或LFA3免疫球蛋白、布洛芬、吲哚美辛、ISAtx-247、酮洛芬、酮咯酸、来氟米特、甲氯芬那酸、甲芬那酸、麦帕克林、6-巯基嘌呤、美洛昔康、甲氨蝶呤、咪唑立宾、霉酚酸衍生物、萘普生、奥沙普秦、氯奎宁、NOX-100、泼尼松、甲泼尼龙、雷帕霉素(西罗莫司)、舒林酸、他克莫司(FK506)、胸腺球蛋白、托美汀、曲培莫司、UO126,以及抗体,包括例如α淋巴细胞抗体、阿达木单抗、抗CD3、抗CD25、抗CD52、抗IL2R、抗TAC抗体、巴利昔单抗、达利珠单抗、依那西普、hu5C8、英夫利昔单抗、OKT4和那他珠单抗,或它们的任何组合。

[0107] 施用或调整移植相关疗法

[0108] 本公开的方法还可用于通知需要施用或调整其他移植相关疗法。一般来讲,移植受体中超过预定阈值的供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量可传达关于确定需要施用或调整其他移植相关疗法的信息。

[0109] 其他移植相关疗法包括除移植或免疫抑制疗法外的治疗或疗法,其被施用于移植受体以促进移植物的存活或治疗移植相关症状(例如,细胞因子释放综合征、神经毒性)。其他移植相关疗法的示例包括但不限于施用抗体、抗原靶向配体、非免疫抑制药物以及使对移植物活性至关重要的移植物的组分稳定或不稳定或者直接激活或抑制一种或多种移植物活性的其他药剂。这些活性可包括诱导、修改或减弱免疫反应、识别特定抗原、复制和/或诱导受损组织修复的能力。

[0110] 调整对移植受体的监测

[0111] 本公开的方法还可用于通知需要调整对移植物的受体的监测。一般来讲,移植受体中超过预定阈值的供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的量可传达关于确定需要调整对

移植物的受体的监测的信息。在一些实施方案中,如上所述,确定移植物的状态传达关于确定需要调整对移植物的受体的监测的信息。

[0112] 根据移植物的状态,可以相应地调整对受体的监测。例如,可以通过适当地增加或降低监测频率来调整监测。监测可以通过改变监测方式(例如,通过改变用于监测受体的度量或测定)来调整。

[0113] D.报告

[0114] 在一些实施方案中,本文所述的方法可包括生成和/或提供报告。

[0115] 在一些实施方案中,报告包括对移植受体中的器官、组织或细胞移植排斥状态的评估或诊断,例如根据本文所述的方法确定的。在一些实施方案中,报告指示存在器官、组织或细胞移植物的排斥,该排斥包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。在一些实施方案中,该报告指示器官、组织或细胞移植排斥的风险或可能性,该排斥包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥。在一些实施方案中,报告指示不存在器官、组织或细胞移植物的排斥,例如免疫静止。在一些实施方案中,报告包括例如至少部分地基于根据本文提供的方法对器官、组织或细胞移植物的排斥的检测而建议向移植受体施用免疫抑制疗法,该排斥包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥,例如如上文更详细描述的。在一些实施方案中,报告包括例如至少部分地基于根据本文提供的方法对器官、组织或细胞移植物的排斥的存在或不存在的检测来建议调整或修改向移植受体施用的免疫抑制疗法,例如建议增加、减少或维持剂量或频率,或中断或修改免疫抑制疗法,如上文更详细描述的。

[0116] 在一些实施方案中,报告指示受体中存在器官、组织或细胞移植物的排斥(例如,包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥),并且包括建议向移植受体施用免疫抑制疗法,例如如上文更详细描述的。在一些实施方案中,报告指示存在器官、组织或细胞移植物的排斥(例如,包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥),并且包括建议调整向移植受体施用的免疫抑制疗法,例如,增加剂量或频率,或修改免疫抑制疗法,如上文更详细描述的。在一些实施方案中,报告指示受体中器官、组织或细胞移植物的排斥(例如,包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥)的风险或可能性,并且包括建议向移植受体施用免疫抑制疗法,例如如上文更详细描述的。在一些实施方案中,报告指示器官、组织或细胞移植物的排斥(例如,包括器官、组织或细胞移植物的T细胞介导的排斥(TCMR)、抗体介导的排斥(ABMR或AMR)或混合排斥)的风险或可能性,并且包括建议调整向移植受体施用的免疫抑制疗法,例如,增加剂量或频率,或修改免疫抑制疗法,如上文更详细描述的。在一些实施方案中,报告指示不存在器官、组织或细胞移植物的排斥,并且包括建议调整或修改施用于移植受体的免疫抑制疗法的建议,例如,以维持或减少剂量或频率,或者中断或修改免疫抑制疗法,如上文更详细描述的。

[0117] 根据本公开的报告可以是任何合适的形式,诸如数字形式、电子形式、基于网络的形式或纸质形式。在一些实施方案中,可将报告提供给一方或多方,诸如移植受体、护理者、医师、医院、诊所、第三方支付者、保险公司、政府机关以及它们的任何组合。

[0118] 在一些实施方案中,报告可包括关于预后或潜在或建议的治疗选项的信息。该报告可包括关于治疗选项的可能有效性、治疗选项的可接受性或者将治疗选项应用于移植受体的合理性的信息。例如,该报告可包括关于药物(诸如免疫抑制疗法)的施用的信息或推荐,以及推荐的剂量或治疗方案,和/或与其他药物组合。

[0119] 在一些实施方案中,从获得或接收来自移植受体的样本,或从确定器官、细胞或组织移植物的状态(例如,器官、细胞或组织移植物的排斥的存在或不存在)起,可在少于一天内,或在约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约一周、约两周、约三周、约四周或约一个月中的任何时间内生成和/或向一方提供报告。

[0120] II.无细胞核酸

[0121] 本文提供的方法涉及分析来自移植受体的无细胞核酸(例如,无细胞DNA、RNA、mRNA、miRNA、双链DNA、单链DNA、单链DNA发夹、DNA/RNA杂交体、RNA发夹以及它们的组合)以检测和监测移植受体中器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态。

[0122] 无细胞核酸通常是指存在于细胞外或在细胞外循环的核酸,诸如例如,存在于移植受体的体液(例如,血液、血浆、血清、尿液等)中的核酸。无细胞核酸可起源于细胞内的不同位置。例如,无细胞核酸(诸如无细胞DNA)可源自例如核DNA和/或线粒体DNA。不希望受理论束缚,据信无细胞核酸是经由细胞的细胞凋亡或坏死(即,细胞死亡)从细胞中释放的。因此,不希望受理论束缚,据信在移植排斥期间,来自器官、组织或细胞移植物的细胞的细胞凋亡或坏死将导致供体来源的无细胞核酸被释放到移植受体的体液中。经历移植排斥的移植受体然后可以在其体液中具有无细胞核酸群体,该无细胞核酸群体包括其自身的内源无细胞核酸(受体来源的无细胞核酸)以及源自供体的无细胞核酸(供体来源的无细胞核酸)。因此,如本文所公开,根据本公开的方法评估移植受体中供体来源的无细胞核酸的水平可用于检测、预测、诊断和/或监测器官、组织或细胞移植物的状态。

[0123] 在一些实施方案中,本公开的方法包括例如根据本文提供的检测/定量方法中的任一者来确定包含来自移植受体的无细胞核酸的样本中供体来源的无细胞核酸的量。如下文更详细描述的,来自移植受体的样本可以是或来源于任何体液,包括全血、血浆、血清、淋巴、尿液、口腔拭子、骨髓、唾液、汗液、肺灌洗液、泪液、耳流液、痰、流体骨髓悬浮液、精液、阴道流、脑脊髓液、脑液、腹水、乳汁、呼吸道分泌物、肠道液或泌尿生殖道液。在一些实施方案中,样本是或来源于尿液。在一些实施方案中,样本是或来源于全血或其级分(例如,血清或血浆)。在一些实施方案中,样本是或来源于血浆。在一些实施方案中,样本中存在的无细胞核酸可以完全是受体来源的,或者可以包括受体来源的和供体来源的核酸的混合物。

[0124] 在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸是供体来源的无细胞DNA,并且/或者受体来源的无细胞核酸是受体来源的无细胞DNA。在一些实施方案中,供体来源的无细胞核酸是供体来源的无细胞RNA,并且/或者受体来源的无细胞核酸是受体来源的无细胞RNA。在一些实施方案中,无细胞RNA包含组织特异性RNA转录物。在一些实施方案中,可分析来自移植受体的无细胞RNA的基因表达水平以检测、预测、诊断和/或监测器官、组织或细胞移植物的状态。

[0125] A.提取

[0126] 来自移植受体的样本的无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)可以在根据本公开的方法进行分析之前提取。提取无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)的方法是本

领域已知的,参见例如Current Protocols in Molecular Biology,最新版。可使用的示例性非限制性方法包括Triton-Heat-Phenol(THP)方法(Xue等人,(2009)Clin.Chim.Acta 404,100-104),苯酚-氯仿异戊醇分离(PCI)方案(Yuan等人,(2012)Yonsei Med.J.53:132;Schmid等人,(2005)Clin.Chem.51,1560-1561;以及Hufnagl等人(2013)J.Nucleic Acids Investig.4,1-3),以及盐析法(Miller等人,(1988)Nucleic Acids Res.16:1215;Jorgez等人(2006)Genet.Med.8,615-619)。提取无细胞核酸的其他示例性非限制性方法是本领域已知的,参见例如Cell-Free Plasma DNA as a Predictor of Outcome in Severe Sepsis and Septic Shock.Clin.Chem.2008,第54卷,第1000-1007页;Prediction of MYCN Amplification in Neuroblastoma Using Serum DNA and Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction.JCO 2005,第23卷,第5205-5210页;Circulating Nucleic Acids in Blood of Healthy Male and Female Donors.Clin.Chem.2005,第51卷,第1317-1319页;Use of Magnetic Beads for Plasma Cell-free DNA Extraction:Toward Automation of Plasma DNA Analysis for Molecular Diagnostics.Clin.Chem.2003,第49卷,第1953-1955页;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;以及Swinkels等人,Effects of Blood-Processing Protocols on Cell-free DNA Quantification in Plasma.Clinical Chemistry,2003,第49卷,第3期,525-526。本领域已知的用于提取无细胞核酸的任何方法可用于本公开的方法中。在一些实施方案中,从样本中提取无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)可使用可商购获得的试剂盒进行,诸如Qiagen QIAamp循环核酸试剂盒、BioChaincfPure无细胞DNA提取试剂盒、ThermoFisher Scientific MagMax无细胞DNA分离试剂盒、Roche MagNa Pure 24系统、Zymo Quick-cfDNA血清和血浆试剂盒、或Macherey-Nagel NucleoSnap cfDNA试剂盒、NucleoSpin Gel和PCR Clean-Up试剂盒或NucleoSpin Plasma XS试剂盒。在一些实施方案中,从样本中提取无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)使用Qiagen QIAamp循环核酸试剂盒进行。

[0127] 在一些实施方案中,例如在根据本公开的方法进行分析之前,可以进一步评估无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)的质量、数量(例如浓度或绝对量)和/或片段大小。无细胞核酸的定量、质量分析和/或片段大小分析可以使用本领域已知的任何方法进行,诸如荧光dsDNA测定(例如,使用来自ThermoFisher的Quant-iTPicoGreen dsDNA测定试剂盒),使用荧光计诸如使用Qubit测定、实时PCR、定量PCR或数字微滴PCR(参见例如Rago等人,(2007)Cancer Res.67,9364-9370;Takai等人(2015)Sci.Rep.5:18425;Rostami等人,(2020)Cell Rep.31:107830;He等人,(2019)Sci.Rep.9:5599),使用生物分析仪(例如,使用高灵敏度DNA微芯片试剂盒(Agilent Technologies)和Agilent 2100生物分析仪)。在一些实施方案中,还可以评估无细胞核酸是否存在修饰,诸如甲基化。可以使用本领域已知的用于分析核酸修饰的任何合适的方法,诸如基于亚硫酸氢盐的甲基化分析,例如使用试剂盒,诸如来自Qiagen的EpiTect Plus DNA亚硫酸氢盐试剂盒或PyroMark PCR试剂盒。

[0128] 在一些实施方案中,至少约10ng、20ng、30ng、40ng、50ng、100ng、200ng、300ng、400ng、500ng、600ng、700ng、800ng、900ng、1000ng、2000ng、3000ng、4000ng、5000ng中的任一者或更多的无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)可以例如在提取后从来自移植受体的样

本中获得。在一些实施方案中,介于约50ng和约5000ng之间、介于约100ng和约4000ng之间、或介于约200ng和约4000ng之间(包括每个所述范围内的任何值)的无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)可以例如在提取后从来自移植受体的样本中获得。在一些实施方案中,用于在本公开的方法中使用的无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)例如在提取后可具有至少约0.01ng/μL、0.1ng/μL、0.5ng/μL、0.75ng/μL、1ng/μL、5ng/μL、10ng/μL、15ng/μL、20ng/μL、25ng/μL、30ng/μL、35ng/μL、40ng/μL、45ng/μL、50ng/μL、55ng/μL、60ng/μL、65ng/μL、70ng/μL中的任一者或更高的浓度。在一些实施方案中,用于在本公开的方法中使用的无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)例如在提取后可具有介于约1ng/μL和约100ng/μL之间、介于约1ng/μL和约70ng/μL之间或介于约4ng/μL和约70ng/μL之间的浓度,包括每个所述范围内的任何值。

[0129] B.扩增

[0130] 从移植受体获得的样本中分离的无细胞核酸(诸如无细胞DNA或无细胞RNA)可例如根据本公开的方法被扩增用于下游技术和分析。

[0131] 扩增核酸的方法是本领域熟知的。扩增通常是指可生成核酸拷贝的任何设备、方法或技术。无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)的扩增可涉及例如等温扩增技术诸如环介导的等温扩增(LAMP)和聚合酶链反应(PCR)技术如线性扩增(参见USPN 6,132,997)、滚环扩增等。可通过例如qPCR、dPCR或测序扩增无细胞核酸(例如,无细胞DNA或RNA)以用于下游分析。在其中无细胞核酸是无细胞RNA的情况下,该方法可包括例如使用逆转录酶从无细胞RNA生成DNA的步骤。Fluidigm Access Array™系统、RainDance Technologies RainDrop系统或用于多重扩增的其他技术可用于多重或高度平行的单重核酸扩增。扩增可涉及使用高保真聚合酶,诸如例如FastStart High Fidelity(Roche)、Expand High Fidelity(Roche)、Phusion Flash II(ThermoFisher Scientific)、Phusion Hot Start II(ThermoFisher Scientific)KAPA HiFi(Kapa BioSystems)或KAPA2G(Kapa Biosystems)。

[0132] 扩增可以包括初始PCR循环,其向每个单独的分子添加独特的序列,称为分子索引。扩增的核酸还可以经历附加过程,诸如索引(也称为条形码或标记)。对核酸进行索引的方法是本领域熟知的并且在本文中描述。索引允许使用多重测序平台,其与多种测序系统相容,诸如Illumina HiSeq、MiSeq和ThermoFisher Scientific Ion PGM以及Ion Proton。多重测序允许通过使用索引在单一反应中对来自多个样本的核酸进行测序,以特异性地鉴定所测序的核酸的样本来源。

[0133] III.样本

[0134] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括确定来自移植受体的一个或多个样本(例如一个或多个生物样本,诸如一个或多个包含无细胞核酸的样本)中供体来源的无细胞核酸的量。

[0135] 通常,根据本文提供的方法的样本可以是(或可以来源于)任何体液,包括全血、血浆、血清、淋巴、外周血单核细胞、尿液、口腔拭子、骨髓、唾液、汗液、肺灌洗液、泪液、耳流液、痰、来自骨髓悬浮液的流体、精液、阴道流、脑脊髓液、脑液、腹水、乳汁、呼吸道分泌物、肠道液或泌尿生殖道液的样本。在一些实施方案中,样本是或来源于尿液。在一些实施方案中,样本是或来源于全血或其级分(例如,血清或血浆)。在一些实施方案中,样本是或来源于血浆。在一些实施方案中,样本是或来源于血清。在一些实施方案中,当样本是(或来源

于)血液、血清或血浆时,血液、血清或血浆来源于移植受体的静脉或动脉血。在一些实施方案中,血液、血清或血浆来源于移植受体的静脉血。

[0136] 在一些实施方案中,来自根据本公开的移植受体的样本包含无细胞核酸。在一些实施方案中,样本中存在的无细胞核酸可以完全是受体来源的无细胞核酸,或者样本中存在的无细胞核酸可以包括受体来源的无细胞核酸和供体来源的无细胞核酸的混合物。

[0137] 在一些实施方案中,本文提供的方法包括提供来自受体的样本。在一些实施方案中,本文提供的方法还包括从受体获得样本,例如以防止样本和/或分析物降解和/或污染的方式并进入专门制备的容器中。一旦获得样本,其可直接使用、冷冻或以其他方式储存在维持样本完整性(例如,样本中核酸的完整性,诸如样本中无细胞核酸的完整性)并防止样本降解和/或污染的条件下。在特定时间采集的样本的量可以变化,并且可以取决于附加因素,诸如重复样本分析的任何需要。在一些实施方案中,获得至多50mL、40mL、30mL、20mL、10mL、9mL、8mL、7mL、6mL、5mL、4mL、3mL、2mL、1mL、0.5mL、0.1mL的样本。在一些实施方案中,获得0.1mL-1mL、1mL-50mL、2mL-40mL、3mL-30mL或4mL-20mL的样本。在一些实施方案中,可获得超过1mL、5mL、10mL、15mL、20mL、25mL、30mL、35mL、40mL、45mL、50mL、55mL、60mL、65mL、70mL、75mL、80mL、85mL、90mL、95mL或100mL的样本。

[0138] 样本可以从移植物的受体获得一次或多于一次。在从移植物的受体获得多个样本的情况下,取样的频率可以变化。例如,在初始取样事件后,样本可以约每天一次、约每隔一天一次、约每三天一次、约每周一次、约每两周一次、约每三周一次、约每月一次、约每两个月一次、约每三个月一次、约每四个月一次、约每五个月一次、约每六个月一次、约每年一次或约每两年一次或更长时间获得。在一些实施方案中,可以从受体获得一个、两个、三个、四个、五个、十个、二十个、三十个、四十个、五十个、六十个、七十个、八十个、九十个、一百个、二百个、三百个、四百个或五百个或更多个样本。在一些实施方案中,可以从受体获得介于一个和五个之间、介于五个和十个之间、介于十个和二十个之间、介于二十个和三十个之间、介于三十个和四十个之间、介于四十个和五十个之间、介于五十个和六十个之间、介于六十个和七十个之间、介于七十个和八十个之间、介于八十个和九十个之间、介于九十个和一百个之间、介于一百个和二百个之间、介于二百个和三百个之间、介于三百个和四百之间、或介于四百个和五百个之间、或更多个样本。

[0139] 在一些实施方案中,可以在一段时间间隔内从移植物的受体获得一个或多个样本,用于根据本公开的方法确定,即检测、预测、诊断和/或监测受体中器官、细胞或组织移植物的状态。在移植事件后从移植物的受体取样的时间间隔可以变化。例如,在美国申请号14/658,061中描述了示例性取样间隔,该申请据此全文以引用方式并入。例如,可以在不同的时间和不同的时间段从移植受体取得样本以用于根据本公开的方法确定,即检测、预测、诊断和/或监测受体中器官、细胞或组织移植物的状态。在一些实施方案中,可在受体接受器官、细胞或组织移植物之前从移植受体取得一个或多个样本。在一些实施方案中,可在移植事件之后或在已经从受体取得初始样本之后(即,在初始取样事件之后)约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约1周、约2周、约3周、约4周、约1个月、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月、约12个月、约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24

年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年或更久中的任一者或任一者的任何组合，从移植受体取得一个或多个样本。在一些实施方案中，可在移植事件后约三个月、之后约六个月后、之后约九个月后或之后少于一年内从移植受体取得样本。在一些实施方案中，可以在移植事件的一周年之前的不同时间、在移植事件的一周年时、或在移植事件的一周年之后的不同时间从移植受体取得样本。例如，在移植后一周年时，可从第12个月(即，移植事件的一周年)开始并在此之后连续一段时间从移植受体取得样本。在一些实施方案中，从移植受体获得样本的时间段在从供体到受体的移植发生后的前几天内。这可以用来监测诱导疗法。在一些实施方案中，用于从移植受体获得样本的时间段包括在向受体施用的免疫抑制方案的逐渐减少期间，通常发生在从供体到受体的移植发生后的前12个月期间的时段。在一些实施方案中，从移植受体获得样本的时间段包括在初始长期免疫抑制维持阶段期间，其可以在从供体到受体的移植已经发生后约12-14个月或更早或更晚开始。在一些实施方案中，从移植受体获得样本的时间段包括在免疫抑制方案的整个长期维持期间，其可以是在从供体到受体的移植已经发生后超过12个月或更早或更晚的任何时间。

[0140] 在一些实施方案中，在移植后的前三周内每周两次从移植物的受体获得一个或多个样本。在一些实施方案中，在移植后的前1或2周每天获得一个或多个样本。在一些实施方案中，在移植后的前三个月内每周一次获得一个或多个样本。在一些实施方案中，在移植后第一年内每月一次获得一个或多个样本。在一些实施方案中，在移植后第一年之后每年四次获得一个或多个样本。

[0141] 在一些实施方案中，从移植事件的一周年(即，移植事件后12个月)开始，连续一至三个月从移植物的受体获得样本，提供在三个月时间间隔内取得的总共四至六个样本用于分析，约每两周收集样本。在一些实施方案中，从移植事件的一周年(即，移植事件后12个月)开始，连续一至三个月，移植受体每周取得样本一次，提供在三个月的时间间隔内取得总共十二个样本以用于分析。从移植物的受体获得样本的总持续时间以及获得此类样本的频率可以变化并且将取决于多种因素，诸如临床进展。例如，移植物的受体可以在其寿命持续时间内获得样本。对于移植物的给定受体，本领域技术人员将能够确定适当的取样时间和频率。

[0142] 在一些实施方案中，本文提供的方法包括提供来自受体的一个或多个样本，例如用于根据本公开的方法使用。

[0143] IV.供体和受体

[0144] 本公开的方法包括在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态；移植受体中治疗来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥；和/或在来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植受体中调整免疫抑制疗法。

[0145] 在一些实施方案中，根据本公开的器官、组织或细胞移植物是跨物种移植物(即，异种或异源移植物)，其中器官、组织或细胞移植供体是与移植受体不同的物种。因此，在一些实施方案中，本公开的方法包括检测、预测、诊断和/或监测跨物种、异种或异源器官、组织或细胞移植物的状态，治疗跨物种、异种或异源器官、组织或细胞移植物的移植排斥，和/或调整跨物种、异种或异源器官、组织或细胞移植物的移植受体中的免疫抑制疗法，其中器官、组织或细胞移植供体是与移植受体不同的物种。

[0146] 在一些实施方案中，移植受体和移植供体是动物。在一些实施方案中，移植受体

和/或移植供体是脊椎动物。在一些实施方案中,移植受体和/或移植供体是哺乳动物。在一些实施方案中,移植受体和/或移植供体是非人类哺乳动物。在一些实施方案中,移植受体是人,而移植供体是非人类动物,诸如非人类脊椎动物或非人类哺乳动物。在一些实施方案中,移植受体是非人类动物,诸如非人类脊椎动物或非人类哺乳动物,而移植供体是人源化非人类器官。在一些实施方案中,非人类动物是非人类灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫、啮齿动物、鸟、爬行动物或其他非人类动物。在一些实施方案中,非人类哺乳动物是非人类灵长类动物、牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫、啮齿动物或其他非人类哺乳动物。在一些实施方案中,啮齿动物是小鼠、大鼠、松鼠、草原犬鼠、豪猪、海狸、豚鼠、仓鼠或另一种啮齿动物。在一些实施方案中,非人类灵长类动物是猴或猿。在一些实施方案中,非人类灵长类动物是黑猩猩、倭黑猩猩、大猩猩、猩猩、恒河猴、食蟹猴、猪尾猴、非洲绿猴、狨猴、卷尾猴、蜘蛛猴、黑长尾猴、狒狒、松鼠猴、猫头鹰猴或另一种非人类灵长类动物。在一些实施方案中,移植受体是人,并且移植供体是猪。在一些实施方案中,猪是野猪(Sus scrofa)、家猪(Sus scrofa domesticus)、疣猪(SPhacochoerusaethiopicus)、红河猪(Potamochoerusporcusporcus)、非洲野猪(Potamochoerusporcus)、东南亚疣猪(Babirousababyrussa)物种。在一些实施方案中,猪是汉福德猪、小型或微型猪、尤卡坦猪、尤卡坦微型猪、辛克莱猪、哥廷根猪、杜洛克猪、约克夏猪、长白猪或它们的组合、杂交体或跨物种。

[0147] 在一些实施方案中,供体和/或受体是经遗传修饰的,或包含一种或多种经遗传修饰的细胞、器官或组织。在一些实施方案中,器官、组织或细胞移植物是经遗传修饰的。此类遗传修饰可包括例如基因失活或完全基因敲除;和/或移植供体的原始基因组不具有的受体或供体、或非受体或非供体基因的遗传整合或表达。

[0148] 在一些实施方案中,移植物来源于成体(例如,成体人类或非人类动物)。在一些实施方案中,移植物来源于胎儿、胚胎、胚胎干细胞、诱导的多能干细胞、儿童或青少年、少年或青年。在一些实施方案中,移植物来源于男性或女性。

[0149] V.器官、细胞和组织移植物

[0150] 本公开的方法包括在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态。

[0151] 在一些实施方案中,根据本公开的移植物是一个或多个器官的移植物。在一些实施方案中,器官是实体器官或中空器官。在一些实施方案中,移植物是完整的器官或器官的部分。在一些实施方案中,器官可以是肾、胰腺、肝脏、心脏、肺、肠、囊、肾上腺、阑尾、脑、耳、食道、眼睛、胆囊、膀胱、小肠或大肠、口、肌肉、鼻、甲状旁腺、松果腺、脑垂体、脾、胃、胸腺、甲状腺、气管、子宫或阑尾中的任一者。在一些情况下,器官是腺体器官。例如,器官可以是消化系统或内分泌系统的器官。在一些情况下,该器官可以是内分泌腺和消化器官两者。在一些情况下,器官可来源于内胚层、外胚层、原始内胚层或中胚层。在一些实施方案中,移植物是血管化的复合移植体。在一些实施方案中,器官移植物是完整器官、完整器官的片段、破裂的器官或来自器官的细胞。

[0152] 在一些实施方案中,移植物是肾脏移植物。肾脏移植物也可称为肾移植物。在一些实施方案中,肾脏移植物来源于死亡供体或活供体。在一些实施方案中,将肾脏与胰腺一起移植。在一些实施方案中,肾脏移植物来源于猪供体。

[0153] 在一些实施方案中,移植物是心脏移植物。心脏移植物也可称为心移植物。在一些实施方案中,心脏移植物来源于猪供体。

[0154] 在一些实施方案中,根据本公开的移植物是一个或多个细胞的移植物。在一些实施方案中,一个或多个细胞直接取自供体以施用到受体中;一个或多个细胞取自供体并且在施用于受体之前进行遗传工程化;一个或多个细胞取自供体并且在施用于受体之前进行培养;一个或多个细胞取自供体并且在施用于受体之前经受制造过程;或它们的组合。一个或多个细胞也可在施用于受体之前储存(例如,"现成的"细胞)。在一些实施方案中,一个或多个细胞是血细胞、干细胞、心肌细胞、神经元、淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、NK T细胞、T调节(T-reg)细胞、神经元、巨噬细胞、树突细胞、胰岛细胞或它们的任何组合。在一些实施方案中,血细胞可以包括造血干细胞(即,HSC)、T细胞、B细胞、嵌合抗原受体(CAR)T细胞、NK细胞、NK T细胞、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)以及它们的任何组合。在一些实施方案中,一个或多个细胞是CAR T细胞、通用CAR T细胞(即,其中CAR结合至结合特异性抗原的抗体)、分裂CAR T细胞(即,其中二聚化剂激活CAR T细胞功能)、可激活CAR T细胞、阻抑性CAR T细胞、多相CAR T细胞(即,其中CAR必须结合多种特异性抗原和/或试剂以诱导T细胞激活)、肿瘤浸润性淋巴细胞、调节性T细胞、遗传修饰的T细胞、具有遗传修饰的或合成的T细胞受体(TCR)的T细胞、抗原特异性T细胞(例如,EBV、HPV、BKV、CMV等)、抗原特异性T细胞、新抗原特异性T细胞或从供体分离的任何细胞。在一些实施方案中,一个或多个细胞作为骨髓、脐带血或纯化细胞施用。在一些实施方案中,一个或多个细胞是骨髓细胞。在一些实施方案中,一个或多个细胞是脐带血细胞。在一些实施方案中,移植物包含干细胞。在一些实施方案中,干细胞作为骨髓、脐带血或纯化的干细胞施用。在一些实施方案中,干细胞来源于供体。在一些实施方案中,干细胞作为造血细胞移植施用。在一些实施方案中,血细胞包括白血细胞(例如,单核细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱细胞、巨噬细胞等)、红血细胞(红细胞)和血小板中的一者或多者。在一些实施方案中,血细胞作为输血(例如,全血输血)、血液的单个组分的输血、或纯化细胞如白细胞(例如,单核细胞、淋巴细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞或巨噬细胞)、红细胞(红细胞)或血小板的输血来施用。在一些实施方案中,一个或多个细胞来源于器官(例如,本文所述的器官或本领域已知的任何其他器官)。在一些实施方案中,一个或多个细胞是胰腺细胞、肝细胞、心肌细胞、肾细胞、神经系统细胞等。

[0155] 在本公开的任何方法的一些实施方案中,移植物包含干细胞。在一些实施方案中,干细胞是胚胎干细胞、组织特异性干细胞、诱导多能性干细胞、造血干细胞、间充质干细胞、骨骼干细胞、肌原性干细胞、心肌干细胞、神经干细胞、表皮干细胞或肠干细胞。在一些实施方案中,干细胞是造血干细胞、胚胎干细胞、成体干细胞、多能干细胞、多能干细胞、神经元干细胞、心脏干细胞、来源于脐带血的细胞或诱导的多能干细胞。

[0156] 在一些实施方案中,一个或多个细胞是胆囊细胞、心肌细胞、肾小球细胞(例如,壁细胞、足细胞)、肾近端小管刷状缘细胞、亨利氏环薄节片细胞、厚升支细胞、肾远端小管细胞、肾集合管细胞、间质肾细胞、肠上皮细胞、杯状细胞、肠上皮细胞、穴状簇细胞、肠内分泌细胞、神经节神经元、实质细胞、非实质细胞、肝细胞、窦内皮细胞、库普弗细胞、肝星状细胞、肌细胞、胰腺β细胞、内皮细胞或外分泌细胞,或它们的任何组合。

[0157] 在一些实施方案中,一个或多个细胞被遗传工程化,和/或经受制造过程,和/或在

施用于受体之前进行培养。在一些实施方案中,一个或多个细胞的移植物包含多种类型的细胞。在一些实施方案中,移植物包含一种或多种在遗传上可彼此区分的细胞。在一些实施方案中,一个或多个细胞的移植包括两次或更多次独立施用。例如,一种细胞类型可以在第一次施用中施用,而第二种细胞类型可以在第二次施用中施用。

[0158] 在一些实施方案中,根据本公开的移植物是组织的移植物。示例性组织包括但不限于结缔组织、上皮组织、肌肉组织、神经组织、淋巴组织、血液或血液成分、脂肪组织、软骨、致密纤维组织、骨骼肌、心肌或平滑肌。肌肉组织可包括肌纤维或肌细胞。在一些实施方案中,组织是角膜、腱、心脏瓣膜、静脉或动脉、皮肤、骨、出生组织或它们的部分、片段和/或组合。在一些实施方案中,出生组织是胎盘组织、羊膜组织、绒毛膜组织、羊水组织、脐带组织、脐带静脉或脐带胶质。在一些情况下,组织是骨或腱(均称为肌肉骨骼移植体)。

[0159] VI.附加分析

[0160] 除了对来自移植受体和/或移植供体的样本的其他分析之外,或与对来自移植受体和/或移植供体的样本的其他分析结合,可以执行本公开的方法。

[0161] 在一些实施方案中,测试了移植受体中传染剂的存在或水平。可被测试的传染剂包括例如病毒;细菌诸如铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、肠杆菌(Enterobacteriaceae)、诺卡氏菌(Nocardia)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumonia)、金黄色葡萄球菌(Staphyloccous aureus)和军团杆菌(Legionella);真菌诸如念珠菌(Candida)、曲霉属真菌(Aspergillus)、隐球菌(Cryptococcus)、卡氏肺孢菌(Pneumocystis carinii);或寄生生物诸如,例如弓形虫(Toxoplasma gondii)。在一些实施方案中,测试了移植受体中病毒传染剂的存在或水平。可在从来自移植受体的样本获得的核酸中分析病毒生物标志物以确定移植受体中病毒的存在或水平。可测试的病毒包括例如巨细胞病毒、EB病毒、Epstein-Barr病毒、指环病毒科和BK病毒。病毒的存在或水平的测试结果可用于分类移植受体的免疫状态和/或确定移植受体的感染状态。在一些实施方案中,在被分类为具有临床显著感染的高风险的移植受体中,免疫抑制疗法可以减少或至少不增加。在一些实施方案中,在被分类为具有临床显著感染的低风险的移植受体中,免疫抑制疗法可以增加或至少不减少。应注意,由于其他临床因素可通知调整免疫抑制疗法的决定,因此移植受体可使目前向其施用的免疫抑制疗法增加、减少或维持,而不管病毒的存在或水平的测试结果和/或临床上显著感染的风险的分类。

[0162] 在一些实施方案中,本公开的方法包括在来自移植受体的样本中进行基因表达分析。在一些实施方案中,对来自受体的外周血单核细胞(PBMC)进行基因表达分析。在一些实施方案中,对来自受体的全血样本或其部分进行基因表达分析。在一些实施方案中,对提供与移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态相关的信息的选定基因进行基因表达分析。在一些实施方案中,使用本领域已知的任何合适的方法进行基因表达分析,诸如RNA测序、微阵列方法、Nanostring分析系统和定量实时PCR。在一些实施方案中,使用AlloMap测试进行表达分析。AlloMap测试涉及使用已从PBMC分离的RNA进行定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)测定。分析选定数量的基因的表达,并且该基因表达数据用于提供与移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态相关的信息。AlloMap测试是本领域已知的。基因表达分析的结果(例如,使用AlloMap测试或任何其他合适的方法获得)可与本公开的方法结合使用,使用或不使用限定来自组合测试的单个评分的方法,以确定移植受体中的细胞、器官或

组织移植物的状态和/或通知需要施用免疫抑制疗法或调整施用于移植受体的免疫抑制疗法。

[0163] 在一些实施方案中,本公开的方法涉及确定可用于传达移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态的单一评分。

[0164] 在一些实施方案中,本公开的方法涉及确定可用于传达移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态的组合评分。组合评分通常基于用于探测移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态的多个(例如,两个或更多个)测定的结果来计算。例如,组合评分可基于移植受体中供体来源的无细胞核酸(例如,DNA)的确定水平以及例如如上所述的基因表达谱分析测定(诸如AlloMap测试)的结果来计算。组合评分可基于取自移植受体的单个样本来计算,或者它们可基于在一定时间间隔内取自移植受体的样本。组合评分可用于确定移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态和/或通知需要施用免疫抑制疗法或调整施用于移植受体的免疫抑制疗法。

[0165] 附加生物标志物分析、基因表达测定和用于确定(即检测、预测、诊断和/或监测)移植受体中的细胞、器官或组织移植物的状态和/或确定对施用或调整免疫抑制疗法的需要的其他测定也可以在本公开的方法之外使用或与本公开的方法结合使用,使用或不使用从组合测试限定单个评分的方法,这对于本领域技术人员将是容易显而易见的。

[0166] 可进行附加分析以鉴定移植受体中新的、转移的或复发的癌症的标志物。引物可被设计成扩增已知发生遗传突变的区域,从而通过鉴定已知的肿瘤相关突变来提供癌症的早期检测。这可能至少部分地是有利的,因为由于免疫抑制,移植受体可能处于发展某些恶性肿瘤的升高风险中。

[0167] VII.本公开的试剂盒

[0168] 本文还提供了用于在本文所述的方法中的任一种方法中使用的试剂盒。

[0169] 在一个方面,本文提供了用于在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态的试剂盒,其中供体和受体属于不同物种。在一些实施方案中,试剂盒包含用于根据本公开的方法使用的试剂。例如,在一些实施方案中,试剂盒包含用于分析从移植受体分离的无细胞核酸的试剂,如本文所述。在一些实施方案中,试剂盒可包含用于进行qPCR、dPCR或测序方法(例如NGS或HTS)的试剂,例如如上所述。此类试剂可包括引物(例如,用于qPCR或dPCR方法中)、探针或染料(例如,用于qPCR或dPCR方法中)、用于测序文库制备的试剂、用于扩增核酸的试剂(例如,聚合酶、缓冲液等)、用于从样本中进行核酸提取(如果提取是必要的话)的试剂等。在一些实施方案中,试剂盒包含一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集,其与例如来自移植受体的无细胞核酸中的供体特异性或受体特异性靶序列杂交。在一些实施方案中,试剂盒的一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集用于供体来源的无细胞核酸的qPCR或数字PCR定量,作为样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝或参考所分析的总无细胞核酸。在一些实施方案中,试剂盒的一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集用于供体来源的无细胞核酸的qPCR或数字PCR定量,作为样本中供体来源的无细胞核酸的绝对拷贝,或作为样本中供体来源的无细胞核酸与总供体来源的和受体来源的无细胞核酸的比率。在一些实施方案中,试剂盒的一种或多种PCR反应寡核苷酸引物和探针集用于供体来源的无细胞核酸的数字PCR定量,参考所分析的样本量或参考所分析的总无细胞核酸。在一些实施方案中,试剂盒可包含足以分析单

个样本的试剂。在一些实施方案中,试剂盒可包含足以分析若干样本的试剂。

[0170] 在一些实施方案中,试剂盒可包括指定目标值的说明书以及可与试剂盒中提供的试剂和说明书结合使用的对照材料。在一些实施方案中,试剂盒还包含用于根据本公开的方法使用的对照。例如,在一些实施方案中,试剂盒还包含含有已知量的核酸(例如,无细胞核酸)的对照样本。

[0171] 在一些实施方案中,试剂盒还包括用于根据本公开的方法使用的说明书。可以包括用于执行本文所述的方法中的任一种方法的说明书。例如,在一些实施方案中,试剂盒包括用于使用试剂盒和数据分析来确定供体来源的无细胞核酸的量的说明书。

[0172] 在一些实施方案中,试剂盒还包括关于输入材料质量或输入制备方法的说明书和规格。

[0173] 在一些实施方案中,试剂盒包括用于分析序列数据(例如,序列读段)或PCR数据(例如,来自qPCR或dPCR的数据)的软件说明书,例如以确定从来自移植受体的样本获得的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量。在一些实施方案中,试剂盒包括用于访问软件的说明书(该软件可用于对从来自移植受体的样本获得的无细胞核酸中的供体来源的无细胞核酸进行统计分析),例如用于下载和/或安装软件的说明书。

[0174] VIII.软件、系统和设备

[0175] 本文所述的用于在移植受体中检测、预测、诊断和/或监测来自供体的器官、组织或细胞移植物的移植排斥状态的方法的某些方面(其中供体和受体属于不同物种)可通过计算机系统或设备进行。例如,在一些实施方案中,分析序列数据(例如,序列读段)或PCR数据(例如,来自qPCR或dPCR的数据)以确定从来自移植受体的样本获得的无细胞核酸中供体来源的无细胞核酸的量的步骤可使用计算机系统或设备进行。本文还提供了用于执行本文所述方法的软件。

[0176] 本公开的上述实施方案可以以多种方式实现。例如,实施方案的一些方面可以使用硬件、软件或它们的组合来实现。当在软件中实现时,软件代码可以在任何合适的处理器或处理器集合上执行,不管是在单个计算机中提供还是分布在多个计算机中。应当理解,执行上述功能的任何部件或部件的集合可通常被认为是控制上文讨论的功能的一个或多个控制器。一个或多个控制器可以以多种方式实现,诸如利用专用硬件,或者利用使用微代码或软件编程以执行上述功能的通用硬件(例如,一个或多个处理器)。

[0177] 在这方面,应当注意,本公开的各种特征的具体实施可使用编码有计算机程序(即,多个指令)的至少一种非暂态算机可读存储介质(例如,计算机存储器、软盘、压缩光盘、磁带等),该计算机程序在处理器上执行时执行上文所讨论的功能和方法。计算机可读存储介质可以是可传输的,使得存储在其上的程序可以被加载到任何计算机资源上以实现本文所讨论的本公开的某些方面。另外,应当注意,对当被执行时执行上文讨论的功能的计算机程序的引用不限于在主计算机上运行的应用程序。相反,本文在一般意义上使用术语计算机程序来指代可用于对处理器进行编程以实现本公开的某些方面的任何类型的计算机代码(例如,软件或微代码)。

[0178] 实施例

[0179] 通过参考以下实施例将更全面地理解本发明。然而,它们不应被计及为限制本发明的范围。应当理解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明目的,并且根据其的各种修

改或变化将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。

[0180] 实施例1:用于在跨物种移植中非侵入性监测器官移植物健康的方法

[0181] 该实施例描述了用于使用来自移植受体的无细胞DNA(cfDNA)非侵入性监测跨物种器官移植物的基于数字聚合酶链反应(dPCR)和测序的方法。

[0182] 在下面描述的用于跨物种移植监测的方法中,遗传修饰的猪作为示例性器官供体,并且人作为示例性器官受体。猪已经被遗传修饰(Revivicor,United Therapeutics子公司)以不表达四种猪基因并且另外表达六种人基因。这些修饰被认为并发现代表关于供体基因组大小的可忽略的改变。因此,本文的所有计算均基于猪基因组,如对于野猪公开可用的。

[0183] 一般来讲,移植物捐献动物的基因组的修饰可以包括基因失活或完全基因敲除,并且/或者移植物捐献动物的原始基因组不具有的另外的人类或非人类基因的遗传整合和表达。大多数(如果不是全部)遗传修饰用于减轻由移植受体的免疫系统触发的潜在攻击性免疫反应的目的。

[0184] 用于跨物种器官移植物的非侵入性监测的基于dPCR的方法

[0185] 一般方法

[0186] 单拷贝靶检测和多拷贝靶检测测定被设计用于单重和多重dPCR测定,如表1中概述的。准确性基于输入DNA计算为测量的拷贝相对于预期的拷贝的百分比,如通过量子位测量的。

[0187] 表1.用于单重和多重dPCR测定的靶检测设计概述。

[0188]

dPCR 类型	受体靶类型, 编号 (n)	供体靶类型, 编号 (n)	方法#
单重	单拷贝, n=1	单拷贝, n=1	1A
	单拷贝, n=1	多拷贝, n=1	1B
	多拷贝, n=1	单拷贝, n=1	
	多拷贝, n=1	多拷贝, n=1	
多重	单拷贝, n=1 或 n>1	单拷贝, n=1 或 n>1	2A
	单拷贝, n=1 或 n>1	多拷贝, n=1 或 n>1	2B
	多拷贝, n=1 或 n>1	单拷贝, n=1 或 n>1	
	多拷贝, n=1 或 n>1	多拷贝, n=1 或 n>1	

[0189] 引物和探针设计

[0190] 设计PCR引物和探针以定量检测人特异性基因组DNA序列和猪特异性基因组DNA序列。示例性PCR引物和荧光团标记的探针显示在下面表2中。有利地选择基因内含子区中的基因组DNA序列作为用于PCR引物设计的靶向区的至少一部分,因为它们更可能显示猪基因组与人基因组之间的多样性。使用例如Primer3程序(参见primer3.org)选择引物和探针设计,目标测定参数为:扩增子大小为60-110个碱基对,引物解链温度(T_m)为60℃,并且探针T_m为65℃-70℃。

[0191] 表2.用于检测和定量人特异性基因组DNA序列和猪特异性基因组DNA序列的示例性PCR引物和荧光团标记的探针。在本发明的一个实施方案中,如本文所示的双拷贝猪靶测定检测每单倍体基因组的PCR靶的两个拷贝。在本发明的另一个实施方案中,如本文所示的

8拷贝猪靶测定检测每单倍体基因组的相同PCR靶的8个拷贝。

[0192]

测定	正向引物	反向引物	探针
人测定A（1拷贝靶）	AACTACATGGTGAGTGCTACATG（SEQ ID NO: 1）	CTGCCCATCAGCCAGGTG（SEQ ID NO: 2）	FAM-TGAGCCCCAAAGCTGGTGTGG-BHQ（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 5）
猪测定A（2拷贝靶）	ACTGTTGGAAGTG CATGTGC（SEQ ID NO: 3）	TTCTGAGAGACCTCTGCTTGG（SEQ ID NO: 4）	FAM-CTGCTGCTCCTTGCTCTCACTGCAGG-BHQ（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 6）
人测定B（1拷贝）	CCCCACCGGAGGAGTTTTG（SEQ ID NO: 7）	GCGAAAGCCGAAGTCTAGGG（SEQ ID NO: 8）	56-FAM-CGGTCTGTA/ZEN/GAGAGCTATGCAGGGTGAGGGC-3IABkFQ（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 9）
猪测定B（1拷贝）	CCAGCTTCATTTTGCCCTCG（SEQ ID NO: 10）	CCCCTTTTCAGGGAATGCTC（SEQ ID NO: 11）	5Cy5-CCAGCACCC/TAO/CGATGC GGACGAGTCG-3IAbRQSp（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 12）
猪测定C（1拷贝）	TAGGTCATTGCTTTCCGGCT（SEQ ID NO: 13）	TTCACAGGGACGGAAAACCG（SEQ ID NO: 14）	5Cy5-CTGGCTGGC/TAO/GCGCGGCGAGAACTT-3IAbRQSp（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 15）
人测定C（1拷贝）	GGAGAAAAGCCTACCGCACA（SEQ ID NO: 16）	TGACGTCACCCGTTCTGTTG（SEQ ID NO: 17）	5SUN-ACCGGCAGG/ZEN/TGGCCCCACCCTGCAT-3IABkFQ（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 18）
猪测定D（8拷贝靶）	TGTTGCGGCAAGATGCGT（SEQ ID NO: 19）	TTCATTCCCACTGACC AGATG（SEQ ID NO:20）	56-FAM-TCCCAGAGCTTGCCCAGAGC-3IABkFQ（下划线的序列对应于SEQ ID NO: 21）
报告染料：FAM、Cy5、SUN、FAMN。 淬灭剂：ZEN、TAO、IABkFQ、3IAbRQSp。BHQ			

[0193] 为了确保不存在跨物种反应，使用计算机模拟PCR程序，针对一个基因组（例如，猪）检查PCR引物的独特扩增子产物，并针对另一个基因组（例如，人）检查扩增子产物的不存在。通过计算将靶基因组（例如，猪基因组）分成碱基对（bp）区段，诸如例如80bp的区段，并将区段映射回靶基因组以鉴定多重映射区段。将多重映射区段与非靶基因组比对，并丢弃任何比对。在一些情况下，过滤剩余的多重映射区段以移除片段，例如具有高或低GC含量的片段或与重复掩蔽区域对齐的片段，或移除例如不期望的区域诸如非外显子区域。“LOC”基因（即功能不确定的基因，没有官方符号和/或没有直系同源物）被丢弃，并且重叠区段被合并。将剩余区段提交给Primer3设计软件，并且通过计算机模拟PCR验证每个区段的第0个引物集输出，以确认在靶基因组中的多个命中和在非靶基因组中的命中的不存在。在由Primer3产生的设计中，仅选择区段之间具有1千碱基的最小间隔的那些用于实验评估。

[0194] 探针用相同的荧光染料标记用于单重dPCR测定,或用不同的荧光染料标记用于多重dPCR测定(如下所述)。

[0195] 对于多拷贝靶检测测定,鉴定了猪特异性多基因家族,并且设计PCR引物/探针以检测猪基因组中靶序列的多个拷贝,但不检测人基因组中的任何物质。对于猪特异性PCR测定引物和探针设计,搜索多基因家族(例如,rRNA、Hox、组蛋白和微管蛋白基因家族)的基因组序列以寻找在猪和人基因组之间具有高度多样性的区域。与单拷贝靶检测测定相比,多拷贝靶检测测定具有增加数量的猪基因组阳性分区,这在猪cfDNA以非常低的拷贝存在于样本中时是重要的。例如,猪双拷贝靶检测测定检测每单倍体基因组的两个猪靶拷贝,并且因此,与单拷贝靶检测测定相比,生成多达两倍的猪特异性分区计数。

[0196] 方法1A:检测单拷贝人特异性靶和单拷贝猪特异性靶的单重dPCR测定。

[0197] 用检测单拷贝人特异性靶的人特异性dPCR测定和检测单拷贝猪特异性靶的猪特异性dPCR测定分别测定每个样本中不同量(例如,至多120ng)的cfDNA输入。根据制造商推荐的标准方案,在Stilla Naica系统上使用1x多重PCR MasterMix、0.5μM正向和反向引物、和0.3μM FAM标记探针在25μl反应中在Crystal Droplet dPCR蓝宝石芯片上进行测定。dPCR结果用Crystal Droplet dPCR读取器获得,并用Crystal Droplet dPCR Miner软件分析。将猪和人基因组拷贝浓度标准化为输入cfDNA量(ng),并且相对于样本中猪和人基因组的总拷贝计算猪基因组拷贝百分比。

[0198] 方法1B:检测单拷贝人特异性靶和多拷贝猪特异性靶的单重dPCR测定。

[0199] 如上文对于方法1A所述,进行检测单拷贝人特异性靶和多拷贝猪特异性靶的单独单重dPCR测定。为了确定猪基因组拷贝浓度,将测量的猪拷贝数除以每单倍体基因组的猪特异性靶的拷贝数(例如,如果在猪测定中使用双拷贝靶,则将测量的猪拷贝数除以2)。将每μl的猪和人基因组拷贝一起添加,并且相对于样本中猪和人基因组的总拷贝计算猪基因组拷贝百分比。多拷贝猪特异性靶检测测定提高了定量精度和灵敏度。

[0200] 方法2A:使用独特的荧光染料来区分所有不同的靶或区分两个物种,检测一个或多个单拷贝人特异性靶和一个或多个单拷贝和/或多拷贝猪特异性靶的多重dPCR测定。

[0201] 对于不同组分测定探针,用不同荧光染料标签(例如,FAM、HEX、ATTO 550、ROX、Cy5、Cy5.5、SUN)将单独的人靶特异性和猪靶特异性测定(例如,如以上对于方法1A和1B所述)选择性地组合成单个多重测定。将来自每个组分的基因组拷贝浓度针对多拷贝靶测定(如果有的话)的基因组拷贝浓度进行校正,针对人和猪基因组拷贝浓度进行平均,并且相对于样本中猪和人基因组的总拷贝计算猪基因组拷贝百分比。因此,在方法2A中,使用更多的靶来增加供体的阳性分区的数量并改善测定精度和灵敏度。

[0202] 方法2B:使用针对同一物种内的靶的非独特荧光染料检测1个或多个单拷贝人特异性靶和至少1个多拷贝猪特异性靶的多重dPCR测定。

[0203] 如上文对于方法2A所述设计多重dPCR测定,不同之处在于在单个dPCR测定反应中使用至少1个多拷贝靶测定,其用不同荧光染料标记或用相同荧光染料标记。因此,在方法2B中,使用多个荧光通道或单个荧光通道来检测多个猪特异性靶PCR测定,以增加用于确定猪供体来源的cfDNA的阳性分区的数量,并且改善测定精度和灵敏度,假定不同的基因组靶彼此分开并且可以在dPCR测定中在不同微滴中独立地扩增。

[0204] 数据分析

[0205] 对于方法1A-1B和2A-2B,如上所述,将来自dPCR反应的输出(即,每μL反应的猪特异性靶序列拷贝和每μL反应的人特异性靶序列拷贝)在除以每次测定的每单倍体基因组的靶序列拷贝数后,计算出每μL浓度的基因组拷贝。对于相对浓度,相对于总基因组(例如,人和猪基因组拷贝的总数)计算猪基因组拷贝的分数或百分比。

[0206] 猪基因组的数量也可以被确定并报告为每单位样本输入的绝对值,例如作为每ng cfDNA或每毫升(mL)血浆的猪基因组拷贝数。

[0207] 对于绝对浓度,来自dPCR仪器的每μl的猪靶序列拷贝首先通过基因组中每个靶的靶序列拷贝数进行调整(除以该靶序列拷贝数)。然后,除了从提取中洗脱的DNA的体积和在DNA提取中使用的血浆的体积之外,使用在dPCR反应中使用的体积,计算每ml血浆的猪基因组当量cfDNA拷贝。确定绝对浓度的另选方法包括但不限于从dPCR仪器获得每μl的猪(靶)拷贝(cp/μl),通过将猪cp/μl除以每单倍体基因组的靶拷贝数和测定数(如果在荧光通道中组合多于1个测定)来计算猪基因组cp/μl,确定进入dPCR反应的猪基因组拷贝,测定猪基因组cp/ml血浆。确定猪来源的序列的绝对数的一种方法的具体步骤如下:

[0208] 1.从dPCR仪器取每μl的猪靶拷贝,并除以每单倍体基因组的猪靶拷贝数(如果在荧光通道中组合多于1个猪靶测定,也除以荧光通道中的猪靶测定数),得到反应中的每μl的猪靶拷贝;

[0209] 2.通过将反应中的每μl的猪靶拷贝乘以反应体积来计算反应中的总猪基因组拷贝;

[0210] 3.将反应中的总猪基因组拷贝除以反应中使用的DNA样本的体积,得到每体积DNA样本的总猪基因组拷贝;

[0211] 4.将每DNA体积的样本的总猪基因组拷贝乘以从DNA提取获得的DNA样本的总体积,得到从DNA提取获得的总猪基因组拷贝;以及

[0212] 5.通过将从DNA提取获得的总猪基因组拷贝除以在DNA提取中使用的血浆体积来计算来自受体的每体积血浆的总猪基因组拷贝。

[0213] 用于跨物种器官移植物的非侵入性监测的基于测序的方法

[0214] 文库制备和测序

[0215] 使用Illumina的DNA Prep Kit®,根据制造商的说明书,使用25ng-100ng之间的cfDNA来制备鸟枪文库。

[0216] 通过Tapestation® cfDNA试剂盒确定平均文库片段大小,并通过量子位对文库进行定量。文库在MiSeq(2×65或2×55个循环,12pM)上或在NextSeq(2×65或2×35个循环,1.3pM-1.8pM)上测序,具有配对的末端读段。纯的人基因组DNA和纯的猪基因组DNA也与人工样本一起测序,猪基因组当量(GE)在0.2%和0.4%之间。

[0217] 生物信息学

[0218] 下一代测序(NGS)鸟枪管道用于分析测序数据和定量样本中猪供体来源的无细胞DNA的量,该样本从由工程化猪捐赠的心脏移植物的人受体以及从猪心脏移植物的人死亡模型受体获得。

[0219] 人基因组与移植物捐献动物的基因组(例如经遗传修饰的猪的基因组)之间的基因组大小的差异通过用于总读段的基于基因组大小的标准化或利用跨基因组的限定箱大

小的平均覆盖来计及,如下文更详细地描述。

[0220] 创建了由人基因组的24条染色体(UCSC hg19;genome.ucsc.edu/)和猪基因组的20条染色体(构成野猪11.1)组成的组合参考FASTA文件。使用BWA比对器将来自FASTQ文件的原始序列读段与组合参考进行比对。以90%的最小比对评分截止值,设定为5%的允许的缺口百分比,并且在没有分裂比对的情况下进行读段比对。

[0221] 将各种映射过滤器模型应用于过滤比对的读段以确定估计偏差和严格性(参见表3)。对于表3中列出的每个模型,对人和猪基因组计算跨1兆碱基(Mb)区域的平均覆盖。猪供体来源的cfDNA百分比计算为:$m_p/(m_p+m_h)*100$,其中m_p是猪基因组上跨1Mb区域的平均覆盖的中值,m_h是人基因组上跨1Mb区域的平均覆盖的中值。该方法计及了猪基因组比人基因组小的事实。

[0222] 另选地,猪供体来源的cfDNA百分比通过以下方式计算:将序列读段与包含猪基因组以及人基因组的组合参考比对,并且确定与猪基因组比对的序列读段的百分比作为组合参考的分数。该方法没有计及人和猪基因组之间的大小的差异。

[0223] 在人和猪基因组的不同级分处制备计算机模拟样本,具有2500万个总测序读段以确定表3中模型的准确性。

[0224] 表3.用于过滤比对读段的模型。

[0225]

模型	读段过滤器
M1	所有比对的读段。
M2	排除具有多重匹配的读段之后的 M1。

[0226]

M3	排除配偶缺失、易位读段和具有不正确取向的读段之后的 M2。
M4	排除比对评分<95%的读段之后的 M2。
M5	排除比对评分<98%的读段之后的 M2。
M6	排除部分比对读段（即，软剪接读段）之后的 M2。
M7	排除部分比对读段（即，硬和软剪接读段，MAPQ 小于 10 的比对）之后的 M2。

[0227] 观察到猪来源的与人来源的cfDNA的平均片段大小的差异。例如,如表4中所示,含有猪来源的和人来源的cfDNA片段的两个样本的分析显示人来源的cfDNA片段具有更长的平均片段大小。猪和人之间的平均cfDNA片段大小差异(例如,如表4中所示)可导致猪供体来源的cfDNA级分的过高估计,例如,如果较小的cfDNA片段导致较大的覆盖。因此,可以应用校正因子来计及猪与人cfDNA的平均片段大小的差异以提高准确性。

[0228] 表4.猪和人cfDNA片段大小分析。

[0229]

样本	人 cfDNA 平均片段大小（bp）	猪 cfDNA 平均片段大小（bp）
A	106.3	93.7
B	103.1	98.1

[0230] 实施例2:猪心脏移植物的人受体中器官移植物健康的非侵入性监测。

[0231] 该实施例描述了使用本文实施例1中所述的基于dPCR和基于测序的方法对猪心脏

移植物的人受体中器官移植物健康的非侵入性监测。

[0232] 样本

[0233] 在人类受体接受来自猪的研究心脏(UHeart)移植后的第6、13、19、25、33、46、49、55和60天,将来自人类受体的血液收集在两个10mL Streck管中,该猪由Revivicor(United Therapeutics子公司)进行了遗传修饰。使用Qiagen QIAamp循环核酸试剂盒提取无细胞DNA(cfDNA),并使用量子位进行定量。

[0234] 如表5所示,cfDNA产率在器官移植后随时间推移变化,从移植后第25天的223ng至移植后第46天的3360ng。

[0235] 表5.患者cfDNA产率。

[0236]

移植后的天数	量子位浓度 (ng/mL)	总产率 (ng)
6	17.3	865
13	8.23	412
19	5.1	255
25	4.46	223
33	20	1000
46	67.2	3360
49	31.5	1575
55	7.73	386.5
60	19.95	997.5

[0237] 基于dPCR的分析

[0238] 生成含有已知百分比的对照猪和人基因组DNA的对照样本,以比较使用单拷贝猪特异性靶或双拷贝猪特异性靶的dPCR测定的性能。如表6所示,与使用单拷贝猪特异性靶的dPCR测定相比,使用双拷贝猪特异性靶的dPCR测定产生多达两倍的阳性dPCR分区。

[0239] 表6.使用双拷贝猪特异性靶与单拷贝猪特异性靶(使用具有人和猪DNA的对照样本)进行比较的dPCR测定的结果。

[0240]

	猪靶的阳性 dPCR 分区的数量		
样本 (已知猪 DNA%)	1 拷贝猪靶测定	2 拷贝猪靶测定	加权平均值
A (1%猪)	8.67	15.8	8.3
B (0.2%猪)	1.42	3.65	1.6
C (0.2%猪)	2.45	4.01	2.2
D (0.1%猪)	0.62	1.71	0.7
E (0%猪)	0	0	0.0

[0241] 如图1A和图1B中所示,使用双拷贝猪特异性靶的单重dPCR测定(参见图1A)以及使用两个单拷贝猪特异性靶的多重dPCR测定(参见图1B)导致对照猪DNA的已知或预期百分比

与猪DNA的计算或测量百分比之间的线性关系。在移植后五个时间点(即,移植后第6、13、19、25、33、46、49、55和60天)使用dPCR分析来自猪心脏移植物的人受体的无细胞DNA(cfDNA)样本。如图2所示,对于每mL血浆样本的基因组拷贝和猪供体来源的无细胞DNA的百分比,猪供体来源的无细胞DNA的百分比在器官移植后第6天最低,并且随时间推移增加直至在器官移植后第55天达到峰值,其随后在器官移植后第60天轻微降低。

[0242] 基于测序的分析

[0243] 还使用如本文实施例1中所述的过滤模型M1-M7,用鸟枪下一代测序(NGS)分析来自猪心脏移植物的人受体的cfDNA样本(参见表3)。也使用相同的方法分析含有纯的人和猪基因组DNA的对照样本。

[0244] 如表7所示,利用过滤模型M7,纯的人DNA对照样本具有0%的计算的猪DNA百分比,表明空白限(LOB)非常接近零。

[0245] 如本文实施例1的表3中所述,过滤模型M1-M7导致从猪心脏移植物的人受体获得的样本的不同猪供体来源的cfDNA百分比估计值(参见表7和图3)。然而,所有过滤模型显示随时间推移的一致趋势,其中猪供体来源的cfDNA百分比在器官移植后第6天最低,并且随时间推移增加直至在器官移植后第55天达到峰值,其随后在器官移植之后第60天轻微降低(参见表7和图3)。

[0246] 表7.来自对照样本(纯的人或猪基因组DNA样本),和在移植后指示天数来自猪心脏移植物的人受体的患者cfDNA样本的鸟枪NGS结果

样本	循环	总读段数	估计的猪DNA百分比						
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
第6天患者样本*	2×65	36,826,446	0.390	0.320	0.280	0.250	0.200	0.190	0.148
第6天患者样本+	2×65	300,503,918	0.440	0.340	0.200	0.250	0.190	0.190	0.163
第13天患者样本+	2×65	109,730,504	0.410	0.330	0.270	0.280	0.240	0.230	0.228
第19天患者样本+	2×65	106,188,398	0.500	0.410	0.360	0.370	0.330	0.320	0.320
第25天患者样本*	2×65	52,460,056	0.860	0.780	0.720	0.690	0.620	0.600	0.585
第25天患者样本+	2×35	635,272,800	0.860	0.760	0.610	0.650	0.590	0.630	0.594

[0247]

样本	循环	总读段数	估计的猪 DNA 百分比						
			M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
第 33 天患者样本*	2×65	40,478,500	0.580	0.520	0.480	0.450	0.400	0.380	0.372
第 46 天患者样本*	2×65	58,470,038	0.474	0.408	0.371	0.343	0.288	0.266	0.254
第 49 天患者样本*	2×65	67,310,140	0.682	0.612	0.558	0.532	0.468	0.452	0.443
第 55 天患者样本*	2×65	64,350,664	1.565	1.496	1.448	1.408	1.312	1.311	1.305
第 60 天患者样本*	2×65	65,701,052	1.093	1.023	0.970	0.936	0.850	0.841	0.833
剪切的人 gDNA*	2×55	49,445,340	0.270	0.190	0.100	0.090	0.040	0.010	0.000
剪切的人 gDNA*	2×50	18,730,820	0.285	0.179	0.113	0.095	0.042	0.010	0.000
剪切的猪 gDNA*	2×55	51,072,814	99.680	99.750	99.910	99.900	99,960	99.990	300.000
人 cfDNA*	2×50	15,329,378	0.270	0.180	0.100	0.090	0.040	0.010	0.000
人（非剪切）gDNA*	2×50	5,114,174	0.119	0.088	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000
0.2%猪（剪切）对照*	2×65	47,651,306	0.506	0.432	0.337	0.300	0.223	0.199	0.178
0.4%猪（剪切）对照*	2×65	63,487,952	0.700	0.611	0.525	0.487	0.398	0.388	0.370
*用 MiSeq 测序；†用 NextSeq 测序。									

[0248] 比较使用过滤模型M7用dPCR或鸟枪NGS在来自猪心脏移植物的人受体的样本中计算的猪供体来源的cfDNA百分比。对于数字PCR测定,使用具有一个双拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的单重测定,或具有两个单拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的多重测定,如表1中所述。

[0249] 如图4、图5和表8所示,尽管在dPCR方法和鸟枪NGS之间,猪供体来源的cfDNA的确定的百分比通常是不同的,然而它们的分析显示随时间推移的一致趋势。如图4所示,猪供体来源的cfDNA百分比在器官移植后第6天最低并且在器官移植后第55天达到峰值,随后在器官移植后第60天轻微降低。通过具有一个双拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的上述单重dPCR测定测量的猪供体来源的cfDNA百分比是通过上述鸟枪NGS方法测量的猪供体来源的cfDNA百分比的二分之一。通过具有两个单拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的上述多重dPCR测定测量的猪供体来源的cfDNA百分比与通过鸟枪NGS方法测量的猪供体来源的cfDNA百分比相当(表8)。

[0250] 表8.猪心脏移植物的人受体中猪供体来源的无细胞DNA百分比(%xcfDNA)的比

较。通过鸟枪下一代测序(“NGS”)、具有一个双拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的单重dPCR测定(“单重dPCR”)、或具有两个单拷贝猪特异性靶和一个单拷贝人特异性靶的多重dPCR测定(“多重dPCR”)来测量%xcfDNA。

[0251]

移植后的天数	% xcfDNA (NGS)	% xcfDNA (单重 dPCR)	% xcfDNA (多重 dPCR)
33	0.372	0.26	0.52
46	0.254	0.12	0.30
49	0.443	0.24	0.48
60	0.833	0.49	1.35

[0252] 实施例3:猪心脏移植物的人死亡模型受体中器官移植物健康的非侵入性短期监测。

[0253] 该实施例描述了在猪心脏移植物的两个人死亡模型受体中器官移植物健康的短期非侵入性监测,该人死亡模型受体使用实施例1中描述的基于测序和/或基于多重dPCR的方法暂时保持人工生命支持。

[0254] 样本

[0255] 获得来自两个人死亡模型受体(受体1和受体2)的血液样本用于对猪供体来源的无细胞DNA进行定量。对于受体1,在移植后第30、48和72小时将血液收集在两个10mL Streck管中。对于受体2,在移植后第0、12、24、36、48、60和66小时将血液收集在两个10mL Streck管中;然而,由于第36小时和第48小时样本因管标签的涂抹而无法区分,因此将它们从进一步分析中排除。

[0256] 基于dPCR的分析

[0257] 使用多重dPCR反应,用两个单拷贝猪测定和一个单拷贝人测定(“多重dPCR#1”),或一个多拷贝猪测定和一个单拷贝人测定(“多重dPCR#2”),一式两份地测试所有可用时间点的样本。输入cfDNA量对于多重dPCR#1测试为20ng,并且对于多重dPCR#2测试为10ng。用多重dPCR#2方法测试的所有样本重复显示几乎相同的%xcfDNA定量,具有低的标准偏差(表9)。

[0258] 表9.在来自受体1和受体2的样本中,通过多重dPCR#1和多重dPCR#2以及NGS方法测量每mL血浆的%xcfDNA、不确定性%和猪基因组拷贝。

[0259]

受体	移植后的小时数	% xcfDNA，通过 NGS 方法	多重 dPCR #1			多重 dPCR #2		
			% xcfDNA	不确定性%	每 mL 血浆的猪基因组拷贝	% xcfDNA	不确定性%	每 mL 血浆的猪基因组拷贝
1	30	2.31	6.56±0.18	6.6±0.1	8772.5±492.0	5.12±0.14	5.0±0.3	6318.2±116.2
	48	0.22	0.44±0.02	21.2±1.0	1361.4±84.5	0.41±0.05	21.8±1.4	1350.1±158.8
	72	0.1	0.29±0.04	33.0±4.0	548.7±124.6	0.24±0.02	32.8±2.5	1475.1±109.8
2	0	0	0±0	n/a	0±0	0±0	n/a	0±0
	12	4.42	7.74±0.47	10.3±0.2	5954.1±364.6	8.89±0.07	7.1±0.2	5527.1±22.4
	24	3.22	7.85±0.27	9.7±0.4	2978.4±142.5	9.93±0.40	6.8±0.1	2814.9±82.2
	60	1.58	4.37±0.13	11.9±0.5	2056.5±150.6	3.03±0.20	9.4±0.1	1834.7±22.5
	66	1.22	3.87±0.22	13.8±1.1	1768.6±202.3	1.70±0.07	13.2±0.6	1029±69.3

[0260] 对于受体1和2两者,通过多重dPCR#1和多重dPCR#2测定的%xcfDNA测量比通过NGS的%xcfDNA测量彼此更接近(图6A和图6B)。通过两种dPCR方法的每mL血浆的猪基因组拷贝测量在受体1样本中也彼此相当(图6C)并且在受体2中几乎相同(图6D和表9)。

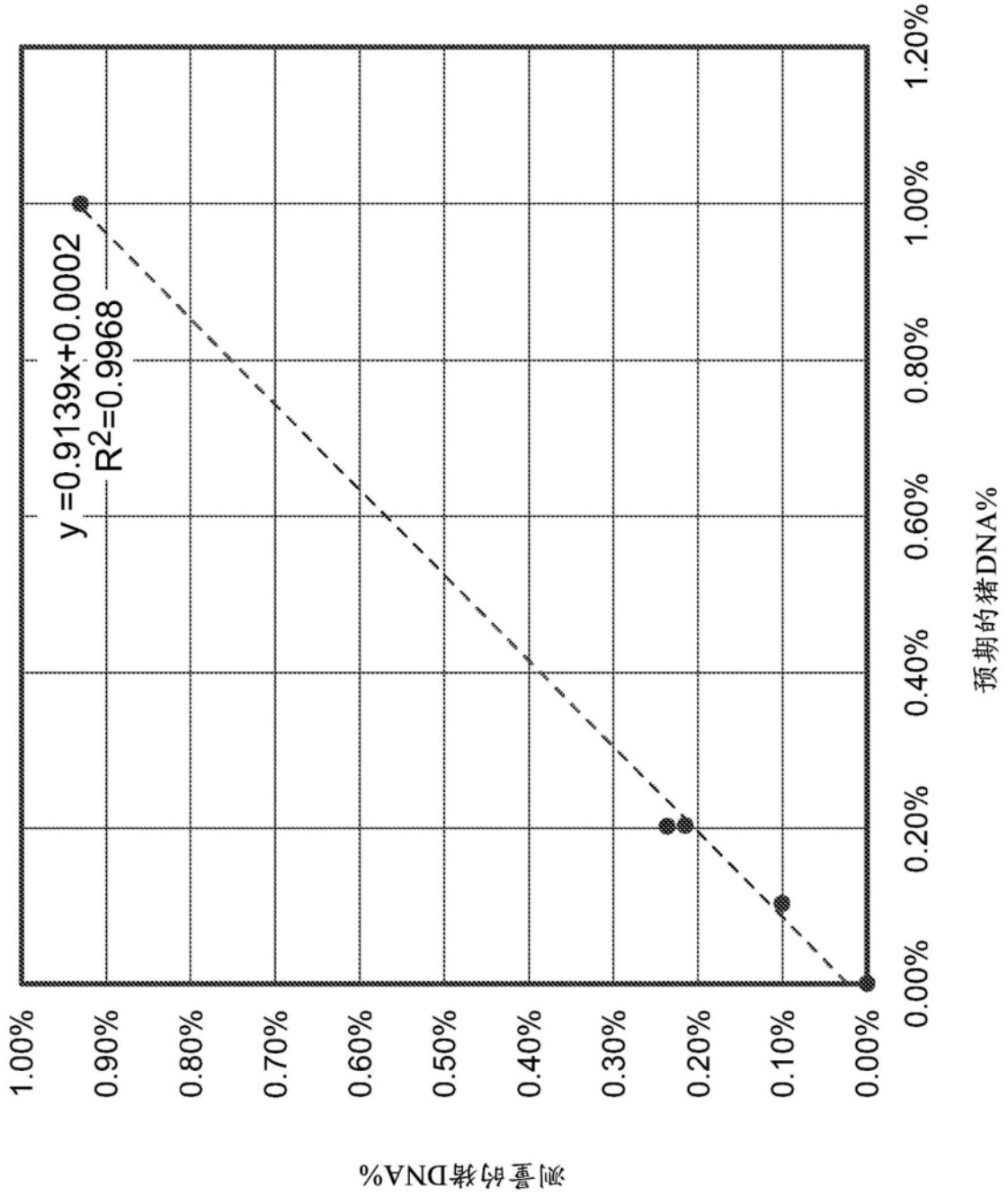

y =0.9139x+0.0002
R2=0.9968
0.00%
0.10%
0.20%
0.30%
0.40%
0.50%
0.60%
0.70%
0.80%
0.90%
1.00%
0.00%
0.20%
0.40%
0.60%
0.80%
1.00%
1.20%
预期的猪DNA%
测量的猪DNA%

图1A

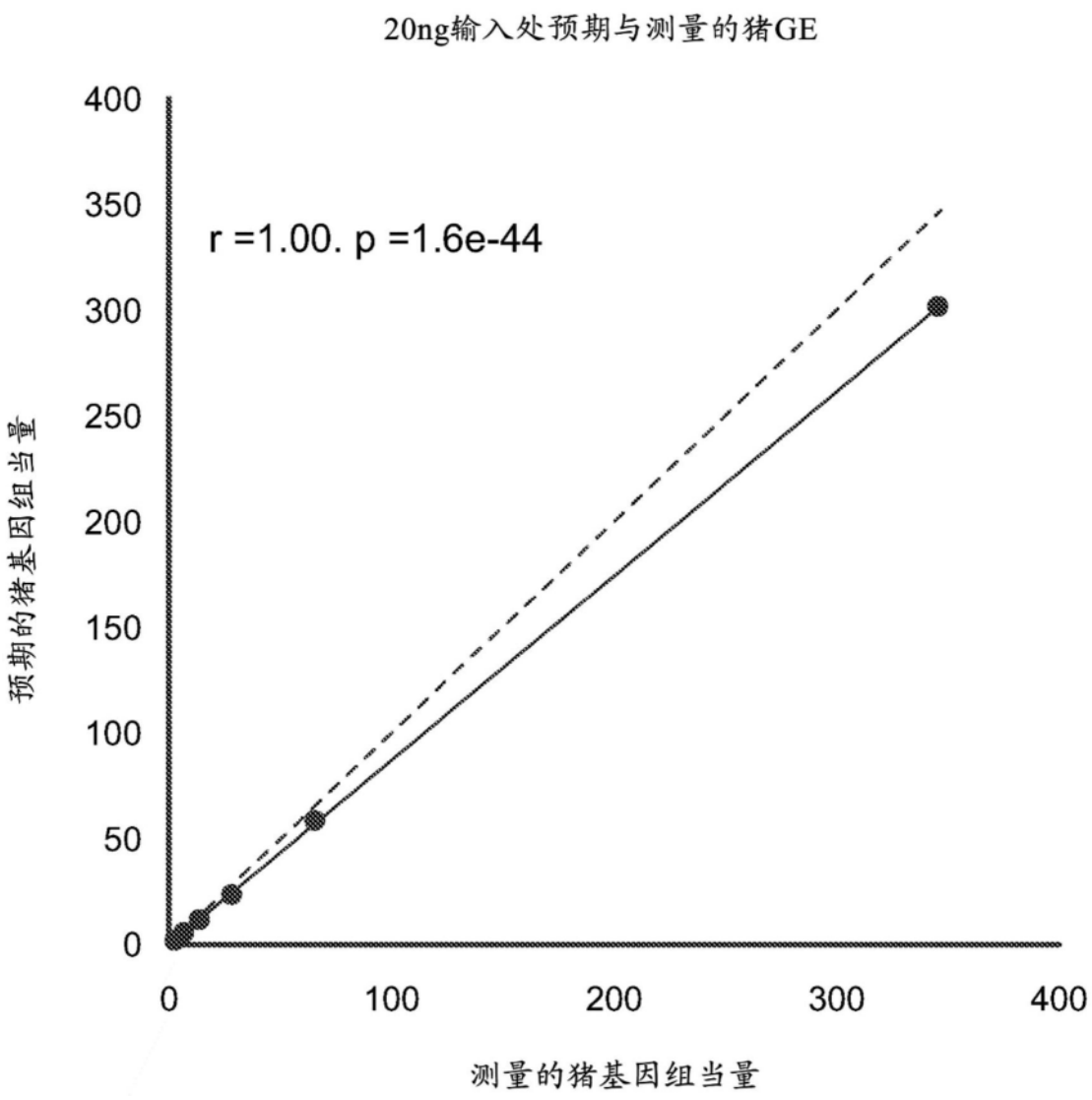

20ng输入处预期与测量的猪GE
r =1.00. p =1.6e-44
预期的猪基因组当量
测量的猪基因组当量
0
50
100
150
200
250
300
350
400
0
100
200
300
400

图1B

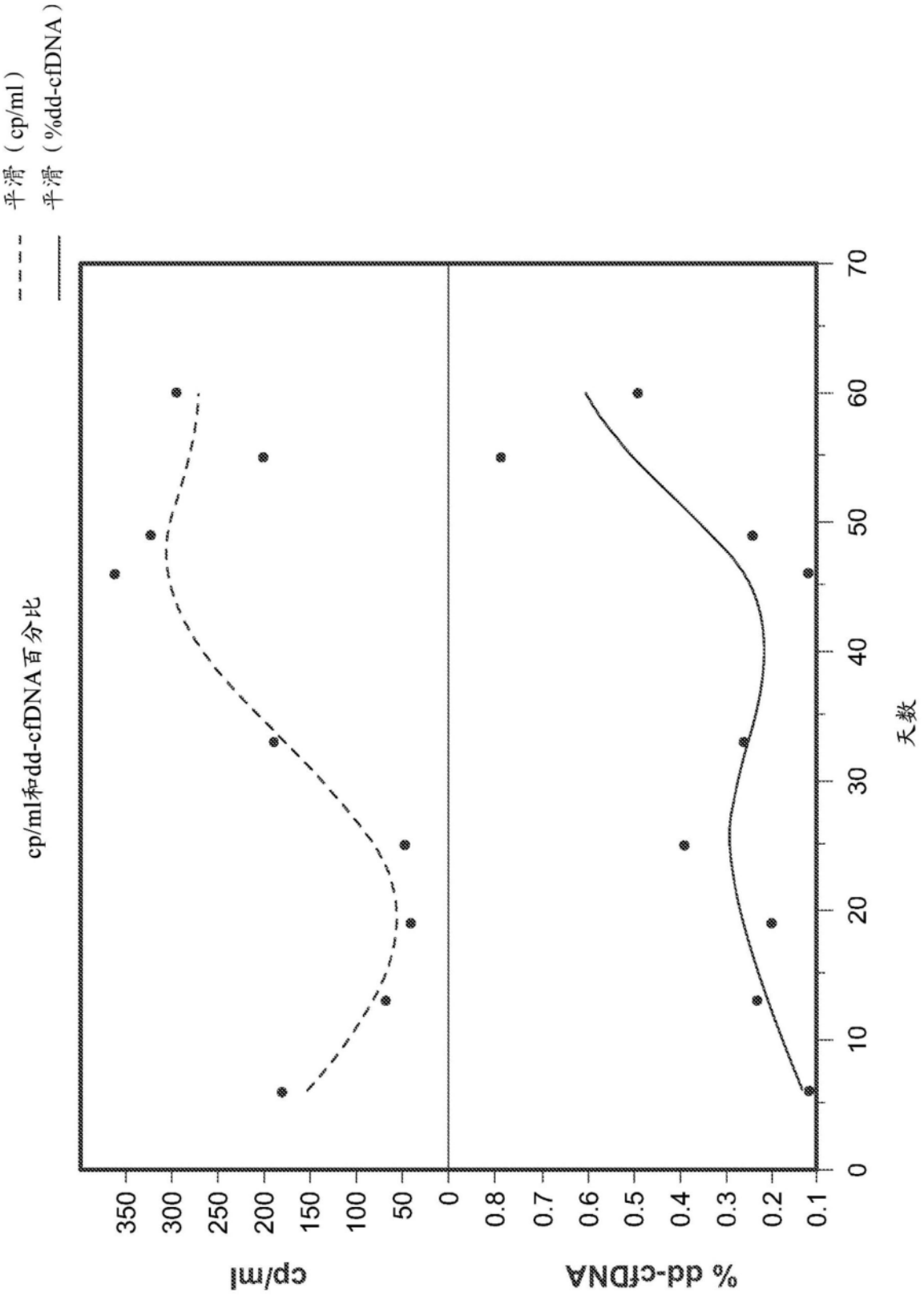

平滑（cp/ml）
平滑（%dd-cfDNA）
cp/ml和dd-cfDNA百分比
cp/ml
% dd-cfDNA
天数
350
300
250
200
150
100
50
0
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
10
20
30
40
50
60
70

图2

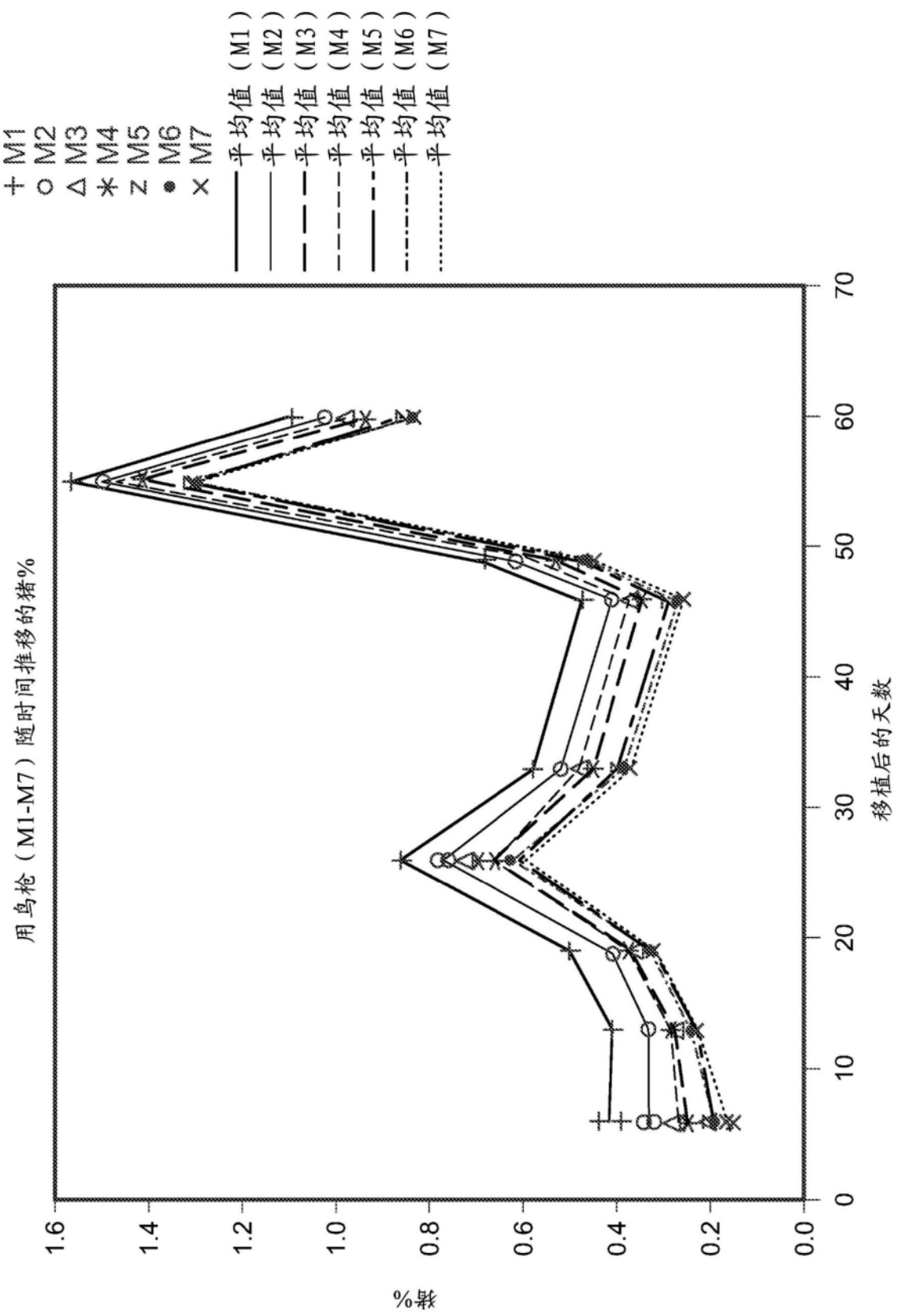

M1
M2
M3
M4
M5
M6
M7
平均值（M1）
平均值（M2）
平均值（M3）
平均值（M4）
平均值（M5）
平均值（M6）
平均值（M7）
用鸟枪（M1-M7）随时间推移的猪%
猪%
移植后的天数
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
1.6
0
10
20
30
40
50
60
70

图3

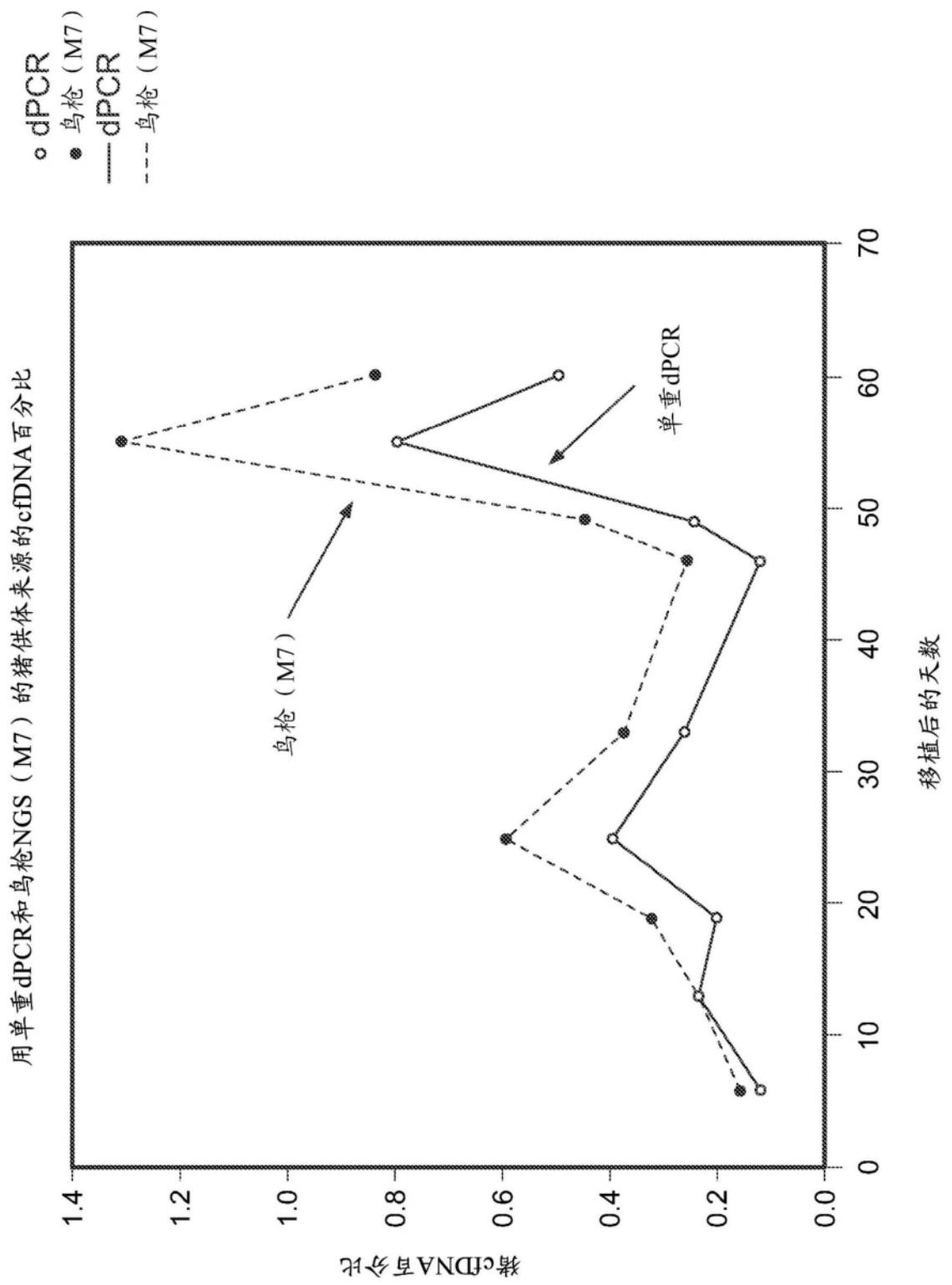

用单重dPCR和鸟枪NGS（M7）的猪供体来源的cfDNA百分比
dPCR
鸟枪（M7）
dPCR
鸟枪（M7）
鸟枪（M7）
单重dPCR
猪cfDNA百分比
移植后的天数
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
1.2
1.4
0
10
20
30
40
50
60
70

图4

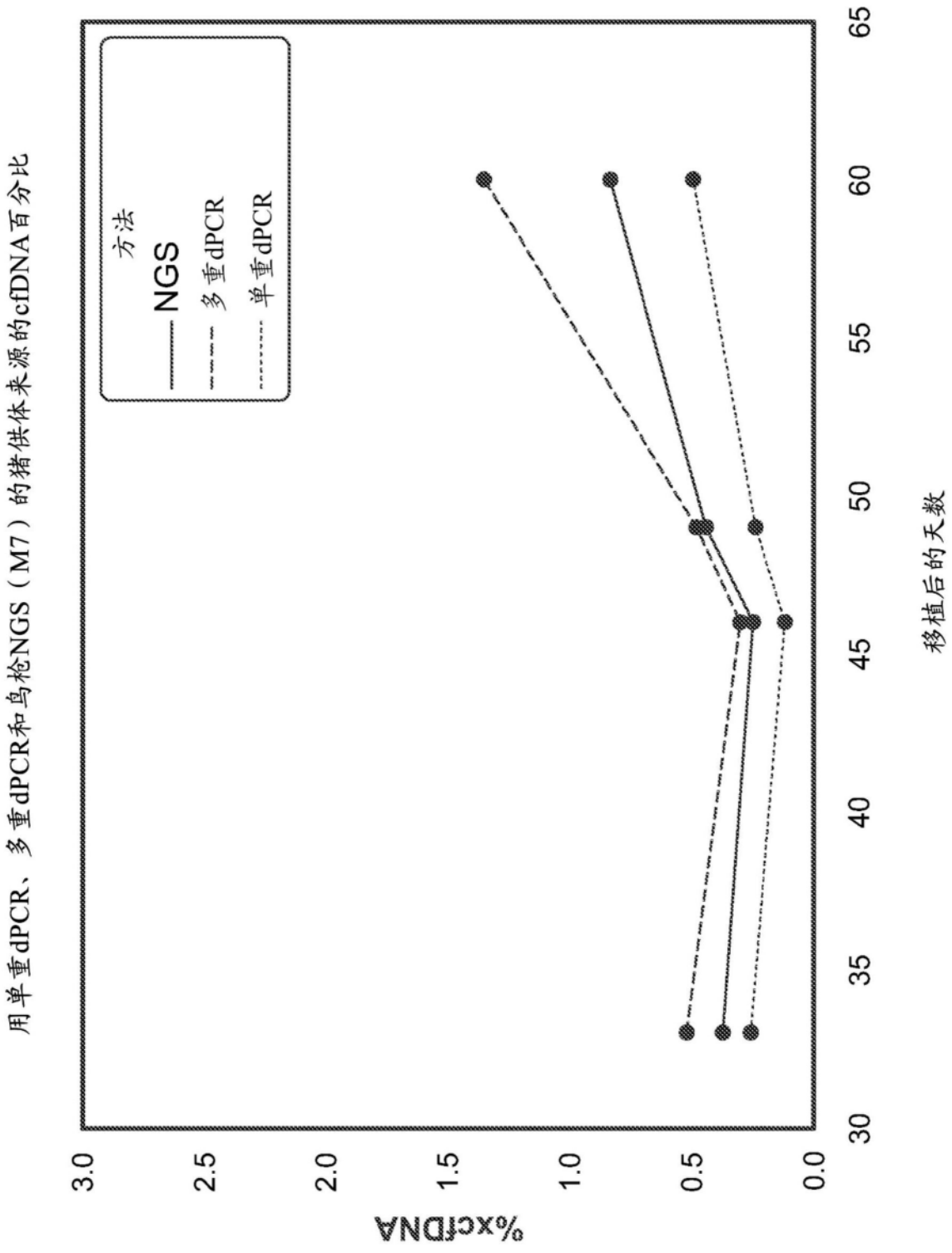

用单重dPCR、多重dPCR和鸟枪NGS（M7）的猪供体来源的cfDNA百分比
方法
NGS
多重dPCR
单重dPCR
%xcfDNA
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
30
35
40
45
50
55
60
65
移植后的天数

图5

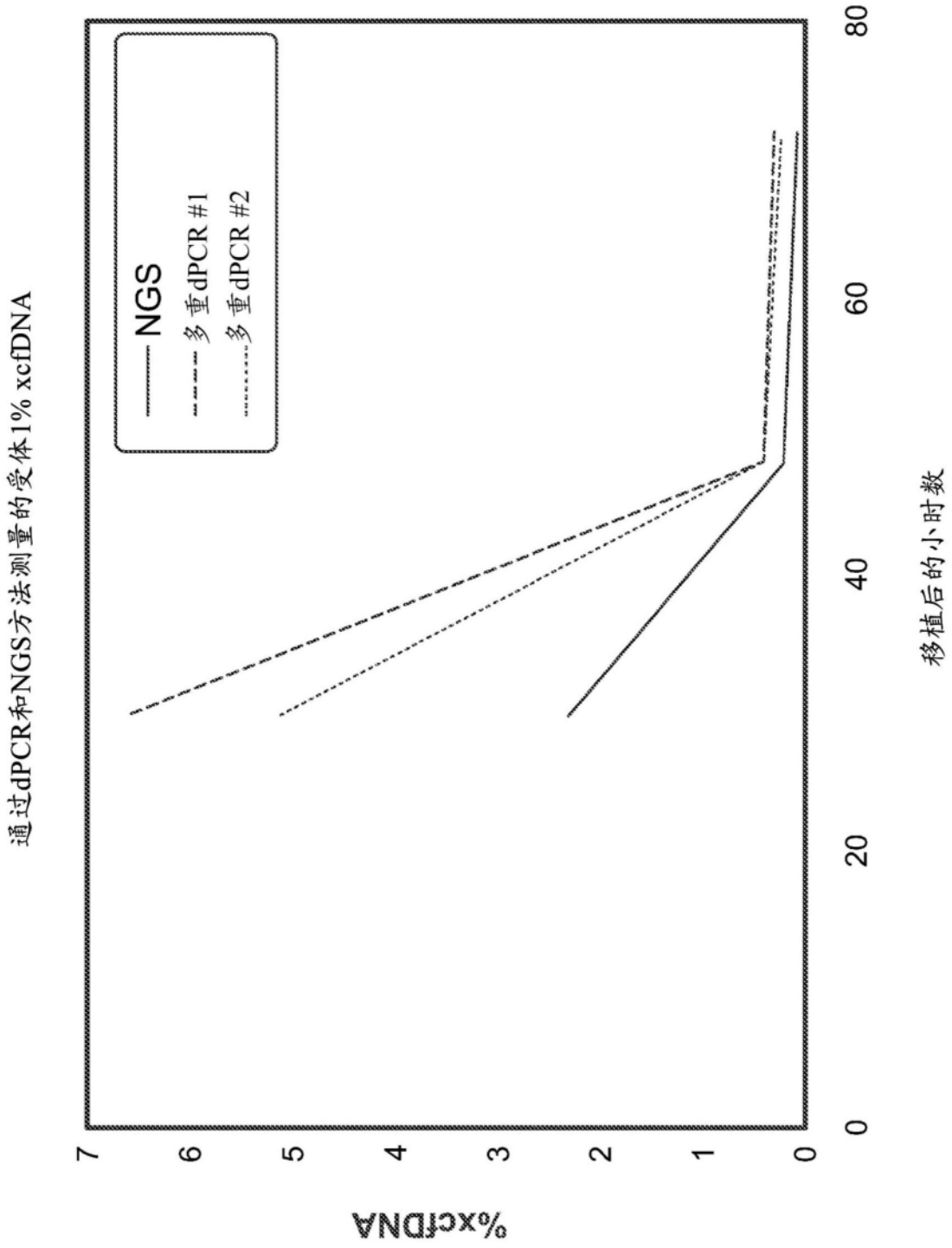

通过dPCR和NGS方法测量的受体1% xcfDNA
NGS
多重dPCR #1
多重dPCR #2
%xcfDNA
0
1
2
3
4
5
6
7
0
20
40
60
80
移植后的小时数

图6A

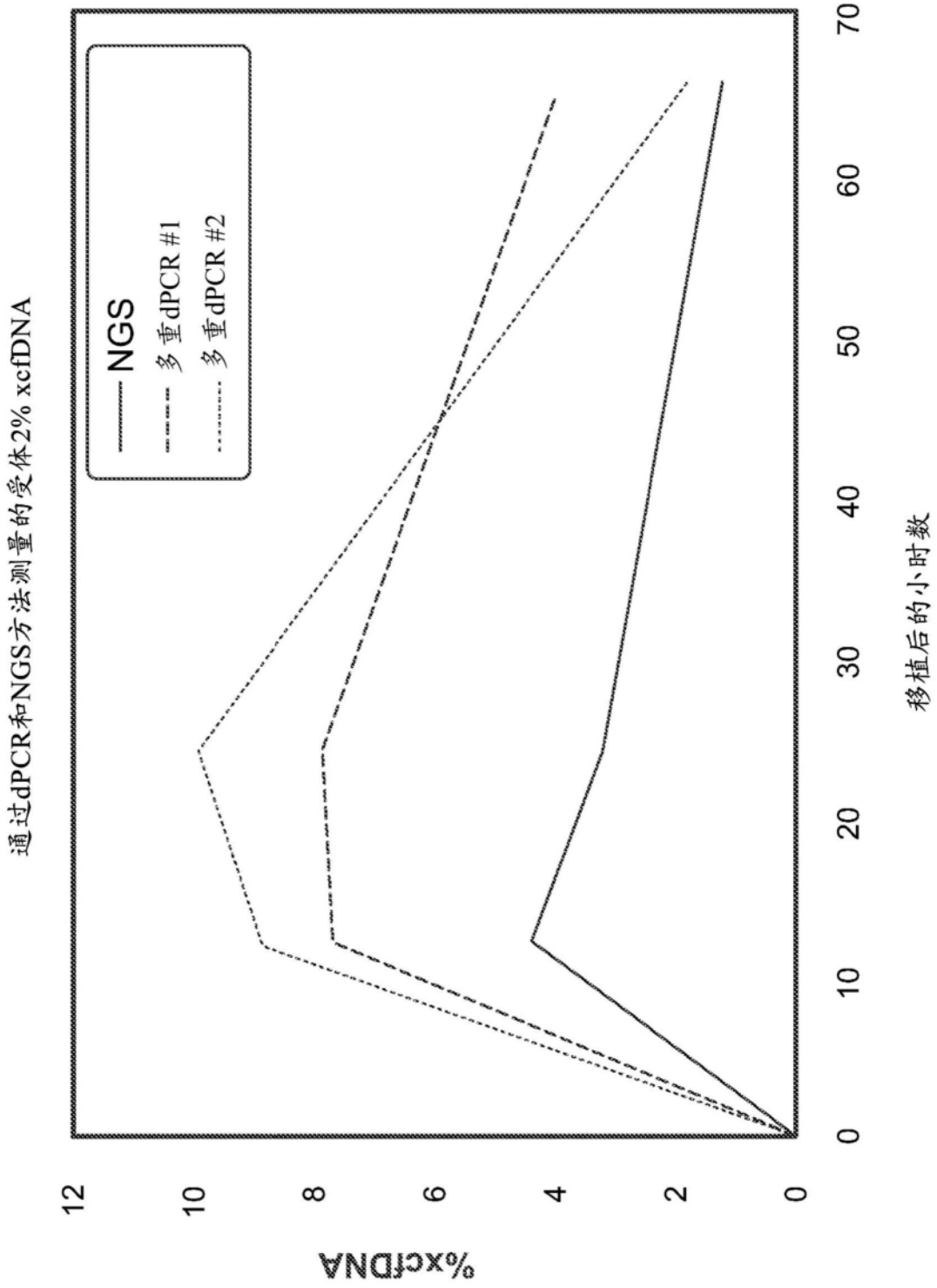

通过dPCR和NGS方法测量的受体2% xcfDNA
NGS
多重dPCR #1
多重dPCR #2
%xcfDNA
0
2
4
6
8
10
12
0
10
20
30
40
50
60
70
移植后的小时数

图6B

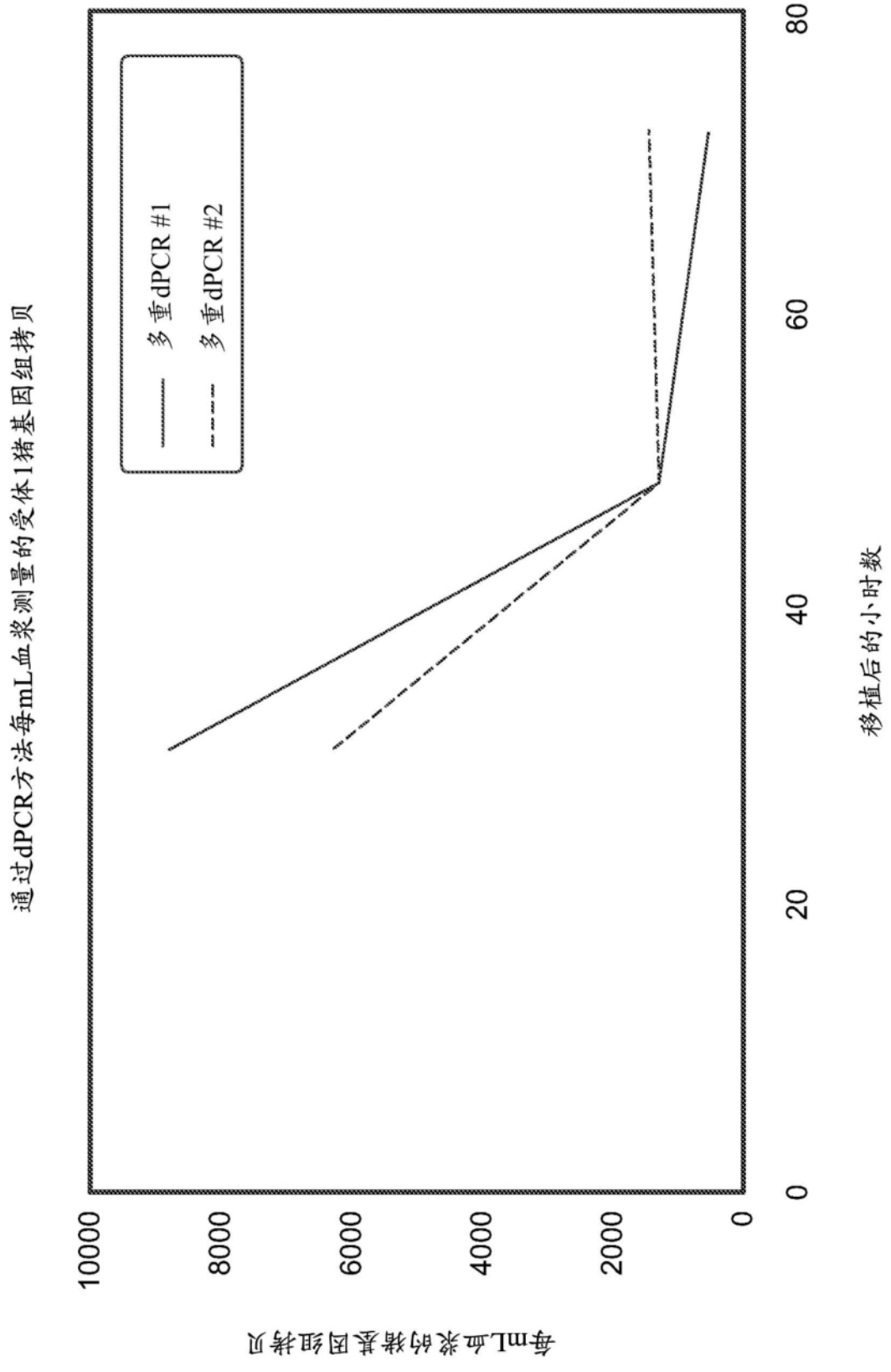

通过dPCR方法每mL血浆测量的受体1猪基因组拷贝
多重dPCR #1
多重dPCR #2
每mL血浆的猪基因组拷贝
10000
8000
6000
4000
2000
0
0
20
40
60
80
移植后的小时数

图6C

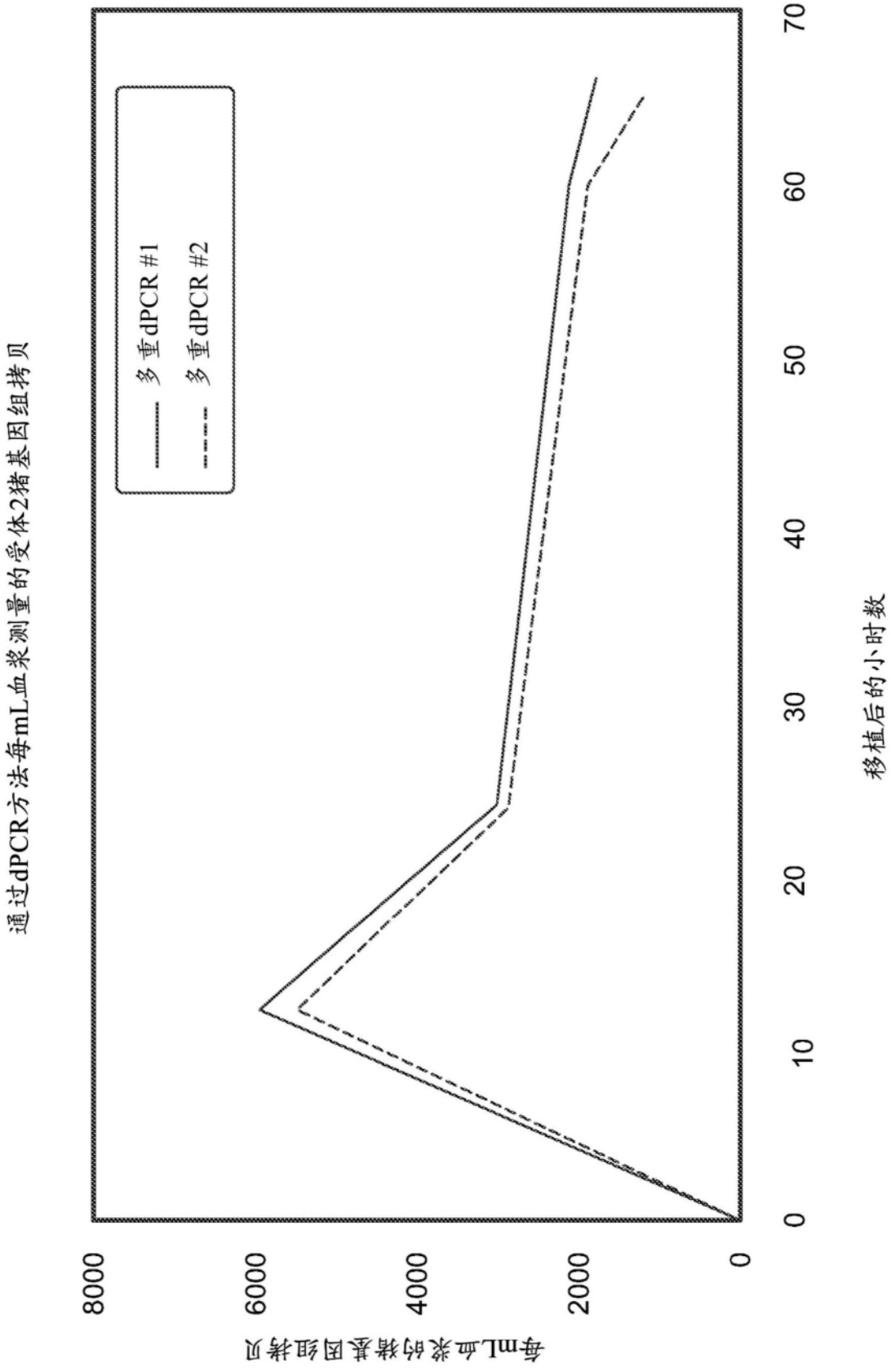

通过dPCR方法每mL血浆测量的受体2猪基因组拷贝
多重dPCR #1
多重dPCR #2
每mL血浆的猪基因组拷贝
0
2000
4000
6000
8000
0
10
20
30
40
50
60
70
移植后的小时数

图6D