

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202090517 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.06.03

(51) Int. Cl. C12Q 1/68 (2018.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.08.17

(54) СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОНОРСКОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК БЕЗ ГЕНОТИПА ДОНОРА

(31) 62/547,098

(72) Изобретатель:

(32) 2017.08.17

Митчелл Аой Томита, Стамм Карл
(US)

(33) US

(86) PCT/US2018/000278

(74) Представитель:

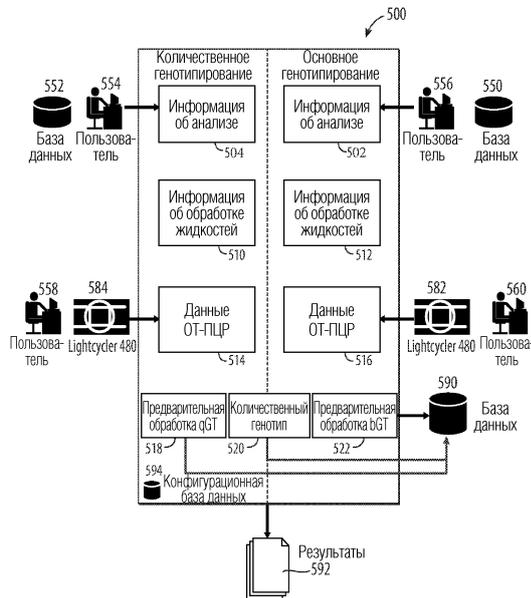
(87) WO 2019/035995 2019.02.21

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ТЭЙ ДАЙАГНОСТИКС, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение относится к способам и системам для оценки количества нуклеиновых кислот не субъекта, таких как донор-специфическая внеклеточная ДНК, в образце субъекта. Способы и системы могут включать имитацию генотипа не субъекта, когда он неизвестен. Способы и системы, рассмотренные в настоящем описании, можно использовать для определения риска состояния, такого как отторжение трансплантата.



A1

202090517

202090517

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 561549EA/042

СПОСОБЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ДОНОРСКОЙ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ ДНК БЕЗ ГЕНОТИПА ДОНОРА

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет согласно 35 U.S.C. § 119(e) на дату подачи предварительной заявки США 62/547098, поданной 17 августа 2017 года, содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам и системам для оценки количества нуклеиновых кислот не субъекта, таких как донор-специфическая внеклеточная ДНК, в образце субъекта. Изобретение относится к системам для анализа и/или оценки количества нуклеиновых кислот не субъекта в образце субъекта без информации о генотипе не субъекта. Способы, композиции и системы, описанные в настоящем описании, можно использовать для определения риска состояния, такого как отторжение трансплантата.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на неожиданном открытии способов определения количеств внеклеточной ДНК, такой как внеклеточная ДНК не субъекта и/или субъекта, без необходимости в знании генотипа не субъекта. Описаны эти способы и системы для количественного определения cf-ДНК у субъектов, таких как субъекты с трансплантатами, которые можно использовать в качестве неинвазивного анализа, например, для диагностики острого отторжения и/или клинически значимых неблагоприятных явлений, без необходимости в знании генотипа не субъекта (например, генотипа донора). Способы и системы также можно использовать для определения субъектов, имеющих низкий или высокий риск, например, отторжения и/или клинически неблагоприятных явлений. Способы и системы также можно использовать для мониторинга любого из субъектов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления в способах и системах используется имитация (например, имитация Монте-Карло) генотипа не субъекта (например, генотипа донора). Такие способы и системы можно использовать в любых случаях, когда образец представляет собой образец со смешанными генотипами и генотип не субъекта не известен. Примеры и текст, которые относятся к сценарию для субъектов с трансплантатами, приведены для иллюстрации и не подразумевают, что анализы должны ограничиваться этим.

В одном аспекте предусматривается способ определения количества нуклеиновых кислот не субъекта в образце субъекта. В некоторых вариантах осуществления способ включает анализ количеств аллелей множества соответствующих мишеней в образце и идентификацию поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце, проведение имитаций с возможными генотипами не субъекта; и определение количеств аллелей каждой мишени, относящейся не к субъекту и,

необязательно, к субъекту, исходя из возможного или вероятного генотипа(ов) не субъекта, определенного путем имитации, и, необязательно, определение количества (например, процента или соотношения) cf-ДНК не субъекта и субъекта в образце.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система дополнительно включает определение генотипа субъекта. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, способ или система, кроме того, включает проведение амплификаций для определения количеств аллелей. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, способ или система, кроме того, включает проведение анализа с использованием секвенирования для определения количеств аллелей.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, анализ с использованием секвенирования или амплификации проводят для по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более мишеней.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление качественных показателей на определенных количествах (например, процентах или соотношениях) в образце. Качественный показатель любого из способов или систем может представлять собой любой из качественных показателей, описанных в настоящем описании или в ином случае известных в данной области.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система включает имитацию вероятного или возможного генотипного пространства не субъекта.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, имитации (например, имитации Монте-Карло) проводят для определения диапазона возможных или вероятных генотипов не субъекта.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает внесение поправки в измеренный вклад соответствующих мишеней на основе соответствующих возможных или вероятных генотипов (например, удвоение измеренной величины вклада при определении что возможный генотип не субъекта является гетерозиготным).

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление усредненного, такого как среднее или срединное, количества, такого как процент или соотношение.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает определение того, что каждая стандартная кривая и/или величина амплификации образца удовлетворяет порогу достоверности. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает определение уровней достоверности на основе анализа по меньшей мере одного из исторической

формы кривой амплификации, специфичности аллель-специфического анализа ПЦР (например, в отношении второго аллеля), соотношения сигнала и шума для образца, наклона и величины γ -квадрат для стандартных наборов кривых, величин не амплификации, полученных для встроенных контролей, или величин контаминации, полученных для образца отрицательного контроля.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает аппроксимацию данных, полученных для образца, к исторической форме кривой амплификации.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает определение того, что наклон и величина γ -квадрат для стандартного набора кривых не превышает пороговую величину.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает присвоение обозначения для не субъекта или субъекта по каждой идентифицированной мишени как поддающаяся количественному определению и/или информативная, в образце. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает определение поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце в результате классификации соответствующей мишени в соответствии с генотипом. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает классификацию соответствующей мишени в качестве поддающейся количественному определению и/или информативной в результате определения того, что субъект и не субъект имеют различные генотипы (например, субъект является гомозиготным по одному аллелю и не субъект не является гомозиготным или является гомозиготным по другому аллелю). В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает внесение поправки в измеренный вклад соответствующей мишени в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным (например, удвоение измеренной величины вклада в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным).

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление среднего или срединного количества (например, проценты или соотношения) информативных (например, идентифицированных посредством компонента генотипирования) и прошедших контроль качества (например, идентифицированных посредством компонента контроля качества) аллелей и сохраняет средние или срединные величины в качестве количества (например, соотношения или процента). В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление регуляризованного робастного коэффициента вариации

("rCV") на основе распределения информативных и/или поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных количеств (например, процентов или соотношений). В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление робастного стандартного отклонения ("rSD") на основе срединного абсолютного отклонения от срединной доли минорного типа. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает преобразование rSD в rCV посредством деления, например, на количество (например, соотношение или процент) cf-ДНК не субъекта. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает внесение поправки в rSD, чтобы избежать деления на ноль (например, путем добавления четверти от одного процента к делителю). В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает идентификацию образца, пригодного для количественного определения, на основе пороговой величины rCV, определенной по распределению информативных и/или поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных количеств (например, процентов или соотношений).

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает оценку средней доли минорного аллеля гомозиготных и не поддающихся количественному определению и/или неинформативных мишеней субъекта против порогового значения контаминации.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает вычисление величины проверки качества дискордантности ("dQC") на основе средней доли минорного аллеля гомозиготных и не поддающихся количественному определению и/или неинформативных аллелей субъекта и оценку величины dQC против порогового значения. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, включает идентификацию образцов, пригодных для количественного определения, на основе идентификации величины dQC ниже порогового значения, например, 0,5%.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, не субъектом является донор. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, образец взят от субъекта с трансплантатом. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, субъект с трансплантатом представляет собой субъекта с трансплантатом сердца. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, образец взят от педиатрического субъекта. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, образец взят от беременного субъекта.

В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в

настоящем описании, способ или система, кроме того, включает выбор суммарного и/или 95% доверительного интервала для возможных или вероятных имитаций. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ дополнительно включает выбор имитаций с dQC и rCV ниже среднего и/или определение 95% доверительного интервала.

В рамках настоящего изобретения в другом аспекте предусматривается система для анализа образца от индивидуума, где система содержит по меньшей мере один процессор, функционально подсоединенный к памяти; первый компонент (например, компонент контроля качества), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованный для анализа (например, количественного генотипирования ("qGT")) количества аллелей в множестве соответствующих мишеней в образце, и идентификации поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце; второй компонент (например, компонент моделирования), организованный для имитации информации о возможном генотипе не субъекта; и третий компонент (например, компонент генотипирования), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованным для определения количеств аллелей каждой мишени, приписываемой не субъекту и необязательно субъекту, на основе возможного или вероятного генотипа(ов) не субъекта, определенного из имитации, и необязательно определение количества (например, процента или соотношения), соответствующего субъекту, относительно количеств, соответствующих субъекту, в образце.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система, кроме того, содержит четвертый компонент (например, аналитический компонент), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованным для вычисления показателей качества на определенных количествах (например, процентах или соотношениях) в образце.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, третий компонент организован для имитации вероятного или возможного генотипного пространства не субъекта. В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, третий компонент организован для выполнения имитации (например, имитации Монте-Карло) для определения диапазона возможных или вероятных генотипов не субъекта. В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, третий компонент организован для внесения поправки в измеренный вклад соответствующих мишеней на основе соответствующих возможных или вероятных генотипов (например, удвоение величины измеренного вклада в результате определения того, что возможный или вероятный генотип не субъекта является гетерозиготным).

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, по меньшей мере один процессор организован для вычисления усредненного, такого как среднее или срединное, количества (например, процента или соотношения).

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем

описании, первый компонент организован для определения, того, что каждая стандартная кривая и/или величина амплификации образца удовлетворяет пороговому значению достоверности. В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, первый компонент организован для определения величин достоверности на основе анализа по меньшей мере одного из исторической формы кривой амплификации, специфичности анализа с использованием аллель-специфической ПЦР (например, относительно второго аллеля), соотношения сигнала и шума для образца, наклона и величины γ -квадрат для стандартных наборов кривых, величин не амплификации, полученных для встроенных контролей, или величин контаминации, полученных для образцов отрицательных контролей. В одном варианте осуществления любой из предусматриваемых систем первый компонент организован для аппроксимации данных, полученных для образца, к исторической форме кривой амплификации. В одном варианте осуществления любой из предусматриваемых систем первый компонент организован для определения того, что наклон и величина γ -квадрат для стандартных наборов кривых не превышает пороговую величину.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, первый или третий компонент организован для присвоения обозначения для не субъекта или субъекта по каждой идентифицированной мишени как поддающаяся количественному определению и/или информативная в образце. В одном варианте осуществления любой из предусматриваемых систем первый или третий компонент организован для определения поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце после классификации соответствующих мишеней в соответствии с генотипом. В одном варианте осуществления любой из предусматриваемых систем третий компонент организован для классификации соответствующей мишени в качестве поддающейся количественному определению и/или информативной в результате определения того, что субъект или не субъект имеет различные генотипы (например, субъект является гомозиготным по одному аллелю и не субъект не является гомозиготным или является гомозиготным по другому аллелю).

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, третий компонент организован для внесения поправки в измеренный вклад соответствующей мишени в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным (например, удвоение величины измеренного вклада в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным). В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, третий компонент вычисляет среднее или срединное значение соотношения информативных (например, идентифицированных посредством компонента генотипирования) и прошедших контроль качества (например, идентифицированных посредством компонента контроля качества) аллелей и срединных величин в качестве количества (например, соотношение или процент).

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем

описании, любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для вычисления регуляризованного робастного коэффициента вариации ("rCV") на основе распределения информативных и/или поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных количеств (например, процентов или соотношений). В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для вычисления робастного стандартного отклонения ("rSD") на основе срединного абсолютного отклонения от срединной меньшей видовой доли. В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для преобразования rSD в rCV посредством деления, например, на количество cf-ДНК не субъекта (например, процент или соотношение). В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, компонент организован для внесения поправки в rSD, чтобы избежать деления на ноль (например, путем добавления четверти от одного процента к делителю). В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система организована для идентификации образца, пригодного для количественного определения, на основе пороговой величины rCV, определенной по распределению информативных и/или поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных количеств (например, процентов или соотношений). В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система организована для оценки усредненной доли малого аллеля у гомозиготных и неинформативных мишеней минорного против порогового значения контаминации.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система организована для вычисления величины проверки качества дискордантности ("dQC") на основе усредненной доли минорного аллеля гомозиготных и не поддающихся количественному определению и/или неинформативных аллелей субъекта и оценку величины dQC против порогового значения. В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система организована для идентификации образцов, пригодных для количественного определения, на основе идентификации величины dQC ниже порогового значения, например, ниже 0,5%.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система, кроме того, организована для выбора суммарного и/или 95% доверительного интервала для возможных или вероятных имитаций.

В одном варианте осуществления любой из систем, описанных в настоящем описании, система дополнительно организована для выбора имитаций с dQC и rCV ниже среднего и/или определения 95% доверительного интервала.

В одном аспекте предусматривается отчет, включающий любую одну или нескольких величин, полученных с помощью способов или систем, описанных в настоящем описании.

В рамках настоящего изобретения в другом аспекте предусматривается способ

лечения индивидуума. Способ включает оценку индивидуума на основе одной или нескольких величин, полученных с помощью любого из предшествующих способов или систем, и лечение, рекомендацию лечения, изменение лечения, дальнейший мониторинг или рекомендацию дальнейшего мониторинга субъекта.

В одном варианте осуществления любой из вариантов осуществления для способов, описанных в настоящем описании, может представлять собой вариант осуществления для любой из композиций, систем или отчетов, описанных в настоящем описании. В одном варианте осуществления любой из вариантов осуществления для систем, описанных в настоящем описании, может представлять собой вариант осуществления для любой из композиций, способов и отчетов, описанных в настоящем описании.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Подразумевается, что прилагаемые чертежи изображены не в масштабе. Фигуры являются только иллюстративными и не являются необходимыми для реализации изобретения.

На **фиг.1А** представлено экспериментальное определение пороговой точки ("точки отсечения") для CR2 с информацией о донорском генотипе.

На **фиг.1В** представлено экспериментальное определение пороговой точки ("точка отсечения") для CR2 без информации о донорском генотипе.

На **фиг.2А** представлено экспериментальное определение пороговой точки ("точки отсечения") для васкулопатии трансплантата с информацией о донорском генотипе.

На **фиг.2В** представлено экспериментальное определение пороговой точки ("точки отсечения") для васкулопатии трансплантата без информации о донорском генотипе.

На **фиг.3** представлена блок-схема иллюстративного варианта осуществления системы для анализа образца.

На **фиг.4** представлена блок-схема иллюстративной распределенной вычислительной системы, на которой применяются на практике различные аспекты и функции по изобретению.

На **фиг.5** представлена блок-схема платформы для анализа образцов в соответствии с одним вариантом осуществления.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Таким образом, различные аспекты относятся к способам детекции, анализа и/или количественного определения нуклеиновых кислот (например, внеклеточной ДНК), таких как нуклеиновые кислоты не субъекта (например, внеклеточная ДНК не субъекта), в образцах, полученных от субъекта. Как используют в рамках изобретения, "нуклеиновые кислоты не субъекта" относятся к нуклеиновым кислотам, которые происходят из другого источника или являются мутантными версиями нуклеиновой кислоты, встречающейся у субъекта (относительно конкретной последовательности, такой как последовательность дикого типа). Таким образом, "нуклеиновые кислоты субъекта" представляют собой нуклеиновые кислоты, которые происходят не из другого источника и не являются

мутантными версиями нуклеиновой кислоты, встречающейся у субъекта (относительно конкретной последовательности, такой как последовательность дикого типа). Как используют в рамках изобретения, любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, можно использовать для определения количества внеклеточной ДНК из источника, не являющегося субъектом, такой как ДНК, специфическая для донора, или донор-специфическая внеклеточная ДНК (например, донор-специфическая cf-ДНК) или фетальная ДНК (например, фетальная внеклеточная ДНК). Любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, можно использовать для образца от субъекта, которому провели трансплантацию. В некоторых вариантах осуществления трансплантат представляет собой трансплантат сердца. Любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, можно использовать для образца от беременного субъекта.

"Внеклеточная ДНК" (cf-ДНК) относится к фрагментам ДНК, которые высвобождаются из клеток, без связи с какой-либо теорией, как правило, в ходе апоптоза, лизиса, некроза или повреждения, которые встречаются в свободной циркуляции, например, в крови, плазме, сыворотке, моче и т.д. субъекта. Как используют в рамках изобретения, композиции и способы, описанные в настоящем описании, можно использовать для определения количества внеклеточной ДНК, например, внеклеточной ДНК не субъекта, такой как ДНК донора, которая может встречаться у реципиента трансплантата, или ДНК беременного субъекта. Cf-ДНК "субъекта" можно однозначно количественно определять и выявлять в качестве отличной от cf-ДНК "не субъекта", как в случае субъектов с трансплантатом или фетальной ДНК в материнской сыворотке в ходе беременности (Norton et al., N Engl J Med 373: 2582 (2015)).

В системах и способах, описанных в настоящем описании, могут использоваться имитации, такие как имитации Монте-Карло, когда генотип не субъекта неизвестен. Как правило, системы и способы анализируют количества аллелей в ряде мишеней. "Мишень" представляет собой последовательность нуклеиновой кислоты, в которой существует, может быть или ожидается вариабельность идентичности последовательностей. В одном варианте осуществления мишень представляет собой, может представлять собой или ожидается, что она будет мишенью, где существует вариабельность последовательности в одном нуклеотиде, например, в популяции индивидуумов или в результате мутации, которая может возникнуть у индивидуума и которая может быть ассоциирована с заболеванием или состоянием. Таким образом, мишень имеет или ожидается, что будет иметь, более одного аллеля и в предпочтительных вариантах осуществления мишень является биаллельной. "Множество мишеней" относится более чем к одной мишени (т.е. к множеству мишеней).

В некоторых вариантах осуществления любой из предусматриваемых систем или способов, количества аллелей анализируют по меньшей мере для 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или более мишеней. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании,

количества аллелей анализируют менее чем для 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98 или 97 мишеней. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, количества аллелей анализируют для 40-105, 45-105, 50-105, 55-105, 60-105, 65-105, 70-105, 75-105, 80-105, 85-105, 90-105, 90-104, 90-103, 90-102, 90-101, 90-100, 90-99, 91-99, 92-99, 93, 99, 94-99, 95-99 или 90-95 мишеней. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-99, 45-99, 50-99, 55-99, 60-99, 65-99, 70-99, 75-99, 80-99, 85-99, 90-99, 90-99, 90-98, 90-97 или 90-96 мишеней. В других вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-95, 45-95, 50-95, 55-95, 60-95, 65-95, 70-95, 75-95, 80-95, 85-95 или 90-95 мишеней. В других вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-90, 45-90, 50-90, 55-90, 60-90, 65-90, 70-90, 75-90, 80-90 или 85-90 мишеней. В других вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-85, 45-85, 50-85, 55-85, 60-85, 65-85, 70-85, 75-85 или 80-85 мишеней. В других вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-80, 45-80, 50-80, 55-80, 60-80, 65-80, 70-80 или 75-80 мишеней. В других вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем проводят анализ для 40-75, 45-75, 50-75, 55-75, 60-75, 65-75 или 70-75 мишеней.

Мишени могут быть идентифицированы как поддающиеся количественному определению (т.е. для которых может быть измерено количество аллелей) и/или информативные. "Информативные мишени", как предусматривается в настоящем описании, представляют собой мишени, где количества аллелей можно использовать для определения количества нуклеиновых кислот не субъекта относительно или в отличие от нуклеиновых кислот субъекта в образце. Как правило, информативные результаты могут исключать результаты, где нуклеиновые кислоты субъекта являются гетерозиготными в отношении конкретной мишени, а также результаты "без сигнала" или ошибочного сигнала. Из информативных результатов могут быть вычислены количества аллеля (например, соотношения или проценты), например, с использованием стандартных кривых в некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем количество нуклеиновых кислот не субъекта и/или субъекта соответствует усредненному значению для информативных результатов нуклеиновых кислот не субъекта и/или субъекта, соответственно. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, это усредненное значение приводится в качестве абсолютного количества или в качестве соотношения или процента. Предпочтительно, в некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, это усредненное значение представляет собой среднее значение или срединное значение. В других вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, усредненное значение представляет собой усеченное среднее значение. Как

используют в рамках изобретения, "усеченное среднее значение" относится к удалению мишеней с наиболее низким отчетом (таких как два наиболее низких отчета) в комбинации с наиболее высоким отчетом (таких как два наиболее высоких отчета). В других вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, усредненное значение представляет собой среднее значение.

В другом аспекте предусматриваются отчеты о любой одной или нескольких величинах, полученных с использованием любого из способов или систем, описанных в настоящем описании. В одном варианте осуществления в отчете сообщается количество внеклеточной ДНК не субъекта в один или несколько моментов времени. В одном варианте осуществления отчет может включать и/или также может включать любую одну или несколько величин, полученных с использованием любого из способов или систем, описанных в настоящем описании. Предпочтительно, отчет представляет собой отчет, в котором клиницистом может использоваться по меньшей мере одна из величин для оценки субъекта и/или лечения субъекта. Любой один или несколько способов, описанных в настоящем описании, может включать стадию формирования отчета, и/или предоставления отчета, и/или оценки субъекта, исходя из одной или нескольких величин, и/или лечения субъекта на основе одной или нескольких величин, полученных любым из способов или систем, или предоставленных в любом из отчетов, описанных в настоящем описании.

Отчеты могут быть в устной, письменной (или печатная копия) или электронной форме, такой как форма, которая может быть визуализирована или выведена на экран. В некоторых вариантах осуществления в отчете предоставляются "необработанные" результаты, описанные в настоящем описании, и, исходя из этого отчета, могут быть предприняты дальнейшие шаги для определения количества нуклеиновых кислот не субъекта в образце. В других вариантах осуществления в отчете предоставляется количество нуклеиновых кислот не субъекта в образце. Исходя из этого количества, в некоторых вариантах осуществления клиницист может оценивать необходимость в лечении субъекта или необходимость в мониторинге субъекта, таком как определение количества нуклеиновых кислот не индивидуума позднее. Таким образом, в любом из способов, описанных в настоящем описании, способ может включать оценку количества нуклеиновых кислот не субъекта у субъекта в другой момент времени. Такую оценку можно проводить любым из способов, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления в отчете предоставляются количества нуклеиновых кислот не субъекта у субъекта с течением времени.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, количества находится в или вводятся в базу данных. В одном аспекте предусматривается база данных с такими величинами. Из этого количества(количеств) клиницист может оценивать необходимость в лечении или мониторинге индивидуума. Таким образом, в любом из способов, описанных в настоящем описании, способ может включать оценку количеств у индивидуума более чем в один

момент времени. Такую оценку можно проводить с использованием любого из способов или систем, описанных в настоящем описании.

Как используют в рамках изобретения, "количество" относится к любой количественной величине для измерения нуклеиновых кислот (например, cf-ДНК), и оно может быть приведено в виде абсолютного или относительного количества. Кроме того, количество может представлять собой общее количество, частоту, соотношение, процент и т.д. Как используют в рамках изобретения, термин "уровень" можно использовать вместо "количества", но он относится к одним и тем же типам величин. Как правило, если не предусматривается иное, количества, описанные в настоящем описании, представляют собой долю или процент нуклеиновых кислот не субъекта в образце.

В некоторых вариантах осуществления любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, может включать аналитический компонент, предназначенный для сравнения количества с пороговой величиной или с одним или несколькими предшествующими количествами для идентификации субъекта, имеющего увеличенный или сниженный риск. Например, аналитический компонент может имитировать донорский генотип для обеспечения анализа образца смешанных генотипов, где генотип не субъекта неизвестен. В другом примере аналитический компонент организован для сравнения полученной величины (отражающей количество нуклеиновых кислот не субъекта (например, донора) (например, cf-ДНК)) в образце против заданного порогового значения для увеличенного риска. Когда показатель или величина снижается ниже пороговых значений субъект может быть идентифицирован как имеющий низкий риск или в некоторых случаях не увеличенный риск, и, когда величины превышают пороговое значение, субъекта можно идентифицировать как имеющего увеличенный риск. Аналитический компонент также может сравнивать показатель или величину против пороговых значений для сниженного риска. Если значение для субъекта находится ниже порогового значения, субъекта можно идентифицировать как имеющего низкий риск. Если нет, то субъект может не получить идентификации или также может быть оценен против пороговых значений высокого риска.

"Порог" или "пороговая величина", как используют в рамках изобретения, относится к любому заданному уровню или диапазону уровней, который указывает на что-либо. Например, при определении риска эта пороговая величина может указывать на наличие или отсутствие состояния или наличие или отсутствие риска. Пороговая величина может принимать различные формы. Она может представлять собой единичную пороговую величину, такую как срединное значение или среднее значение. Она может быть установлена на основе сравнительных групп, например, где риск в одной определенной группе представляет собой удвоенный риск в другой определенной группе. Она может представлять собой диапазон, например, где исследуемая популяция подразделена равным образом (или неравным образом) на группы, такие как группа низкого риска, группа среднего риска и группа высокого риска, или на квадранты, причем нижний квадрант представляет собой субъектов с наиболее низким риском и верхний

квадрант представляет собой индивидуумов с наиболее высоким риском. Пороговая величина может зависеть от конкретной выбранной популяции или конкретного назначения величины, изменяемой и сравниваемой с пороговым значением. Соответствующие величины, диапазоны и категории пороговых значений могут быть выбраны специалистами в данной области с использованием не более чем стандартного экспериментирования.

Благодаря способности определять количества нуклеиновых кислот не субъекта даже при низких уровнях, способы и системы, описанные в настоящем описании, можно использовать для оценки риска у субъекта, такого как реципиент трансплантата или беременный субъект. "Риск", как описано в настоящем описании, относится к наличию или отсутствию какого-либо нежелательного состояния у субъекта (такого как реципиент трансплантата), или увеличенной вероятности наличия или отсутствия такого состояния, например, отторжения трансплантата. Как описано в настоящем описании, "увеличенный риск" относится к наличию какого-либо нежелательного состояния у субъекта или увеличенной вероятности наличия такого состояния. Как описано в настоящем описании, "сниженный риск" относится к отсутствию какого-либо нежелательного состояния у субъекта или сниженной вероятности наличия (или увеличенной вероятности отсутствия) такого состояния. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, субъекта, имеющего увеличенное количество по сравнению с пороговой величиной или с одним или несколькими предшествующими количествами, идентифицируют как имеющего увеличенный риск. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, субъекта, имеющего сниженное или сходное количество по сравнению с пороговой величиной или с одним или несколькими предшествующими количествами, идентифицируют как имеющего сниженный или не увеличенный риск.

В качестве примера, раннее обнаружение отторжения после имплантации трансплантата (например, трансплантата сердца) может облегчать лечение и улучшать клинические исходы. Отторжение трансплантата остается основной причиной неуспеха трансплантации и поздней смертности и, как правило, требует пожизненного мониторинга. Было показано, что лечение отторжения трансплантата иммуносупрессивной терапией улучшает исходы лечения, в частности, если отторжение определяется рано. Клиницист может проводить оценку (например, оценку риска) субъекта с трансплантатом в отношении количества донорной cf-ДНК, и такая стадия может быть включена в качестве части любого из способов, описанных в настоящем описании.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем, субъект является реципиентом трансплантата и риск представляет собой риск, ассоциированный с трансплантатом. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем риск, ассоциированный с трансплантатом, представляет собой риск отторжения трансплантата,

анатомической проблемы с трансплантатом или повреждения трансплантата. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем повреждение трансплантата представляет собой первоначальное или продолжающееся повреждение. В некоторых вариантах осуществления любых из предусматриваемых способов или систем риск, ассоциированный с трансплантатом, представляет собой острое состояние или хроническое состояние. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем острое состояние представляет собой отторжение трансплантата, включающее клеточное отторжение или опосредуемое антителами отторжение. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем хроническое состояние представляет собой васкулопатию трансплантата. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем риск, ассоциированный с трансплантатом, указывает на тяжесть повреждения. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов или систем риск, ассоциированный с трансплантатом, представляет собой риск или статус инфекции. Риск у реципиента трансплантата может быть определен в качестве части любого из способов, предусматриваемых в настоящем описании.

Как используют в рамках изобретения, "трансплантат" относится к перемещению ткани или органа, или его части, от донора к реципиенту для замены поврежденной или отсутствующей ткани или органа, или его части. Трансплантат может представлять собой трансплантат одного органа или более одного органа. Примеры органов, которые могут быть трансплантированы, включают, но не ограничиваются ими, сердце, почку(и), почку, печень, легкое(ие), поджелудочную железу, кишечник и т.д. Любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, можно использовать для образца субъекта, подвергшегося трансплантации любой одной или нескольких тканей или органов, или их частей, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления трансплантат представляет собой трансплантат сердца.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система может включать сопоставление увеличения количества нуклеиновых кислот не субъекта или общих нуклеиновых кислот с увеличенным риском состояния, такого как отторжение трансплантата. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, сопоставление включает сравнение количества (например, концентрация, соотношение или процент) нуклеиновых кислот не субъекта с пороговой величиной для идентификации субъекта, имеющего увеличенный или сниженный риск состояния. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, субъекта, имеющего увеличенное количество нуклеиновых кислот не субъекта по сравнению с пороговой величиной, идентифицируют как имеющего увеличенный риск состояния. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, субъекта, имеющего сниженное или

сходное количество нуклеиновых кислот не субъекта по сравнению с пороговой величиной, идентифицируют как имеющего сниженный риск состояния.

Можно проводить мониторинг изменения количеств нуклеиновых кислот не субъекта с течением времени, и любые из способов или систем, описанных в настоящем описании, могут включать стадию его проведения. Это может позволить измерение изменений клинического состояния и/или позволить вычисление нормальных величин или исходных уровней. При трансплантации органов это может формировать основу индивидуализированного неинвазивного скринингового теста на отторжение или риск состояния, ассоциированного с ним. Как правило, как описано в настоящем описании, количество, такое как соотношение или процент, нуклеиновых кислот не субъекта может указывать на наличие или отсутствие риска, ассоциированного с состоянием, такого как риск, ассоциированный с трансплантатом, такой как отторжение, у реципиента, или может указывать на необходимость в дальнейшем тестировании или надзоре. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, способ или система, кроме того, может включать дополнительный тест(ы) для оценки состояния, такого как отторжение трансплантата, повреждение трансплантата и т.д., или стадию предложения такого дополнительного тестирования субъекту (или предоставления информации о таком дополнительном тестировании). Дополнительный тест(ы) может представлять собой любой из способов или систем, описанных в настоящем описании. Дополнительный тест(ы) может представлять собой любой из других способов или систем, описанных в настоящем описании или в ином случае известных в данной области, в зависимости от ситуации.

Любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, может включать стадию "определения режима лечения", которая относится к определению порядка действий для лечения субъекта. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, определение режима лечения включает определение надлежащей терапии или информации, касающейся надлежащей терапии, для предоставления субъекту. В любом из способов или систем, описанных в настоящем описании, определение может включать предоставление надлежащей терапии или информации, касающейся надлежащей терапии, субъекту. В некоторых вариантах осуществления терапия представляет собой проведение лечения против отторжения и/или лечения против инфекции. Как используют в рамках изобретения, информация, касающаяся лечения, или терапии, или мониторинга, может быть предоставлена в письменной форме или электронной форме. В некоторых вариантах осуществления информация может быть предоставлена в качестве машинно-читаемых инструкций. В некоторых вариантах осуществления информация может быть предоставлена устно.

"Проведение введения", или "введение", или "вводить" и т.п. означает предоставление материала субъекту способом, который является фармакологически полезным прямо или непрямо. Таким образом, этот термин включает указание, такое как назначение, для субъекта или другой стороны вводить материал. Проведение лечения или

терапии можно проводить любым способом, известным в данной области (см., например, Harrison's Principle of Internal Medicine, McGraw Hill Inc.). Предпочтительно, проведение лечения или терапии происходит в терапевтически эффективном количестве. Введение может быть локальным или системным. Введение может быть парентеральным (например, внутривенное, подкожное или внутривожное) или пероральным. Композиции для различных путей введения известны в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin).

В некоторых вариантах осуществления проводимое лечение против отторжения является иммуносупрессивным. Иммуносупрессивные средства включают, но не ограничиваются ими, кортикостероиды (например, преднизолон или гидрокортизон), глюкокортикоиды, цитостатические средства, алкилирующие средства (например, азотистые иприты (циклофосфамид), нитрозомочевину, соединения платины, циклофосфамид (Цитоксан)), антимаболиты (например, аналоги фолиевой кислоты, такие как метотрексат, аналоги пуринов, такие как азатиоприн и меркаптопурин, аналоги пиримидинов и ингибиторы синтеза белка), цитотоксические антибиотики (например, дактиномицин, антрациклины, митомицин С, блеомицин, митрамицин), антитела (например, моноклональные и поликлональные антитела против CD20, против IL-1, против IL-2/Ральфа, против Т-клеток или против CD-3, такие как Атгам и Тимоглобулин), лекарственные средства, действующие на иммуофилины, циклоспорин, такролимус, сиролимус, интерфероны, опиоиды, TNF-связывающие белки, микофенолат, финголимод и мириоцин. В некоторых вариантах осуществления терапия против отторжения включает переливание крови или трансплантацию костного мозга. Способы терапии также включают способы терапии для лечения системных состояний, таких как сепсис. Терапия сепсиса может включать внутривенные жидкости, антибиотики, хирургический дренаж, раннюю целенаправленную терапию (EGDT), сосудосуживающие средства, стероиды, активированный белок С, дротрекогин альфа (активированный), кислород и способы терапии для надлежащего поддержания дисфункции органов. Они могут включать гемодиализ при почечной недостаточности, механическую вентиляцию при легочной дисфункции, переливание продуктов крови и лекарственное средство и жидкостную терапию против недостаточности кровообращения. Обеспечение надлежащего питания - предпочтительно путем кишечного кормления, однако при необходимости парентеральное питание, - также может быть включено, в частности, в ходе длительного заболевания. Другие ассоциированные способы терапии могут включать инсулин и медикаментозные средства для предупреждения глубокого тромбоза вен и язв желудка.

В некоторых вариантах осуществления, когда присутствует инфекция, способы терапии для лечения реципиента трансплантата также включают способы терапии для лечения бактериальной, грибковой и/или вирусной инфекции. Такие способы терапии включают антибиотики. Другие примеры включают, но не ограничиваются ими, амебицидные средства, аминогликозиды, противогельминтные средства, противогрибковые средства, противогрибковые средства на основе азолов, эхинокандины,

полиены, диарилхинолины, производные гидразидов, производные никотиновой кислоты, производные рифамицина, производные стрептомицет, противовирусные средства, антагонист рецептора хемокина, ингибитор переноса цепи интегразы, ингибиторы нейраминидазы, NNRTI, ингибиторы NS5A, ингибиторы обратной транскриптазы нуклеозидов (NRTI), ингибиторы протеаз, пуриновые нуклеозиды, карбапенемы, цефалоспорины, глицилглицины, лепростатики, производные линкомицина, макролидные производные, кетолиды, макролиды, оксазолидиноновые антибиотики, пенициллины, ингибиторы бета-лактамазы, хинолоны, сульфонамиды и тетрациклины. Другие такие способы терапии известны средним специалистам в данной области. Любые из способов, описанных в настоящем описании, могут включать введение или предложение средства против инфекции субъекту (включая предоставление информации о лечении субъекту в некоторых вариантах осуществления). В некоторых вариантах осуществления лечение против инфекции может представлять собой уменьшение количества или частоты иммуносупрессивной терапии или изменение иммуносупрессивной терапии, которую проводят субъекту. Другие способы терапии известны средним специалистам в данной области.

Любой из способов или систем, описанных в настоящем описании, может включать стадию "определения режима мониторинга", которая относится к определению порядка действий для мониторинга состояния у субъекта с течением времени. В одном варианте осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, определение режима мониторинга включает определение надлежащего порядка действий для определения количества нуклеиновых кислот у субъекта с течением времени или в последующий момент времени, или предложение такого мониторинга индивидууму. Это может позволить определение изменений клинического состояния и/или позволить вычислить нормальные величины или исходные величины (а также сравнение с ними). В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, определение режима мониторинга включает определение времени и/или частоты получения образцов от субъекта.

Как используют в рамках изобретения образец от индивидуума может представлять собой биологический образец. Примеры таких биологических образцов включают цельную кровь, плазму, сыворотку, мочу и т.д. В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, можно проводить добавление дополнительных нуклеиновых кислот, например, стандарта, в образец.

В любом из способов или систем, описанных в настоящем описании, количества аллелей можно определять посредством секвенирования, такого как секвенирование последнего поколения или высокопроизводительное секвенирование, и/или способа генотипирования. Примеры способов секвенирования последнего поколения и высокопроизводительного секвенирования и/или генотипирования включают, но не ограничиваются ими, массивно-параллельное опознавательное секвенирование, полони-секвенирование, пиросеквенирование 454, секвенирование Illumina (Solexa),

секвенирование SOLiD, ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование с наносферами с ДНК, секвенирование единичных молекул heliscope, секвенирование единичных молекул в реальном времени (SMRT), MassARRAY® и Digital Analysis of Selected Regions (DANSR™) (см., например, Stein RA (1 September 2008). "Next-Generation Sequencing Update". Genetic Engineering & Biotechnology News 28 (15); Quail, Michael; Smith, Miriam E; Coupland, Paul; Otto, Thomas D; Harris, Simon R; Connor, Thomas R; Bertoni, Anna; Swerdlow, Harold P; Gu, Yong (1 January 2012). "A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion torrent, pacific biosciences and illumina MiSeq sequencers". BMC Genomics 13 (1): 341; Liu, Lin; Li, Yinhu; Li, Siliang; Hu, Ni; He, Yimin; Pong, Ray; Lin, Danni; Lu, Lihua; Law, Maggie (1 January 2012). "Comparison of Next-Generation Sequencing Systems". Journal of Biomedicine и Biotechnology 2012: 1-11; качественное и количественное генотипирование с использованием удлинения праймером на одно основание, сопряженное с времяпролетной масс-спектрометрией с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MassARRAY®). Methods Mol Biol. 2009;578:307-43; Chu T, Bunce K, Hogge WA, Peters DG. A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma. Prenat Diagn 2010;30:1226-9; и Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. Clinica chimica acta; International Journal of Clinical Chemistry 2008;387:55-8). В некоторых вариантах осуществления такие способы также можно использовать для определения генотипа.

В любом из способов или систем, описанных в настоящем описании, количества аллелей можно определять способом амплификации, таким как способ, как описано в настоящем описании или в публикации США № WO 2016/176662. Любой из таких способов включен в настоящее описание.

В некоторых вариантах осуществления любого из способов, описанных в настоящем описании, амплификацию проводят с использованием ПЦР, такой как количественная ПЦР, что означает, что можно определять количества нуклеиновых кислот. Количественная ПЦР включает ПЦР в реальном времени, цифровую ПЦР, TAQMAN™ и т.д. В некоторых вариантах осуществления любого из способов или систем, описанных в настоящем описании, ПЦР представляет собой "ПЦР в реальном времени". Такая ПЦР относится к реакции ПЦР, где можно проводить мониторинг кинетики реакции в жидкой фазе, в то время как процесс амплификации все еще продолжается. В противоположность общепринятой ПЦР, ПЦР в реальном времени обеспечивает возможность одновременного выявления или количественного определения в реальном времени. Исходя из увеличения интенсивности флуоресценции конкретного красителя, концентрацию мишени можно определять даже до достижения амплификацией ее плато. В некоторых вариантах осуществления любого из предусматриваемых способов ПЦР представляет собой цифровую ПЦР.

Реализация системы

В соответствии с одним аспектом предусматривается система для вычисления

качественных показателей на образце, взятом от индивидуума, такого как реципиент трансплантата. Различные варианты осуществления любой из систем организованы для идентификации образцов, имеющих свойства более высокого или более низкого риска в результате анализа геномных данных, полученных от субъекта. На фиг.3 проиллюстрирована одна иллюстративная система 300 для идентификации таких образцов и профиля риска. В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем, система может быть организована для анализа образца прямо или данных, касающихся образца, для обеспечения "количественного генотипирования" (qGT). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем, система осуществляет количественное генотипирование, в котором используются стандартные кривые источников гетерозиготной ДНК для количественного определения аллелей А и В в каждой мишени. Следующие варианты осуществления любой из систем выполняют процедуры контроля качества для оценки каждой стандартной кривой и амплификации образца в соответствии с критериями приемлемости. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем система может быть организована для классификации данных, которые удовлетворяют процедурам контроля в качестве поддающихся количественному определению мишеней, и выполняет алгоритмы интерпретации на данных, качество которых контролируют.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем контроль качества основан на конкретных критериях приемлемости, которые могут включать анализ любого одного или нескольких и любой комбинации следующих: историческая форма кривой амплификации, специфичность анализа с использованием аллель-специфической ПЦР в отношении второго аллеля, величины C_p или C_t , эффективность ПЦР, отношение сигнала к шуму, наклон и χ^2 стандартных наборов кривых, не амплификацию контролей или контаминацию отрицательных контролей.

В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем система включает компонент 302 контроля качества, который выполняет анализ и/или описанные алгоритмы для идентификации поддающихся количественному определению мишеней.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем, система (например, 300) обеспечивает первичный анализ генотипа. Например, система сначала может оценивать геномы реципиента (или субъекта) и донора (или не субъекта) для "базового генотипирования" (bGT). Способ bGT присваивает обозначения для трех возможных генотипов донора (или не субъекта) и/или реципиента (или субъекта) по каждой мишени (например, гомозиготный AA, гетерозиготный АВ, и гомозиготный ВВ). В соответствии с различными вариантами осуществления любой из систем, эта информация используется системой при интерпретации qGT по мишеням. В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем, система 300 может включать генотирующий компонент 304, организованный для анализа вклада генотипа донора (или не субъекта) и/или реципиента (или субъекта) в образец по конкретным мишеням. В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем, идентификация

генотипа по каждой системе позволяет системе распознавать информативные мишени, такие как полностью и/или наполовину информативные, исходя из генотипа.

Например, система может быть организована для определения информативных мишеней как мишени, где известно, что реципиент (или субъект) является гомозиготным, и донор (или не субъект) имеет другой генотип. В одном примере система идентифицирует информативные мишени, хранит информацию о соответствующих мишенях, которые информативны, и включает обозначения для донора и/или реципиента и результат анализа генотипа обоих из них.

В соответствии с другим вариантом осуществления любой из систем, генотирующий компонент (например, 304) обозначает мишени донора (или не субъекта) и/или реципиента (или субъекта) для анализа информативных мишеней. В другом примере система организована для идентификации информативной мишени, где донор (или не субъект) является гомозиготным по другому аллелю (отличному от гомозиготного реципиента (или субъекта)). В следующих вариантах осуществления любой из систем генотирующий компонент может быть организован для классификации соответствующих мишеней в качестве полностью информативных или наполовину информативных в результате анализа наблюдаемых соотношений аллелей.

В этом примере мишень обозначают как полностью информативная и наблюдаемое соотношение приблизительно равно общему уровню донорской cf-ДНК (или cf-ДНК не субъекта). В следующих примерах случаи идентифицируют посредством системы, где донор (или не субъект) является гетерозиготным и реципиент (или субъект) является гомозиготным, и мишень определяют как полуинформативная (поскольку присутствует вклад как аллеля А, так и аллеля В). Для полуинформативных мишеней система организована так, чтобы вносить поправку в измеренный вклад. Например, в результате определения того, что мишень является полуинформативной, измеренный вклад может быть удвоен. В других вариантах осуществления может быть выполнена более тонкая коррекция. Например, соотношения cf-ДНК донора и cf-ДНК реципиента могут быть выражены в качестве процентов. Процентную величину можно использовать для коррекции измеренного вклада соответствующим образом. В другом примере коррекция измеренного вклада может быть основана на статистической изменчивости, среди прочих возможностей.

В соответствии с различными вариантами осуществления любой из систем, система организована для обеспечения срединного значения соотношений и процентов информативных и прошедших контроль качества аллелей и вывода срединного значения в качестве процента внеклеточной ДНК донора (или cf-ДНК не субъекта). Система может быть организована для сообщения срединного значения соотношений информативных и прошедших контроль качества аллелей и вывода срединного значения процента внеклеточной ДНК донора для повышения надежности вычисленных результатов. В некоторых реализациях любой из систем система включает компонент генотипирования (например, 304), организованный для обозначения мишеней донора (или не субъекта)

и/или реципиента (или субъекта), и внесения поправки в любой измеренный вклад при необходимости.

В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем выполняемый системой процесс qGT генерирует по меньшей мере два показателя качества (например, оценка полезности величины), достоверный коэффициент вариаций (rCV) и dQC. Например, система может быть организована для вычисления регуляризованного rCV с использованием распределения информативных и поддающихся количественному определению мишеней.

В одном подходе вычисляют робастное стандартное отклонение (rSD) в качестве срединного абсолютного отклонения от срединной доли минорного типа, масштабированного с использованием коэффициента нормализации (например, 1,4826). rSD можно конвертировать в коэффициент вариаций делением на % cf-ДНК донора (или % cf-ДНК не субъекта) после регуляризации путем добавления величины стаба (например, четверть одного процента). Величина стаба может вноситься системой, чтобы избежать нестабильности у делителя нуля, и включает в различных примерах небольшую величину для обеспечения ненулевого делителя. В различных вариантах осуществления система может быть организована для распределения проанализированных мишеней вокруг их медианы с использованием rCV. Это позволяет системе определять rCV в качестве меры точности или качества образца. Система может быть организована для применения меры качества образца для идентификации нормальных образцов. В некоторых примерах пригодные образцы могут иметь rCV ниже 50%. Результат увеличенной меры качества обеспечивает повышение детекции аномалий в образце, а также улучшение детекции неблагоприятного состояния относительно общепринятых подходов.

В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем, система 300 может включать аналитический компонент 306, организованный для вычисления различных мер качества на данных образца (включая, например, скорректированные данные образца на основе генотипа). В одном примере аналитический компонент организован для вычисления rSD, rCV и dQC, чтобы убедиться в стабильности образца и в том, что не произошла контаминация образца.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем, система определяет величину dQC для обеспечения проверки качества дискордантности: система организована для оценки усредненной доли минорного аллеля гомозиготных и неинформативных мишеней пациента в качестве защиты от перепутывания и контаминации образцов. Величины "dQC" теоретически должны считывать практически ноль процентов с учетом шума от неспецифических аллелей. Если произошло перепутывание образцов в ходе сбора или переработки, используются неправильные генотипы реципиента и тест dQC, выполняемый системой, сразу выделяет вплоть до 50 или 100% данных как предположительные неинформативные мишени. Следующие варианты осуществления любой из систем осуществляют анализ dQC для идентификации контаминации образца и геномной нестабильности в образце. Система может быть

установлена на величину по умолчанию для идентификации данных в качестве полезных образцов, когда вычисленная величина dQC снижается ниже, например, 0,5%. Можно устанавливать другие пороговые значения (например, <1%, 2%, 0,3%, 0,4%, 0,6%, и т.д.). Следующие иллюстративные пороговые значения включают 1%, 5%, 10% или 50%. В различных вариантах осуществления любой из систем выполнение фильтрации dQC улучшает детекцию контаминации и/или детекцию геномной нестабильности относительно общепринятых подходов.

В следующем аспекте (или в следующих вариантах осуществления любой из других предусматриваемых систем), предусматривается система, организованная с использованием способов имитации генотипа донора (или не субъекта), а затем в некоторых вариантах осуществления вычисления донорной cf-ДНК (или cf-ДНК не субъекта) (или она может быть организована таким образом). Например, если генотип донора (или не субъекта) не доступен, система все еще может вычислять cf-ДНК донора (или cf-ДНК не субъекта) на основе имитации данных о генотипе донора (или не субъекта). Имитация генотипа донора (или не субъекта) позволяет системе (например, 300) определить возможный генотип донора (или не субъекта) и диапазоны возможных исходов qGT. В соответствии с различными вариантами осуществления любой из систем, система организована для генерирования полностью случайных генотипов и выполнения статистических вычислений для идентификации более вероятных не собственных генотипов. Система может повторять случайное генерирование генотипов с применением предпочтения аллелей, которые явно заметны.

В соответствии с различными вариантами осуществления любой из систем, система (например, 300) организована для выполнения способа имитации для вычисления cf-ДНК донора (или cf-ДНК не субъекта), когда генотип донора не доступен. С использованием генотипов только реципиентов и результатов qGT система оценивает возможности для донора (или не субъекта) с использованием имитации Монте-Карло. Например, предварительная случайная селекция при имитациях определяет, какой общий результат может отражать данная выборка qGT. Статистический анализ данных имитации посредством системы позволяет установить возможные генотипы донора (или не субъекта). Система также может быть организована для выполнения вторичных имитаций Монте-Карло для исследования вероятного пространства генотипа донора (или не субъекта) и обеспечивает диапазон возможных исходов qGT. В соответствии с одним примером, каждая из пятидесяти тысяч имитаций, выполняемых системой, сообщает триплет срединного уровня cf-ДНК донора (или cf-ДНК не субъекта), rCV и dQC, создавая трехмерное облако точек. При последующей обработке не системе облако точек пересекается на нижнюю треть dQC и rCV и оставшийся "квадрант" означает имитации, соответствующие реалистичному и чистому образцу. Центральные 95% сигналов cf-ДНК донора (или cf-ДНК не субъекта) могут обеспечивать результат "способа 2" для qGT без наличия генотипа донора (или не субъекта) в некоторых вариантах осуществления. В других вариантах осуществления может выполняться меньшее количество имитаций

(например, десять тысяч, двадцать тысяч, тридцать тысяч и т.д.) или может выполняться большее количество имитаций (например, шестьдесят тысяч, семьдесят тысяч и т.д.) для установления величин для обработки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем, дополнительные вычисления могут использоваться для уточнения имитаций генотипов и полученных прогнозирований генотипа донора.

Различные аспекты и функции, описанные в настоящем описании (например, выполнение основных алгоритмов генотипирования, специализированных алгоритмов генотипирования, неспецифических алгоритмов генотипирования, алгоритмов qGT, манипулирование зарегистрированными данными для образца для преобразования результатов для образца (например, в генотипические величины нормализованного вида), алгоритмы "без донора (или не субъекта)", алгоритмы (повторной) имитации, имитации Монте-Карло, и т.д.), можно осуществлять в качестве специализированных аппаратных или программных компонентов, выполняемых в одной или нескольких специально организованных вычислительных системах (например, сетевые устройства, персональные компьютеры, рабочие станции, базовые компьютеры, сетевые клиенты, серверы, медиасерверы, серверы приложений, серверы баз данных, веб-серверы, мобильные вычислительные устройства (например, смартфоны, планшетные компьютеры и персональные цифровые помощники) и сетевом оборудовании (например, распределители нагрузки, роутеры и переключатели)). Кроме того, аспекты могут располагаться на одной компьютерной системе или могут быть распределены по множеству компьютерных систем, подсоединенных к одной или нескольким коммуникационным сетям.

Например, различные аспекты, функции, компоненты системы и процессы (например, компонент контроля качества, компонент генотипирования и аналитический компонент) могут находиться на одной компьютерной системе или могут быть распределены на одной или нескольких компьютерных системах (включая облачные ресурсы), специально организованных для предоставления сервиса одному или нескольким клиентским компьютерам или могут быть специально организованы для выполнения общей задачи в качестве части распределенной системы, такой как компьютерная система 400, представленная на фиг.4. Следовательно, варианты осуществления не ограничиваются выполнением на конкретной системе или группе систем. Кроме того, аспекты, функции и процессы могут быть выполнены в программных средствах, аппаратных компонентах или встроенных программах, или любой их комбинации. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления любой из систем, компьютерная система 400 может быть подсоединена к другим системам для обработки образцов тканей и/или крови для получения величин cf-ДНК или для анализа величин, полученных для одного и того же образца, для определения качества образца, контаминации, здоровья и/или жизнеспособности, среди других возможностей.

Ссылаясь на фиг.4, на ней проиллюстрирована блок-схема распределенная вычислительная система 400 специального назначения, в которой применяются на практике различные аспекты и функции изобретения. Как показано, распределенная

вычислительная система 400 включает одну или несколько вычислительных систем, которые обмениваются информацией. Более конкретно, распределенная вычислительная система 400 включает вычислительные системы 402, 404 и 406. Как показано, вычислительные системы 402, 404, и 406 соединены между собой и могут обмениваться данными через коммуникационную сеть 408. Сеть 408 может включать любую коммуникационную сеть, через которую компьютерные системы могут обмениваться данными. Для обмена данными с использованием сети 408 в компьютерных системах 402, 404 и 406 и сети 408 могут использоваться различные способы, протоколы и стандарты, включающие, среди прочих, волоконный канал, маркерное кольцо, сеть Ethernet, беспроводная сеть Ethernet, Bluetooth, IP, IPV6, TCP/IP, UDP, DTN, HTTP, FTP, SNMP, SMS, MMS, SS4, JSON, SOAP, CORBA, REST и Web-сервисы. Чтобы убедиться, что перенос данных является безопасным, вычислительные системы 402, 404 и 406 могут передавать данные через сеть 408 с использованием различных мер безопасности, включая, например, технологии SSL или VPN. В то время как распределенная вычислительная система 400 иллюстрирует три сетевых вычислительных системы, распределенная вычислительная система 400 не ограничивается таким образом и может включать любое количество вычислительных систем и вычислительных устройств, подключенных к сети с использованием любого средства и коммуникационного протокола.

Как проиллюстрировано на фиг.4, вычислительная система 402 включает процессор 410, память 412, соединительный элемент 414, интерфейс 416 и элемент 418 хранения данных. Для реализации по меньшей мере некоторых из аспектов, функций и процессов, описанных в настоящем описании, процессор 410 выполняет серию инструкций по оперированию данными. Процессор 410 может представлять собой любой тип процессора, мультипроцессора или контроллера. Иллюстративные процессоры могут включать коммерчески доступный процессор. Процессор 410 подсоединен к другим компонентам системы, включая одно или несколько устройств памяти 412, посредством соединительного элемента 414.

Память 412 хранит программы (например, последовательности инструкций, кодируемых для выполнения процессором 410) и данные в ходе работы вычислительной системы 402. Таким образом, память 412 может представлять собой относительно высокоэффективную переменную память с произвольным доступом, такую как динамическая память с произвольным доступом ("DRAM") или статическая память ("SRAM"). Однако память 412 может включать любое устройство для хранения данных, такое как дисковод или устройство долговременного запоминания. В различных примерах память 412 может быть организована в виде специализированных и в некоторых случаях уникальных структур для выполнения функций, описанных в настоящем описании. Эти структуры данных могут быть отсортированы по размеру и организованы для хранения величин для конкретных данных и типов данных.

Компоненты вычислительной системы 402 соединены соединительным элементом,

таким как соединительный элемент 414. Соединительный элемент 414 может включать любое коммуникационное соединение между компонентами системы, такое как одна или несколько физических шин в соответствии со специализированными или стандартными технологиями шинного соединения вычислительной техники. Соединительный элемент 414 обеспечивает коммуникации, включая инструкции и данные, для обмена между системными компонентами вычислительной системы 402.

Вычислительная система 402 также включает одно или несколько устройств 416 интерфейса, таких как устройства ввода, устройства вывода и комбинированные устройства ввода/вывода. Устройства интерфейса могут принимать вводную информацию или предоставлять выводную информацию. Более конкретно, устройства ввода могут сообщать информацию для внешнего представления. Устройства ввода могут принимать информацию от внешних источников. Примеры устройств интерфейса включают клавиатуры, мыши, трекболы, микрофоны, сенсорные панели, устройства печати, экраны просмотра, динамики, платы сетевых интерфейсов и т.д. Устройства интерфейса позволяют компьютерной системе 402 обмениваться информацией и коммуницироваться с внешними объектами, такими как пользователи и другие системы.

Элемент 418 хранения данных включает машинно-считываемый и перезаписываемый, или непреходящий носитель хранения данных, в котором хранятся инструкции, которые определяют программу или другую задачу, которая выполняется процессором 410. Элемент 418 хранения данных также может включать информацию, которая записана на или в носителе и которая обрабатывается процессором 410 в ходе выполнения программы. Инструкции могут постоянно храниться в качестве закодированных сигналов и инструкции могут обеспечивать выполнение процессором 410 любой из функций, описанных в настоящем описании. Носитель может представлять собой, например, оптический диск, магнитный диск или флэш-память, среди прочих. В ходе работы процессор 410 или некоторый другой контроллер обеспечивает считывание данных и носителем долговременной памяти в другую память, такую как память 412, которая позволяет более быстрый доступ к информации процессором 410, чем носитель хранения, включенный в элемент 418 хранения данных. Память может находиться в элементе 418 хранения данных или в памяти 412, однако процессор 410 манипулирует данными в памяти, а затем копирует данные в носитель хранения, ассоциированный с элементом 418 хранения данных после завершения обработки. Различные компоненты могут управлять перемещением данных между носителем хранения и другими элементами памяти, и примеры не ограничиваются конкретными компонентами управления данными. Кроме того, примеры не ограничиваются конкретной системой памяти или системой хранения данных.

Хотя вычислительная система 402 в качестве примера одного типа компьютерной системы, на которой могут применяться на практике различные аспекты и функции, аспекты и функции не ограничиваются осуществлением на компьютерной системе 402, как показано на фиг.4. Различные аспекты и функции можно применять на практике на

одном или нескольких компьютерах, имеющих архитектуру и компоненты, отличные от тех, что представлены на фиг.4.

Вычислительная система 402 может представлять собой вычислительную систему, включающую операционную систему, которая управляет по меньшей мере частью аппаратных элементов, включенных в вычислительную систему 402. Процессор 410 и операционная система вместе могут определять вычислительную платформу, для которой написано прикладное программное обеспечение на языках программирования высокого уровня. Кроме того, различные аспекты и функции могут быть выполнены в непрограммной среде. Например, документы, созданные в HTML, XML или других форматах, когда их просматривают в окне программы браузера, могут обеспечивать аспекты графического пользовательского интерфейса или выполнять другие функции. Кроме того, различные примеры могут быть выполнены в качестве программных или непрограммных элементов, или любой их комбинации.

ПРИМЕР

Всего 298 образцов от 87 уникальных субъектов-реципиентов трансплантатов, как взрослых, так и педиатрических, удовлетворяли стандартам контроля качества (QC) и были доступны для анализа. Один индивидуум участвовал в испытании как после первоначальной трансплантации, так и после ретрансплантации, и его анализировали как двух уникальных субъектов, учитывая две уникальных не совпадающих ДНК донор/реципиент. Средний возраст пациентов при трансплантации составил 7,9 +/- 7,5 года (диапазон от 0,03 до 24,2 года); средний возраст при взятии образца крови составил 12,7 +/- 8,1 года (диапазон от 0,08 до 30,2 года); 59,6% (51/87) субъектов были мужского пола и 65,5% (57/87) были белыми. Среднее время от трансплантации до взятия образца крови составило 4,8 +/- 4,2 года.

Корреляция между донорской фракцией и степенью клеточного отторжения в ассоциированных с биопсией образцах крови

Проводили взятие всего 158 образцов в пределах 24 часов перед ЕМВ, и их включали в анализ. Только один образец был ассоциирован с каждым биоптатом. Результаты обобщенно представлены в **таблице 1**. 134 биоптата были степени CR0, 21 биоптат были степени CR1, и 3 биоптата были степени CR2.

Когда генотип донора был известен для анализа, было обнаружено, что средняя фракция донорской cf-ДНК составляла 0,11% (IQR 0,06-0,21%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR0, 0,37% (IQR 0,15-0,72%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR1, и 0,97% (IQR 0,88-1,06%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR2 ($p=0,027$). Эмпирическая оптимальная точка отсечения для исключения отторжения степени CR2 на основе ассоциированной кривой ROC представляла собой 0,87% [95% CI 0,78-0,97% ($p=0,009$)]. PPV составлял 13,4% (7,6, 22,6) и NPV составлял 100%. Графическое представление данных представлено на **фиг.1А**.

Когда генотип донора был неизвестен, средняя фракция донорской cf-ДНК

составляла 0,25% (IQR 0,17-0,39%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR0, 0,89% (IQR 0,44-5,35%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR1, и 1,22% (IQR 1,04-5,18%) в образцах, ассоциированных с биоптатами степени CR2 ($p < 0,001$). Эмпирическая оптимальная точка отсечения для исключения отторжения степени CR2 на основе ассоциированной кривой ROC составляла 0,89% [95% CI 0,46-1,70% ($p = 0,725$)]. PPV составляла 15% (3,21-37,9) и NPV составляла 100% (97,4, 100). Графическое представление данных приведено на **фиг.1В**.

Таблица 1. Донорская фракция и степень клеточного отторжения

	Степень отторжения			Нулевая гипотеза*	Статистический критерий
	CR0	CR1	CR2		
	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]		
N	134	21	3		
С генотипом донора	0,11 [0,06, 0,21]	0,37 [0,15, 0,72]	0,97 [0,88, 1,06]	$p = 0,027$	Критерий срединного значения независимых выборок
Без генотипа донора					
Усредненное значение	0,25 [0,17, 0,39]	0,89 [0,44, 5,35]	1,22 [1,04, 5,18]	$p < 0,001$	Критерий срединного значения независимых выборок

* Нулевая гипотеза: срединные значения являются одинаковыми среди категорий степени отторжения (CR0 против CR1 против CR2)

139 образцов были ассоциированы с биоптатами, для которых сообщалось присутствие или отсутствие очагов Quilty (121 нет, 18 да). Корреляции между фракциями донорской cf-ДНК обобщенно представлены в **таблице 2**.

Когда генотип донора был известен для анализа, средняя фракция донорской cf-ДНК составляла 0,12% (IQR 0,07-0,32%) в образцах, ассоциированных с биоптатами, негативными по очагам Quilty, и 0,10% (IQR 0,06-0,19%) в образцах, ассоциированных с биоптатами, положительными по очагам Quilty ($p = 0,738$).

Когда генотип донора был неизвестен, средняя фракция донорской cf-ДНК составила 0,28% (IQR 0,18-0,53%) в образцах, ассоциированных с биоптатами,

негативными по очагам повреждения Quilty, и составила 0,21% (IQR 0,15-0,27%) в образцах, ассоциированных с биоптатами, положительными по очагам повреждения Quilty ($p=0,03$).

Таблица 2. Донорская фракция и присутствие очагов Quilty

	Очаги повреждения Quilty		Нулевая гипотеза*	Статистический критерий
	Нет	Да		
	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]		
N	121	18		
С генотипом донора	0,12 [0,07, 0,32]	0,10 [0,06, 0,19]	$p=0,738$	Критерий срединного значения независимых выборок
Без генотипа донора				
Усредненное значение	0,28 [0,18, 0,53]	0,21 [0,15, 0,27]	$p=0,03$	Критерий срединного значения независимых выборок

* Нулевая гипотеза: срединные значения являются одинаковыми для наличия/отсутствия очагов повреждения Quilty (нет против да)

Корреляция с васкулопатией коронарных артерий после трансплантации (CAV)

Проводили взятие 116 образцов крови в пределах 24 часов перед селективной ангиографией коронарных артерий. Из них 11 продемонстрировали васкулопатию трансплантата, как определено с использованием системы оценки 2010 ISHLT (Mehra et al., J Heart Lung Transplant 29, 717-727 (2010)), и 99 продемонстрировали отсутствие васкулопатии трансплантата. Сравнение фракций донорской cf-ДНК среди ассоциированных с ангиографией образцов обобщенно представлено в **таблице 3**.

Когда генотип донора был известен для анализа, средняя донорская фракция составила 0,09% (IQR 0,06-0,20%) для образцов, не ассоциированных с CAV, и 0,47% (IQR 0,27-0,71%) для образцов, ассоциированных с CAV ($p=0,05$). Mehra, M.R., et al. International Society for Heart and Lung Transplantation working formulation of a standardized nomenclature for cardiac allograft vasculopathy-2010. J Heart Lung Transplant 29, 717-727 (2010). Эмпирическая оптимальная точка отсечения для исключения CAV составила 0,19% [95% CI 0,09-0,38% ($p<0,001$)]. Графическое представление данных приведено на **фиг.2А**.

Когда генотип донора был неизвестен для анализа, средняя донорская фракция составила 0,27% (IQR 0,16-0,52%) для образцов, не ассоциированных с CAV, и 0,55% (IQR 0,38-1,22%) для образцов, ассоциированных с CAV ($p=0,057$). Эмпирическая

оптимальная точка отсечения для исключения САV составила 0,37% [95% CI 0,24-0,57% (p<0,001)]. Графическое представление данных приведено на **фиг.2В**.

Таблица 3. Донорская фракция и васкулопатия коронарных артерий при трансплантации

	Васкулопатия трансплантата			Нулевая гипотеза*	Статистический критерий
	Без САД	GV	Без биопсии или ангиографии		
	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]		
N	99	11	155		
С генотипом донора	0,09 [0,06, 0,20]	0,52 [0,33, 0,88]	0,32 [0,14, 0,87]	p=0,028	Критерий срединного значения независимых выборок
Без генотипа донора					
Усредненное значение	0,27 [0,16, 0,54]	0,55 [0,38, 1,22]	0,057	p=0,057	Критерий срединного значения независимых выборок

* Нулевая гипотеза: срединные значения являются одинаковыми среди отсутствия САД и GV (отсутствие САД против GV)

Корреляция с опосредуемым антителами отторжением (AMR)

142 образцов были ассоциированы с биоптатами, анализированными в отношении опосредуемого антителами отторжения (AMR). 132 образца были определены как рAMR0 и 3 были определены как степень рAMR 1 или 2. Сравнение донорских фракций cf-ДНК среди образцов AMR обобщенно представлено в **таблице 4**.

Когда донорский генотип был известен для анализа, средняя донорская фракция составила 0,12% (IQR 0,07-0,29%) для образцов, ассоциированных с рAMR0, и составила 0,26% (IQR 0,09-0,33%) для образцов, ассоциированных со степенью рAMR1 или 2 (p=0,905).

Когда донорский генотип был неизвестен для анализа, средняя донорская фракция

составила 0,29% (IQR 0,18-0,61%) для образцов, ассоциированных со степенью рAMR0, и составила 0,39 (IQR 0,12-0,44%) для образцов, ассоциированных со степенью рAMR1 или 2 ($p=0,969$). Эмпирическая оптимальная точка отсечения для исключения рAMR1 или 2 на основе ассоциированной кривой ROC составила 0,38% [95%CI 0,19-0,74% ($p=0,005$)].

Таблица 4. Донорская фракция и опосредуемое антителами отторжение

	Степень опосредуемого антителами отторжения		Нулевая гипотеза*	Статистический критерий
	0	1 или 2		
	Срединное значение [IQR]	Срединное значение [IQR]		
N	132	3		
С генотипом донора	0,12 [0,07, 0,29]	0,26 [0,09, 0,33]	$p=0,905$	Критерий срединного значения независимых выборок
Без генотипа донора				
Усредненное значение	0,29 [0,18, 0,61]	0,39 [0,12, 0,44]	$p=0,969$	Критерий срединного значения независимых выборок

* Нулевая гипотеза: срединные значения являются одинаковыми среди групп по лечению инфекции (0 против 1 или 2)

Обсуждение

Было обнаружено, что направленный высокопроизводительный анализ для количественного определения донорской cf-ДНК обладает исключительной чувствительностью, например, для отслеживания отторжения у реципиентов трансплантата сердца, и что выраженное повышение донорской фракции коррелирует со значительным повреждением аллотрансплантата, включая острое эпизодическое отторжение и хроническое отторжение в форме васкулопатии коронарных артерий трансплантата. В частности, эмпирическая оптимальная точка отсечения 0,87% (95% CI 0,78-0,97%) достоверно отличала CR0 и CR1 от отторжения степени CR2. Однако донорская фракция тотальной cf-ДНК не отличалась для очагов Quilty.

Донорская cf-ДНК уникально пригодна в качестве биомаркера в области трансплантологии, учитывая генетические различия между донором и реципиентом. Эта область значительно прогрессировала с первого отчета 1998 года, когда обнаруживалось присутствие Y-хромосомы в сыворотке реципиентов женского пола (Lo et al., Lancet 351: 1329-1330 (1998)).

Использование донорской cf-ДНК является перспективным для значительного

снижения необходимости в биопсии отслеживания и, по существу, позволяет более частый мониторинг отторжения. Как заметная чувствительность анализа в отношении обнаружения раннего отторжения, так и тот факт, что его можно использовать при более высокой частоте, чем ЕМВ или другую биопсию, позволят клиницистам частый неинвазивный мониторинг, что может привести как снижению травмы у пациента, так и более раннему и более эффективному обнаружению отторжения и/или других клинически значимых событий. Кроме того, донорская cf-ДНК может способствовать пониманию гистопатологических паттернов реципиентов трансплантатов сердца. Данные о том, что пациенты с очагами повреждения Quilty и без них имели сходные уровни донорской cf-ДНК служат в поддержку того, что это патологическое открытие может не отражать повреждение донорского органа, как предполагали другие (Gopal et al., Pathol Int 48: 191-198 (1998)). Неожиданно, данные продемонстрировали пошаговое статистически значимое отличие в уровнях донорской cf-ДНК при сравнения клеточных степеней CR0 с CR1 с CR2. Этот результат был неожиданным и предполагает поддающуюся измерению линейную взаимосвязь между уровнями донорской cf-ДНК и прогрессирующим повреждением донорского органа.

Материалы и способы

Показатели и определения

Регистрировали рост и вес каждого субъекта в момент трансплантации и длительность пребывания. Лечение отторжение определялось как изменение иммуносупрессивных лекарственных средств с целью лечения отторжения аллотрансплантата, как документировано в медицинском отчете, и начало лечения отторжения регистрировали в качестве даты и времени, когда это изменение медикаментозного лечения впервые было проведено для индивидуума. Доказанное с помощью биопсии клеточное отторжение определяли как ISHLT степени 2 или клеточное отторжение более высокой степени. Доказанное с помощью биопсии опосредуемое антителами отторжение определяли как ISHLT степени 1 или более высокое AMR. Механическое вспомогательное кровообращение определяли как либо временное, либо длительное желудочковое вспомогательное устройство, аортальный баллонный насос или экстракорпоральное вспомогательное кровообращение. Если у субъекта была диагностирована злокачественная опухоль или лимфопролиферативное заболевание после трансплантации, или если он становился беременным, регистрировали первые даты диагноза, поскольку эти состояния вносят источник искажения в виде дополнительной "не собственной" внеклеточной ДНК в сыворотку реципиента. Патологические отчеты всех биоптатов были рассмотрены, и была зарегистрирована степень 2004 ISHLT, а также мнение о наличии очагов Quilty. Результаты коронарной ангиографии, если ее проводили в пределах 24 часов перед взятием образцов крови, регистрировали в соответствии с системой оценки 2010 ISHLT (Mehra et al., J Heart Lung Transplant 29: 717-727 (1998)).

Образцы крови получали от реципиентов трансплантатов сердца по следующим клиническим сценариям: дни 1, 4, 7 и 28 после трансплантации, в пределах 24 часов перед

какой-либо ЕМВ, и непосредственно перед, а затем через 1, 4, 7 и 28 дней после начала лечения отторжения.

Средние общие уровни cf-ДНК и интерквартильные размахи (IQR) сообщались в нг/дл и средние процентные уровни донорской cf-ДНК и IQR сообщались в качестве доли от общего. Критерий средних значений независимой выборки использовали для равнения донорской фракции (процентная донорская cf-ДНК) и общая cf-ДНК (нг/мл плазмы) среди протестированных клинических переменных.

Критерии исключения

При определении чувствительности и специфичности биомаркера в отношении детекции отторжения до лечения, образцы исключали из анализа, если взятие образца проводили в пределах 8 суток после трансплантации сердца, если взятие образца проводили через 28 суток после начала лечения отторжения, если взятие образца проводили в то время, когда пациент был на механическом вспомогательном кровообращении, если субъект имел диагноз злокачественной опухоли или посттрансплантационного лимфопролиферативного заболевания в момент взятия крови, или если образец был взят после внутрикардиального доступа в ходе процедуры биопсии, поскольку эти клинические сценарии обеспечивают биологические предпосылки для изменений тотальной cf-ДНК и донорской фракции, которые искажают интерпретацию результатов анализа, поскольку они относятся к раннему обнаружению отторжения до лечения. Чувствительность и специфичность для диагноза отторжения аллотрансплантата была основана на ассоциированных с биопсией образцах, которые выходят за пределы этих критериев исключения. Субъектов, которые были реципиентами трансплантата костного мозга или несердечного солидного органа, или которые были беременными перед трансплантацией сердца, также исключали из этого исследования, учитывая, что множество генотипов донор/реципиент (и плод) искажали анализ.

Кроме того, техническое исключение образцов происходило, если они не удовлетворяли следующим стандартам контроля качества (QC) для анализа: объем крови, объем плазмы, количество ДНК, время до центрифугирования, и температура.

Взятие образцов крови

От трех до десяти миллилитров (мл) крови с противосвертывающим средством собирали для оценки циркулирующих уровней cf-ДНК. Каждый образец собирали в 10-мл пробирки ВСТ (Streck, Omaha, NE). Образцы сразу кодировали, деидентифицировали и доставляли в лабораторию для обработки.

Обработка плазмы и экстракция ДНК

Отделение плазмы от цельной крови посредством центрифугирования проводили, как описано ранее. Плазму хранили при -80°C до выделения ДНК. Всю экстракцию cf-ДНК проводили с использованием набора ReliaPrepTM HT Circulating Nucleic Acid Kit, Custom (Promega, Madison, WI). Также регистрировали тотальную cf-ДНК из каждого образца плазмы. Геномную ДНК реципиента экстрагировали с использованием системы ReliaPrepTM Large Volume gDNA Isolation system (Promega, Madison, WI) или набора Gentra

Puregene Blood Kit (Qiagen, Germantown MD). Геномную ДНК донора для генотипирования получали от Blood Center of Southeast Wisconsin, который собирает и хранит ДНК от всех доноров в качестве части процесса подбора донор/реципиент. В некоторых случаях геномную ДНК получали из биоптатов и экстрагировали с использованием набора QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Germantown MD). Всю очищенную геномную ДНК ресуспендировали в 0,1X буфере TE.

Анализ тотальной cf-ДНК

Содержание тотальной cf-ДНК в каждом образце плазмы оценивали в трех экземплярах с использованием эталонного анализа с использованием количественной полимеразной реакции в реальном времени (кОТ-ПЦР) TaqMan, который выявляет ген компонента H1 РНК рибонуклеазы Р (H1RNA) (RPPH1) на хромосоме 14 человека, метафазные полосы 14q11.2. В анализе проводят амплификацию продукта размером 87 п.н., который картируется в одном экзоне гена RPPH1, на chr14:20811565 в NCBI build 37 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Анализ с использованием ПЦР проводили на системе Applied Biosystems QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Для каждой реакции использовали один мкл cf-ДНК, экстрагированной из плазмы. Серию разведений геномной ДНК человека использовали для создания стандартной кривой для количественного определения. Тотальную cf-ДНК из каждого образца получали и представляли в качестве нг/мл плазмы.

Анализ процента донорской cf-ДНК

Был разработан собственный мультиплексный анализ на основе аллель-специфической ПЦР, названный анализом myTAI-Heart, для прямого количественного определения процента донорской внеклеточной ДНК (Dcf-ДНК) в качестве фракции тотальной cf-ДНК (TAI Diagnostics). Анализ количественно определяет биаллельные SNP с использованием ПЦР в реальном времени, специфичной к каждому аллелю. Были выбраны SNP с высокой популяционной частотой, поскольку это увеличивало их вероятность достоверного количественного определения и способность к различению между геномами реципиента и донора.

Пятнадцать нг cf-ДНК добавляли к основной смеси для мультиплексной библиотеки с добавлением внешнего стандарта (TAI5) к каждому образцу (4,5E+03 копий) и амплифицировали посредством ПЦР в течение 35 циклов в 25-мкл реакционной смеси, содержащей 0,005 Е ДНК-полимеразы Q5 (NEB), 0,2 мМ dNTP, 3 мкМ совокупность прямых праймеров для 96 мишеней, и 3 мкМ совокупность обратных праймеров для 96 мишеней в конечной концентрации 2 мМ MgCl₂. Условия циклов представляли собой 98°C в течение 30 с, затем 35 циклов при 98°C в течение 10 с, 55°C в течение 40 с и 72°C в течение 30 с. Затем проводили инкубацию в течение 2 мин при 72°C. Затем образцы хранили при 4°C. Десять микролитров конечной реакционной смеси очищали с использованием ExoSAP-IT (Thermo Fisher Scientific) путем инкубации при 37°C в течение 15 минут и 80°C в течение 15 минут.

Затем образцы разбавляли 1:1 буфером для хранения TAI и хранили при -80°C до

готовности для количественного генотипирования. Затем образцы разбавляли 1:100 для количественного генотипирования и приготавливали в качестве 3-мкл реакционной смеси с соответствующими контролями и калибраторами для ПЦР в реальном времени, проводимой с использованием системы Roche LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

Анализ

Количественное генотипирование

В "количественном генотипировании" (qGT) используются стандартные кривые гетерозиготных источников ДНК для количественного определения аллелей А и В в каждой мишени. Процедуры контроля качества оценивают каждую стандартную кривую и амплификацию образца в отношении удовлетворения критериям приемлемости. Затем поддающиеся количественному определению мишени интерпретируют. Критерии приемлемости включают историческую форму кривой мплификации, специфичность анализа с использованием аллель-специфической ПЦР в отношении второго аллеля, соотношение сигнала и шума, наклон и г-квадрат наборов стандартных кривых, не амплификацию контролей и контаминацию отрицательных контролей.

В первичном анализе сначала оцениваются геномы донора и реципиента для "основного генотипирования" (bGT). Процесс bGT идентифицирует донора и/или реципиента по трем возможным генотипам в каждой мишени (например, гомозиготный АА, гетерозиготный АВ и гомозиготный ВВ). Эта информация необходима для точной интерпретации qGT на мишень. Информативные мишени определяют как мишени, где известно, что реципиент является гомозиготным и донор имеет другой генотип. Когда донор является гомозиготным и отличается от реципиента, мишень называют полностью информативной, поскольку наблюдаемая доля В-аллеля приблизительно равна общему уровню донорской cf-ДНК. Когда донор является гетерозиготным, мишень называют полуинформативной, поскольку присутствует вклад как в аллель А, так и в аллель В, что означает, что измеренный вклад должен быть удвоен. Для достоверности, срединное значение информативных и прошедших контроль качества соотношений аллелей сообщают в качестве процента донорской cf-ДНК.

Каждый процесс qGT обеспечивает два основных показателя качества: rCV и dQC. Регуляризованный робастный коэффициент вариации (rCV) вычисляют с использованием распределения информативных и поддающихся количественному определению мишеней. Сначала вычисляют робастное стандартное отклонение (rSD) в качестве срединного абсолютного отклонения от срединной доля минорного типа, масштабированного посредством фактора нормализации 1,4826. rSD конвертируют в коэффициент вариаций путем деления на % донорской cf-ДНК после его регуляризации добавлением четверти одного процента, чтобы избежать нестабильности у делителя нуля. rCV измеряет распределение анализируемых мишеней у их срединного значения и служит в качестве меры точности или качества образца. Пригодные образцы, как правило, имеют rCV ниже 50%.

dQC представляет собой проверку качества дискордантности: оценивают среднюю долю минорного аллеля гомозиготных гомозиготный и неинформативных мишеней реципиента для защиты от перепутывания образцов и контаминации. Она теоретически должна составлять практически ноль процентов с учетом шума от неспецифических аллелей. Если произошло перепутывание образцов в ходе сбора или переработки, используются неправильные генотипы реципиента и тест dQC, выполняемый системой, сразу выделяет вплоть до 50 или 100% данных как предположительные неинформативные мишени. dQC также определяет контаминацию образца и возможную геномную нестабильность. Пригодные образцы, как правило, имеют dQC ниже 0,5%.

Вторичный способ вычисления донорской cf-ДНК применим, когда донорский генотип недоступен. С использованием только генотипов реципиентов и результатов qGT, оценивают донорские варианты в имитации Монте-Карло. Первичная случайная селекция иллюстрирует, какие общие результаты может отражать данный образец qGT. Статистический анализ данных имитации обеспечивает обоснование возможных донорских генотипов. Вторичные имитации Монте-Карло исследуют возможное или вероятное пространство донорского генотипа и обеспечивают диапазон возможных исходов qGT. Каждая из 50000 сообщает триплет срединного значения Dcf-ДНК, rCV и dQC, и составляет трехмерное облако точек. Облако точек рассекается на нижнюю треть dQC и rCV и оставшийся "квадрант" обозначает имитации, соответствующие реалистичному и чистому образцу. Центральные 95% сигналов cf-ДНК донора могут стать исходном для qGT без донорского генотипа.

Донорская фракция

Донорские фракции (или процент донорской cf-ДНК) вычисляли и сравнивали в качестве событий, таких как клеточное отторжение, опосредуемое антителами отторжение, васкулопатия трансплантата и клинически значимые случаи смерти, остановки сердца, повторной трансплантации сердца и механического вспомогательного кровообращения. Если у субъекта диагностирована злокачественная опухоль или посттрансплантационное лимфопролиферативное заболевание, или он становится беременным, регистрируют первые даты диагноза, если применимо.

Генотипирование образцов от субъектов удовлетворяло критериям включения/исключения, и его использовали для последующего анализа. Генотипирование каждой пары донор-реципиент приводило к информативным локусам на образец.

Статистика

Медианный тест для независимых срединных значений проводили для тестирования того, имеет ли тип отторжения (CR0, CR1, CR2) равные срединные значения в зависимости от типа способа (с донорским генотипом или с имитациями без донорского генотипа). При комбинировании CR0 и CR1 и сравнении срединных значений этих способов с CR2, значения p составляли более 0,05. Таким образом, было сделано заключение, что срединные значения являются равными для типа отторжения. Однако при сравнении срединных значений среди трех типов отторжения (CR0 против CR1 против

CR2), значения p составляли менее 0,05, и было сделано заключение, что срединные значения, определенные, когда донорский генотип был известен и когда донорский генотип был неизвестен, не являются равными для типа отторжения.

Рабочие характеристические (ROC) кривые строили для оценки чувствительности и специфичности двух аналитических способов и сравнения их способности диагностировать CR0 против CR1 против CR2. Оптимальная точка отсечения или пороговое значение принятия решения представляет собой точку, которая обеспечивает максимально правильную классификацию, и использовали способ Liu et al. (Stat Med. 31(23):2676-86 (2012)). Этот способ максимизирует произведение чувствительности и специфичности. Также вычисляли отрицательные и положительные прогностические величины. Например, положительная прогностическая величина (PPV) 13,4% отражает, что среди тех, которые имели положительный результат скринингового теста, вероятность заболевания составляла 13,4%. Аналогично, отрицательная прогностическая величина (NPP) 100% указывает на то, что среди тех, кто имел отрицательный результат скринингового теста, вероятность быть свободным от заболевания составила 100%.

Иллюстративное воплощение системы

В соответствии с одним вариантом осуществления любой из систем система выполняет программу для определения донорской фракции (%), где донорский генотип неизвестен. В одном примере выполнение программы включает любую одну, или несколько, или любую комбинацию следующих действий:

1. Имитацию Монте-Карло выполняют для донорских генотипов для определения возможной донорской фракции (в других вариантах осуществления можно использовать другие модели или аппроксимации);

2. Двухфазный подход, где первоначальная короткая имитация образцов (например, пороговое количество выборок (например, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 5999, среди других возможностей) используется в качестве информации для вторичной имитации большего количества образцов (например, 10000, 15000, 20000, 25000, 29999 и т.д.) - при имитации можно вычислять триплет срединного значения донорской фракции, gCV и $a dQC$;

3. При первоначальной имитации явные донорские генотипы можно определять путем проведения генерализованного линейного моделирования влияния выбора мишеней на gCV и dQC по отдельности. Дальнейший анализ энтропии и частоты выбранных мишеней среди образцов с высоким фоновым шумом добавляют к значению смещения вероятности донорского генотипа;

4. При первоначальной имитации донорские генотипы могут быть выбраны единообразно (например, выбраны как 22,7% RR, 45,5% RV, 22,7% VV, 10% NA) (например, гетерозиготный (RV), гомозиготный вариант (VV) и гомозиготный эталон (RR));

5. Вторичная имитация выбирает донорские генотипы как 25% RR, 50% RV и 75% VV, с единообразным случайным переменным смещением на указанный выше вектора

результатов, менее двух мишеней для отсутствия искажения;

6. Создается трехмерное облако точек и часть цензурируется. Имитация с экстремальными величинами срединной донорской фракции и rCV , определяется с использованием экспоненциальной функции $0,001/3 + (\exp(3*x)-1)/2750$, которая маркируются для цензурирования. В некоторых вариантах осуществления, если цензурированию подлежит более 95% имитаций, алгоритм может быть настроен для извлечения тех, которые находятся выше их средней точки срединных донорских фракций;

7. Из остальных имитаций идентифицируют имитации с более низким фоновым шумом в качестве имитаций ниже первого квартиля dQC . В соответствии с любым из вариантов осуществления систем или способов, имитации выше нижнего квартиля dQC исключаются;

8. Из остальных имитаций внутренне неизменные имитации идентифицируют как имитации ниже первой трети rCV . В соответствии с любым из вариантов систем или способов, имитации выше нижней трети rCV могут быть исключены. В других примерах могут быть осуществлены различные пороговые значения для rCV ;

9. В любом из вариантов осуществления систем или способов может быть включена калибровка в проведение анализа донора, например, донорские фракции могут быть масштабированы посредством линейной формулы (например, $y <- (1,166002)x+0,0001230337$); и

10. В любом из вариантов осуществления систем или способов, алгоритм настроен для определения 48-го перцентиля срединных донорских фракций в качестве возврата этой информации.

На **фиг.5** представлена блок-схема платформы 500, включающей элементы системы, и она выполняет функцию анализа образца в соответствии с одним вариантом осуществления. В различных вариантах осуществления платформа 500 может принимать или генерировать данные, подлежащие анализу. Например, система может извлекать данные из внешней базы данных (например, 550, 552) и анализировать извлеченные данные. В других примерах пользователи (например, 554, 556) могут контролировать или запускать коммуникацию данных с платформой 500. В следующих примерах пользователи (658, 560) могут оперировать устройствами для анализа и/или устройствами для амплификации (например, 582, 584) и результаты предоставлять непосредственно платформе 500.

В соответствии с различными вариантами осуществления любой из систем или способов проводимый анализ может быть описан с помощью трех фаз: предварительная обработка bGT , предварительная обработка gGT и количественная обработка генотипов, и вывод результатов на 592 и/или хранение (например, в базе данных 590).

В некоторых вариантах осуществления информацию о анализе и образце (например, информация 502 о проведении основного генотипирования и/или информация 504 о проведении количественного генотипирования) определяют посредством работы

графического пользовательского интерфейса. В некоторых примерах предварительная обработка основного генотипирования работает с информацией, которая может включать указание названия оператора, идентификатора образца и положения образца; предварительная обработка количественного генотипирования может работать с информацией, которая включает название анализа, название оператора, идентификатор образца и положение образца; и обработка выходного сигнала работает с информацией, которая может включать предварительную обработку файлов данных bGT, обозначение файлов (реципиент или донор), файлы данных предварительной обработки qGT, название анализа и название образца. Конфигурационная база данных 594 может включать информацию, указывающую на формат данных, информацию о контроле и данные о других функциях, включая административные функции.

Как показано на **фиг.5**, данные lightcycler 480 (например, 582 и 584) обрабатываются в качестве части анализа образца. В одном примере платформа 500 извлекает данные из ROCHE Lightcycler 480 через файлы XML или другой подходящий формат данных. Данные могут коммуницироваться с работой пользователя (например, запускаемой пользователями 558 или 560).

На **фиг.5** на 518 приведены три последовательности действий, которые функционируют на полученной информации об анализе (например, 506 и 508), информации об обработке жидкостей (например, 510 и 512), и данных ОТ-ПЦР (например, 514 и 516 (которые могут включать, например, данные ПЦР в реальном времени)). Три последовательности действий включают: предварительную обработку bGT 522, которая считывает данные, полученные на образце геномной ДНК (например, совместно с информацией о конфигурации формата плиты) для получения файла данных (например, файл бинарных данных), состоящего из основных результатов генотипирования и документов контроля качества - эти файлы могут быть заархивированы в отдельных хранилищах данных или системах; предварительная обработка qGT 518, которая считывает данные на образце внеклеточной ДНК (например, совместно с конфигурацией формата плиты) для получения файла данных (например, бинарного файла данных), состоящего из количественных результатов генотипирования и документов контроля качества - эти файлы могут быть заархивированы в отдельных хранилищах данных или системах; и количественная обработка генотипов 520, где пара файлов данных об основном генотипировании и количественном генотипировании (например, от 518 и 520) анализируется для мер исхода и общих документов контроля качества - эти файлы могут быть заархивированы на отдельном источнике данных или системах, включающих, например, базу данных 590. В различных вариантах осуществления результаты 592 могут быть отображены с помощью платформы или могут коммуницироваться с другими системами для отображения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ, включающий:

анализ количеств аллелей множества соответствующих мишеней в образце и идентификацию поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце;

проведение имитаций с возможными генотипами для не субъекта; и

определение количества аллелей каждой мишени, относящихся к не субъекту и необязательно к субъекту, на основе возможного генотипа(ов) не субъекта, определенного в результате имитации и необязательно определение процента или соотношения количеств для не субъекта и субъекта в образце.

2. Способ по п.1, где способ дополнительно включает определение генотипа субъекта.

3. Способ по любому из п.п.1 или 2, где способ дополнительно включает проведение амплификаций для определения количества аллелей.

4. Способ по п.3, где амплификации проводят для по меньшей мере 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или более мишеней.

5. Способ по любому из предшествующих п.п., дополнительно включающий вычисление показателей качества для определенных процентов или соотношений в образце.

6. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ включает имитацию вероятного генотипного пространства не субъекта.

7. Способ по любому из предшествующих п.п., где имитации (например, Монте-Карло) проводят для определения диапазона возможных генотипов для не субъекта.

8. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает внесение поправки в измеренный вклад соответствующих мишеней на основе соответствующих возможных генотипов (например, удвоение величины измеренного вклада в результате определения того, что возможный генотип субъекта является гетерозиготным).

9. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает вычисление усредненного, такого как срединное, процента или соотношения.

10. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает определение, что каждая стандартная кривая и/или величина амплификации образца удовлетворяет порогу достоверности.

11. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает определение величин достоверности, исходя из анализа по меньшей мере одного из исторической формы кривой амплификации, специфичности анализа с использованием аллель-специфической ПЦР (например, в отношении второго аллеля), соотношения сигнала и шума для образца, наклона и величины t -квадрат для стандартных наборов кривых, величин не амплификации, полученных для встроенных контролей, или величин контаминации, полученных для образца отрицательного контроля.

12. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает аппроксимацию данных, полученных для образца, к исторической форме кривой амплификации.

13. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает определение того, что наклон и величина Γ -квадрат для стандартного набора кривых не превышает пороговую величину.

14. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает присвоение обозначения не субъекту или субъекту для каждой идентифицированной мишени как поддающаяся количественному определению и/или информативная в образце.

15. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает определение информативных мишеней в образце в результате классификации соответствующей мишени в соответствии с генотипом.

16. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает классификацию соответствующей мишени в качестве информативной в результате определения того, что субъект и не субъект имеют различные генотипы (например, субъект является гомозиготным по одному аллелю и не субъект не является гомозиготным или является гомозиготным по другому аллелю).

17. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает внесение поправки в измеренный вклад соответствующей мишени в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным (например, удвоение измеренной величины вклада в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным).

18. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает вычисление срединного количества информативных (например, идентифицированных посредством компонента генотипирования) и прошедших контроль качества (например, идентифицированных посредством компонента контроля качества) аллелей и сохраняет срединные величины в качестве соотношения или процента.

19. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает вычисление регуляризованного робастного коэффициента вариации ("rCV") на основе распределения информативных и поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных процентов или соотношений.

20. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает вычисление робастного стандартного отклонения ("rSD") на основе срединного абсолютного отклонения от срединной доли минорного типа.

21. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает преобразование rSD в rCV посредством деления, например, на процент cf-ДНК не субъекта.

22. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает внесение поправки в rSD, чтобы избежать деления на ноль (например, путем

добавления четверти от одного процента к делителю).

23. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает идентификацию образца, пригодного для количественного определения, на основе пороговой величины rCV , определенной по распределению информативных и поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных процентов или соотношений.

24. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает оценку средней доли минорного аллеля гомозиготных и неинформативных мишеней субъекта против порогового значения контаминации.

25. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает вычисление величины проверки качества дискордантности ("dQC") на основе средней доли минорного аллеля гомозиготных и неинформативных аллелей субъекта и оценку величины dQC против порогового значения.

26. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает идентификацию образцов, пригодных для количественного определения, на основе идентификации величины dQC ниже 0,5%.

27. Способ по любому из предшествующих п.п., где не субъект представляет собой донора.

28. Способ по любому из предшествующих п.п., где образец взят от субъекта с трансплантатом.

29. Способ по п.28, где субъект с трансплантатом представляет собой субъекта с трансплантатом сердца.

30. Способ по п.28 или 29, где образец взят от педиатрического субъекта.

31. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает выбор суммарного и/или 95% доверительного интервала возможных имитаций.

32. Способ по любому из предшествующих п.п., где способ дополнительно включает выбор имитаций с dQC и rCV ниже среднего и/или определение 95% доверительного интервала.

33. Система для анализа образца от субъекта, причем система включает:

по меньшей мере один процессор, функционально подсоединенный к памяти;

первый компонент (например, компонент контроля качества), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованный для анализа (например, количественного генотипирования ("qGT")) количества аллелей множества соответствующих мишеней в образце, и идентификации поддающихся количественному определению и/или информативных мишеней в образце;

второй компонент (например, компонент моделирования), организованный для имитации информации о возможном генотипе не субъекта; и

третий компонент (например, компонент генотипирования), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованным для определения количеств аллелей каждой мишени, приписываемой к не субъекту и необязательно субъекту, на основе

возможного или вероятного генотипа(ов) не субъекта, определенного из имитации, и необязательно определение процента или соотношения для не субъекта относительно количеств для субъекта в образце.

34. Система по п.33, дополнительно содержащая четвертый компонент (например, аналитический компонент), выполняемый по меньшей мере одним процессором, организованный для вычисления показателей качества на определенных процентах или соотношениях в образце.

35. Система по любому из п.п.33 или 34, где третий компонент организован для имитации вероятного пространства генотипа не субъекта.

36. Система по любому из п.п.33-35, где третий компонент организован для выполнения имитации (например, Монте-Карло) для определения диапазона возможных или вероятных генотипов не субъекта.

37. Система по любому из п.п.33-36, где третий компонент организован для внесения поправки в измеренный вклад соответствующих мишеней на основе соответствующих возможных или вероятных генотипов (например, удвоение величины измеренного вклада в результате определения того, что возможный или вероятный генотип не субъекта является гетерозиготным).

38. Система по любому из п.п.33-37, где по меньшей мере один процессор организован для вычисления усредненного, такого как срединное, значения процента или соотношения.

39. Система по любому из п.п.33-38, где первый компонент организован для определения того, что каждая стандартная кривая и/или величина амплификации образца удовлетворяет пороговому значению достоверности.

40. Система по любому из п.п.33-39, первый компонент организован для определения величин достоверности на основе анализа по меньшей мере одного из исторической формы кривой амплификации, специфичности анализа с использованием аллель-специфической ПЦР (например, относительно второго аллеля), соотношения сигнала и шума для образца, наклона и величины χ^2 для стандартных наборов кривых, величин не амплификации, полученных для встроенных контролей, или величин контаминации, полученных для образцов отрицательных контролей.

41. Система по п.40, где первый компонент организован для аппроксимации данных, полученных для образца, к исторической форме кривой амплификации.

42. Система по п.40, где первый компонент организован для определения того, что наклон и величина χ^2 для стандартных наборов кривых не превышает пороговую величину.

43. Система по любому из п.п.33-42, где первый или третий компонент организован для присвоения обозначения для не субъекта или субъекта по каждой идентифицированной мишени как поддающаяся количественному определению и/или информативная в образце

44. Система по п.43, где первый или третий компонент организован для

определения информативных мишеней в образце после классификации соответствующих мишеней в соответствии с генотипом.

45. Система по п.43 или 44, где третий компонент организован для классификации соответствующей мишени в качестве информативной в результате определения того, что субъект и не субъект имеют различные генотипы (например, субъект является гомозиготным по одному аллелю и не субъект не является гомозиготным или является гомозиготным по другому аллелю).

46. Система по любому из п.п.33-45, где третий компонент организован для внесения поправки в измеренный вклад соответствующей мишени в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным (например, удвоение величины измеренного вклада в результате определения того, что не субъект является гетерозиготным).

47. Система по любому из п.п.33-46, где третий компонент вычисляет срединное значение соотношения информативных (например, идентифицированных посредством компонента генотипирования) и прошедших контроль качества (например, идентифицированных посредством компонента контроля качества) аллелей и срединных величин в качестве соотношения или процента.

48. Система по любому из п.п.33-47, где любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для вычисления регуляризованного робастного коэффициента вариации ("rCV") на основе распределения информативных и поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных процентов или соотношений.

49. Система по любому из п.п.33-48, где любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для вычисления робастного стандартного отклонения ("rSD") на основе срединного абсолютного отклонения от срединной меньшей видовой доли.

50. Система по п.49, где любой из компонентов (например, аналитический компонент) организован для преобразования rSD в rCV посредством деления, например, на процент или соотношение cf-ДНК не субъекта.

51. Система по п.49 или 50, где компонент организован для внесения поправки в rSD, чтобы избежать деления на ноль (например, путем добавления четверти от одного процента).

52. Система по любому из п.п.33-51, где система организована для идентификации образца, пригодного для количественного определения, на основе пороговой величины rCV, определенной по распределению информативных и поддающихся количественному определению мишеней и ассоциированных процентов или соотношений.

53. Система по любому из п.п.33-52, где система организована для оценки средней доля минорного аллеля у гомозиготных и неинформативных мишеней субъекта против порогового значения контаминации.

54. Система по п.53, где система организована для вычисления величины проверки

качества дискордантности ("dQC") на основе средней доли минорного аллеля гомозиготных и неинформативных аллелей субъекта и оценку величины dQC против порогового значения.

55. Система по п.53 или 54, где система организована для идентификации образцов, пригодных для количественного определения, на основе идентификации величины dQC ниже 0,5%

56. Система по любому из п.п.33-55, где не субъект представляет собой донора.

57. Система по любому из п.п.33-55, где образец взят от субъекта с трансплантатом.

58. Система по п.57, где субъект с трансплантатом представляет собой субъекта с трансплантатом сердца.

59. Система по п.57 или 58, где образец взят от педиатрического субъекта.

60. Система по любому из п.п.33-59, где система, кроме того, организована для выбора суммарного и/или 95% доверительного интервала возможных или вероятных имитаций.

61. Система по любому из п.п.33-60, где система, кроме того, организована для выбора имитаций с dQC и гCV ниже среднего и/или определение 95% доверительного интервала.

62. Отчет, включающий любую одну или нескольких величин, полученных с помощью любого из предшествующих способов или систем.

63. Способ лечения субъекта, включающий:

оценку субъекта на основе одной или нескольких величин, полученных с помощью любого из предшествующих способов или систем, и

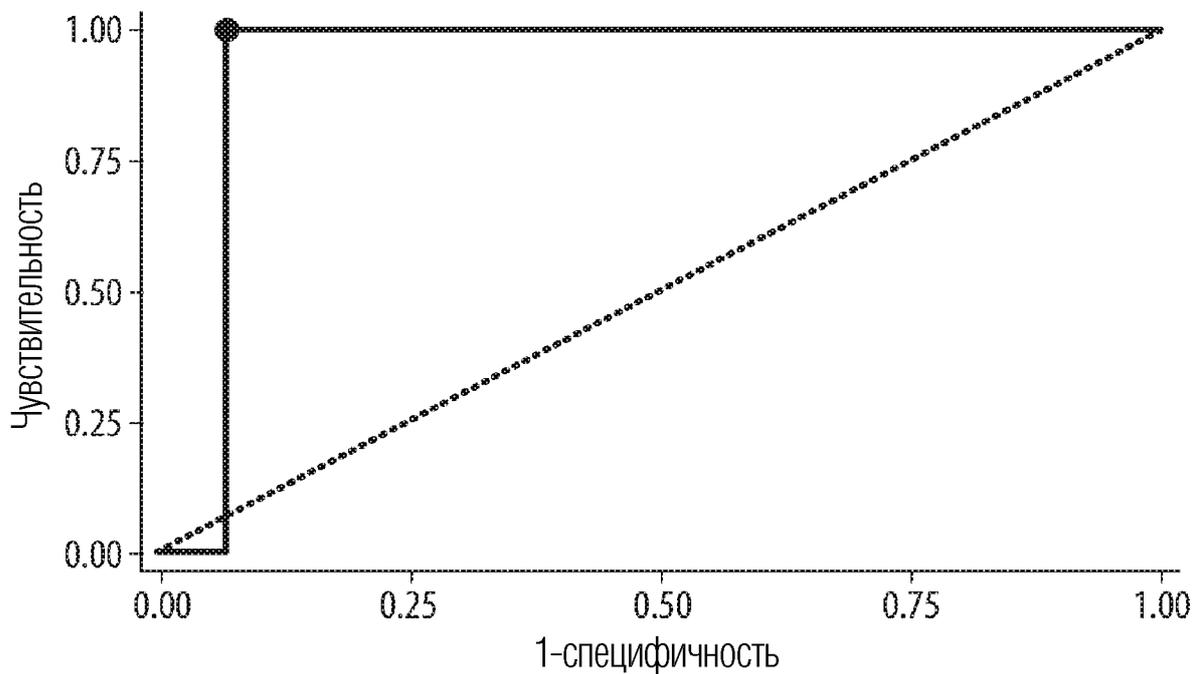
лечение, рекомендацию лечения, изменение лечения, дальнейший мониторинг или рекомендацию дальнейшего мониторинга субъекта.

64. Любой из способов, описанных в настоящем описании.

65. Любая из систем, описанных в настоящем описании.

По доверенности

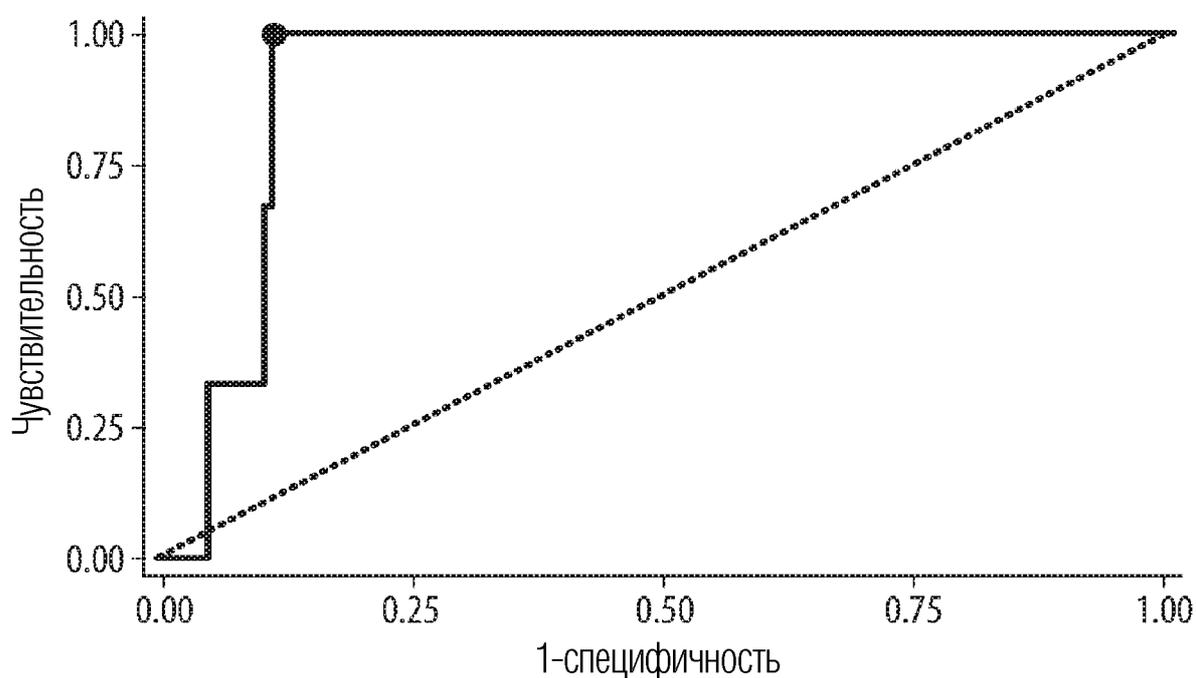
Эталонная переменная	Отторжение (CR0 и CR1 против CR2)	
Классифицированная переменная	Способ 1	
Эмпирическая оптимальная точка отсечения (95%CI)	0.87 (0.78, 0.97)	p=0.009
Чувствительность в точке отсечения:	1.00	
Специфичность в точке отсечения	0.93	
Площадь под ROC-кривой в точке отсечения	0.97	
PPV	13.4% (7.6, 22.6)	
NPV	100%	



Площадь под ROC-кривой = 0,9348

ФИГ. 1А

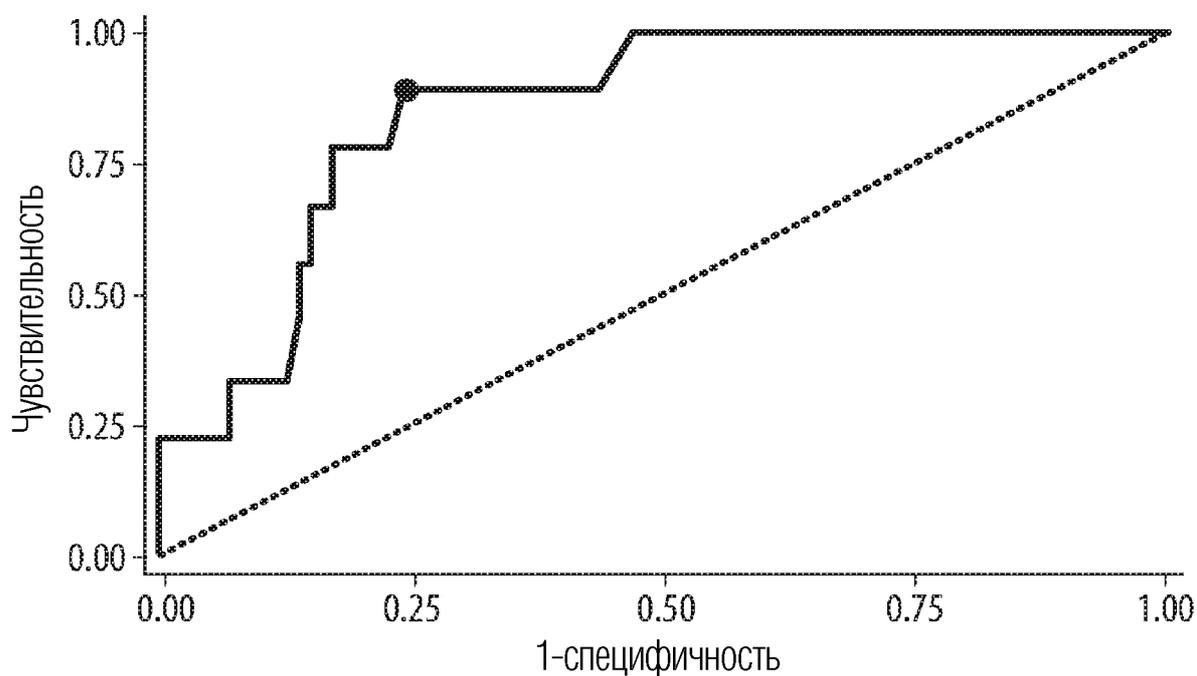
Эталонная переменная	Отторжение (CR0 и CR1 против CR2)	
Классифицированная переменная	Модернизированный способ 2	
Эмпирическая оптимальная точка отсечения (95%CI)	0.89 (0.46, 1.70)	p=0.725
Чувствительность в точке отсечения:	1.00	
Специфичность в точке отсечения	0.89	
Площадь под ROC-кривой в точке отсечения	0.95	
PPV	15% (3.12, 37.9)	
NPV	100% (97.4, 100)	



Площадь под ROC-кривой = 0,9140

ФИГ. 1В

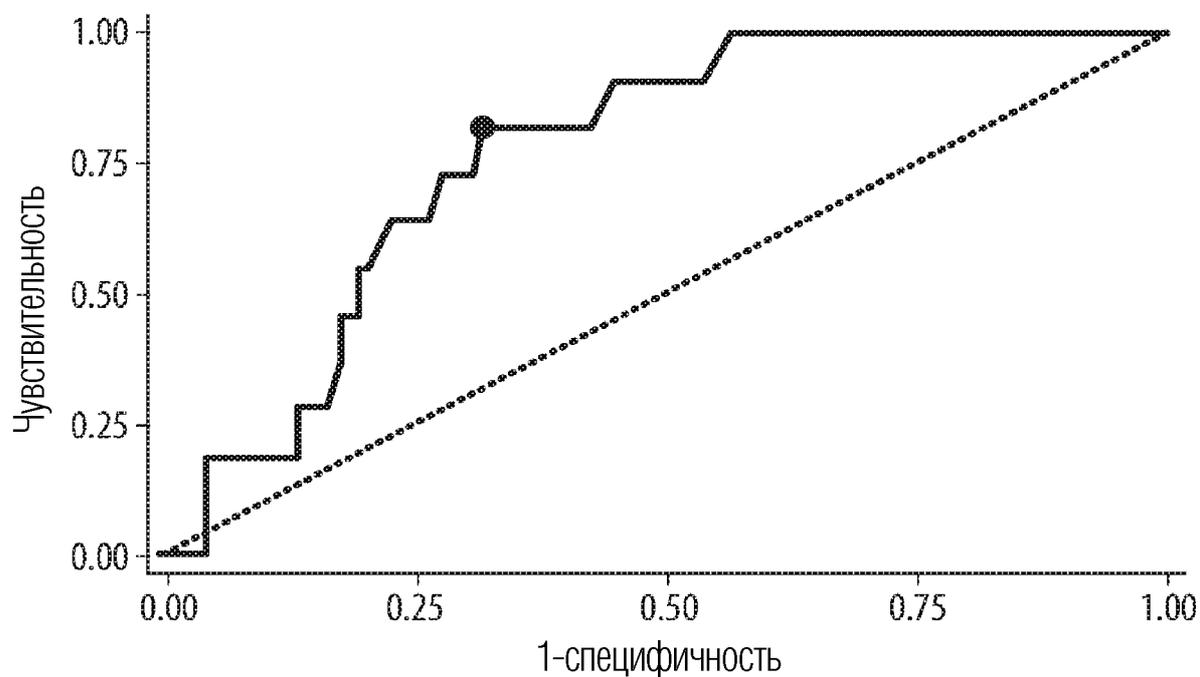
Эталонная переменная	Васкулопатия трансплантата	
Классифицированная переменная	Способ 1	
Эмпирическая оптимальная точка отсечения (95%CI)	0.19 (0.09, 0.41)	$p < 0.001$
Чувствительность в точке отсечения:	0.89	
Специфичность в точке отсечения	0.75	
Площадь под ROC-кривой в точке отсечения	0.82	
PPV	26.7% (19.2, 35.9)	
NPV	98.5% (91.2, 99.8)	



Площадь под ROC-кривой = 0,8403

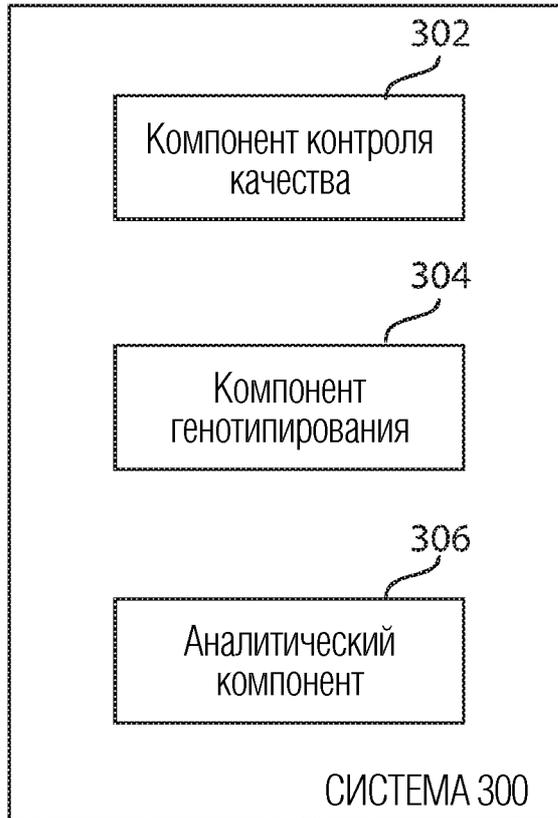
ФИГ. 2А

Эталонная переменная	Васкулопатия трансплантата	
Классифицированная переменная	Модернизированный способ 2	
Эмпирическая оптимальная точка отсечения (95%CI)	0.37 (0.24, 0.57)	$p < 0.001$
Чувствительность в точке отсечения:	0.82	
Специфичность в точке отсечения	0.68	
Площадь под ROC-кривой в точке отсечения	0.75	
PPV	22% (10.6, 37.6)	
NPV	97.1% (89.9, 99.6)	

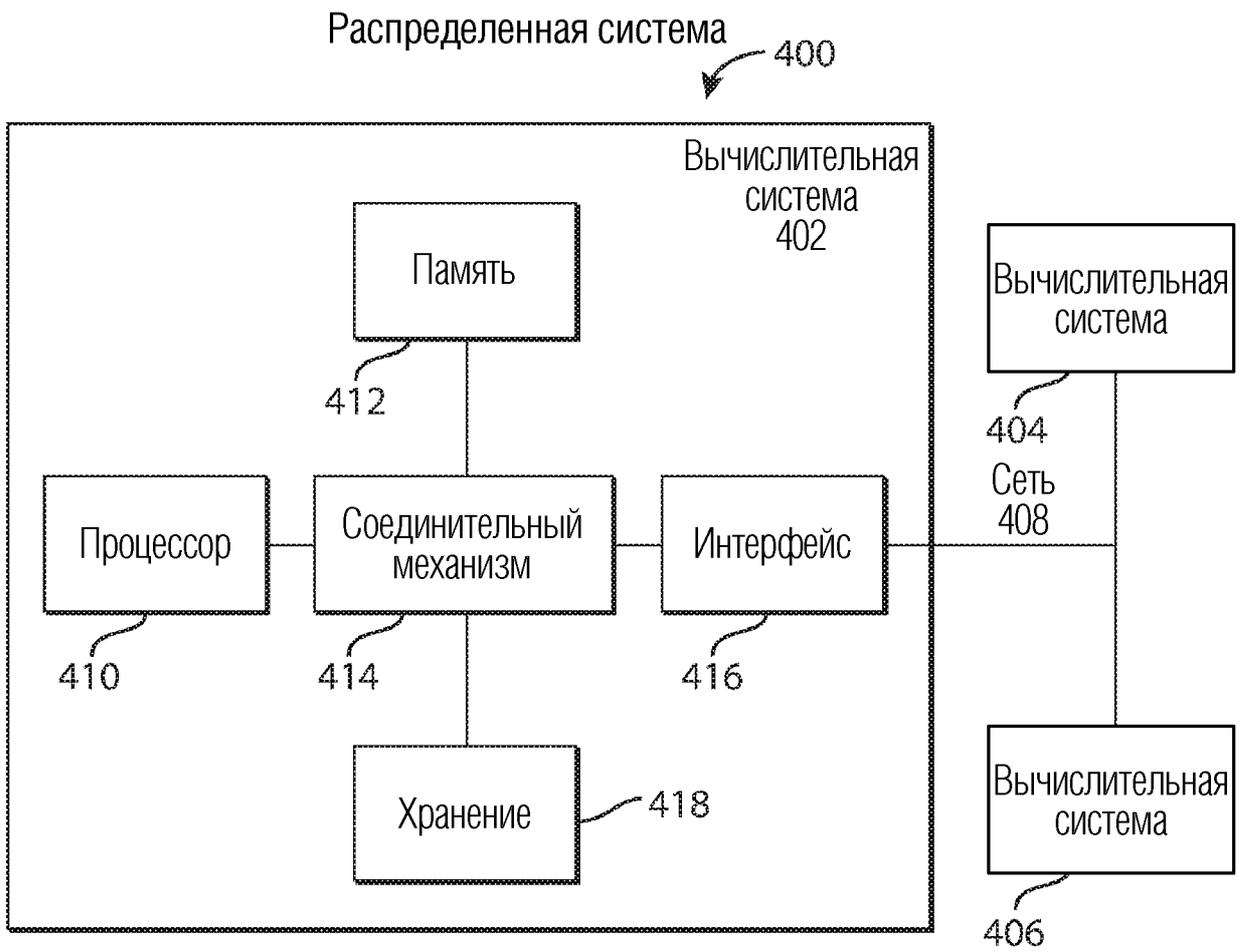


Площадь под ROC-кривой = 0,7713

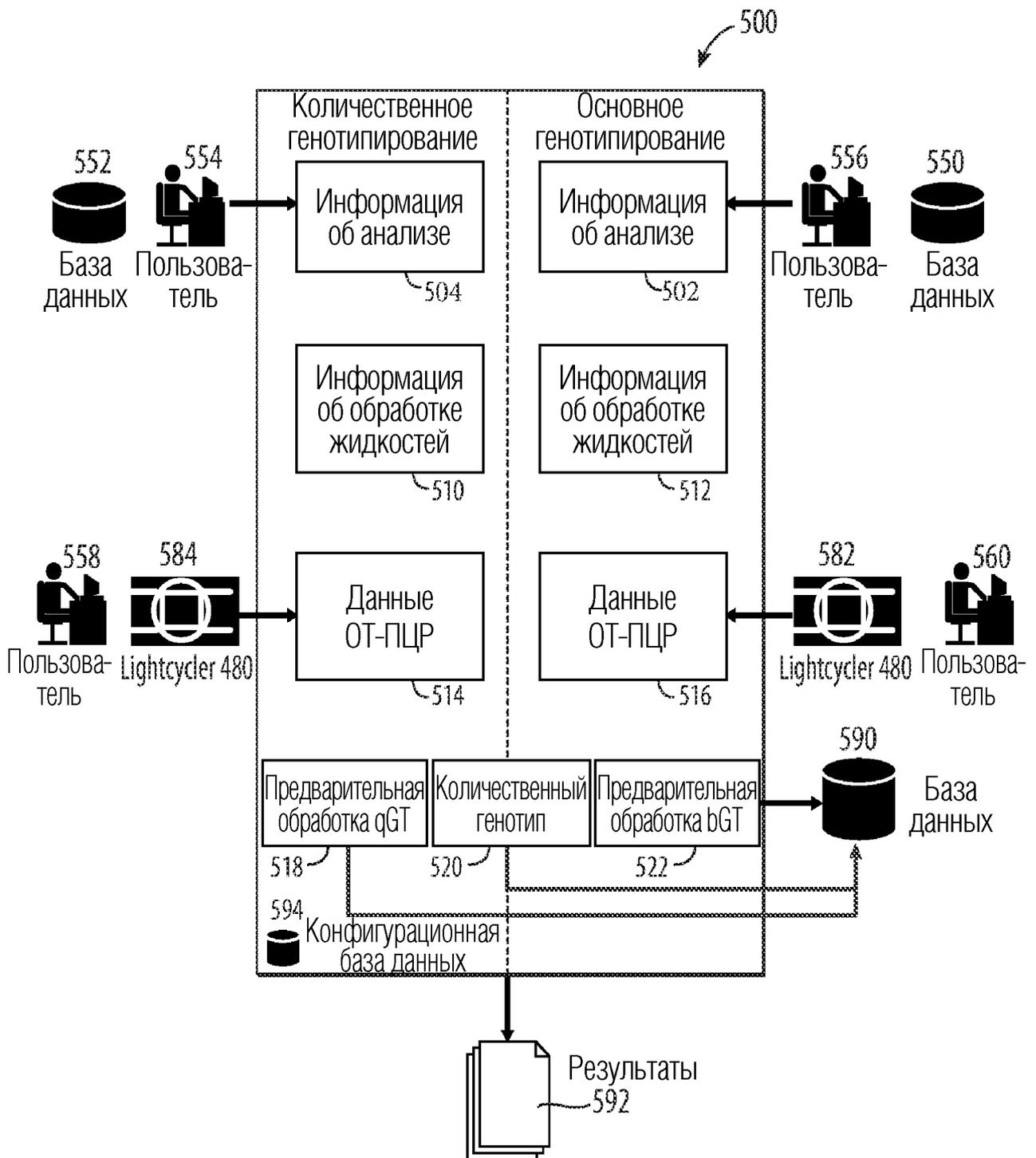
ФИГ. 2В



ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5